

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046884**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.06

(21) Номер заявки
201992613

(22) Дата подачи заявки
2018.05.07

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНСТРУКЦИИ
НА ОСНОВЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОГО АНТИТЕЛА, ОБЕСПЕЧИВАЮЩАЯ
УЛУЧШЕННОЕ ХРАНЕНИЕ И ВВЕДЕНИЕ**

(31) **62/502,578**

(32) **2017.05.05**

(33) **US**

(43) **2020.04.15**

(86) **PCT/US2018/031347**

(87) **WO 2018/204907 2018.11.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Абель Джефф, Цуй Линвэнь, Госвами
Девриши, Хух Джун, Джаганнатан
Бхарадвадж, Канапурам Секхар,
Маколи Арнольд, Шнейдер Майкл,
Сетхураман Анантхакришнан Г.,
Тройхайд Майкл, Чжан Дзун (US)**

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

(56) **WO-A1-2009070642**

Zhou et al.: "Regulatory Considerations for the Development of Novel Antibody-Related Products", 4th Annual QC Micro Workshop, 30 April 2016 (2016-04-30), pages 1-5, XP002783916, Retrieved from the Internet: URL:https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/185969-Regulatory-Considerations-for-the-Development-of-Novel-Antibody-Related-Products/[retrieved on 2018-08-14], pages 3, 4 second paragraph of section on bispecific antibodies
WO-A1-2017129585

Anonymous: "Highlights of Prescribing Information for BLINCYTO® (blinatumomab) for injection, for intravenous use", AMGEN, May 2018 (2018-05), pages 1-40, XP002783917, Retrieved from the Internet: URL:https://pi.amgen.com/~/media/amgen/repositorysites/pi-amgen-com/blincyto/blincyto_pi_hcp_english.pdf [retrieved on 2018-08-16], page 11 - page 12

(57) В изобретении предусматривается фармацевтическая композиция, улучшенная в отношении хранения и введения, содержащая: (a) конструкцию на основе биспецифического антитела, содержащую первый домен, связывающийся с поверхностным антигеном клетки-мишени, и второй домен, связывающийся со вторым антигеном, где конструкция на основе биспецифического антитела присутствует в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,5 мкг/мл до 20 мг/мл; (b) консервант в концентрации, эффективной для подавления роста микроорганизмов; и (c) разбавитель, где конструкция на основе биспецифического антитела является стабильной и извлекаемой.

B1**046884****046884****B1**

Предпосылки к созданию изобретения

Белковые терапевтические средства, включая фармацевтические препараты на основе белка, уже играют важную роль практически во всех областях медицины и входят в число наиболее быстро развивающихся терапевтических средств в (до)клинической разработке и в качестве коммерческих продуктов (Leader, Nature Reviews Drug Discovery 2008 Jan 7, 21-39). По сравнению с низкомолекулярными химическими лекарственными средствами белковые фармацевтические препараты обладают высокой специфичностью и активностью при относительно низких концентрациях и обычно назначаются для терапии заболеваний, сложно поддающихся лечению, таких как виды рака, аутоиммунные заболевания и метаболические нарушения (Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul; 32(7):372-80, Wang, Int J Pharm. 1999 Aug 20; 185(2):129-88).

Фармацевтические препараты на основе белков, таких как рекомбинантные белки, в настоящее время могут быть получены с высокой степенью чистоты при их первом изготовлении благодаря достижениям в процессах очистки в промышленном масштабе. Однако белки обладают низкой степенью стабильности и высоко подвержены деградации, как химической, так и физической. Химическая деградация относится к модификациям, включающим ковалентные связи, такие как дезамидирование, окисление, расщепление или образование новых дисульфидных связей, гидролиз, изомеризацию или дегликозилирование. Физическая деградация включает разворачивание белка, нежелательную адсорбцию на поверхностях и агрегацию. Устранение этих физических и химических факторов, обуславливающих нестабильность, является одной из наиболее сложных задач при разработке белковых фармацевтических препаратов (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul; 32(7):372-80).

Представляющие интерес фармацевтические препараты на основе белка включают конструкции на основе биспецифических антител, такие как конструкции на основе антитела ViTE® (биспецифический активатор, рекрутирующий Т-клетки), которые представляют собой рекомбинантные белковые конструкции, полученные из двух гибко соединенных связывающих доменов антитела. Один связывающий домен конструкций на основе антитела ViTE® является специфичным к выбранному опухолеассоциированному поверхностному антигену на клетках-мишенях; второй связывающий домен является специфичным для CD3, субъединицы Т-клеточного рецепторного комплекса на Т-клетках. Благодаря своей особой структуре конструкции на основе антител ViTE® определенно подходят для временного связывания Т-клеток с клетками-мишенями и одновременно эффективно активируют цитолитический потенциал, присущий Т-клеткам, против клеток-мишеней. Важным дальнейшим развитием конструкций первого поколения на основе антител ViTE® (см. WO 99/54440 и WO 2005/040220), разработанных в клинике как AMG 103 и AMG 110, явилось обеспечение конструкций на основе биспецифических антител, связывающихся с независимым от окружения эпитопом на N-конце цепи CD3ε (WO 2008/119567). Конструкции на основе антител ViTE®, связывающиеся с этим выбранным эпитопом, демонстрируют не только межвидовую специфичность к цепи CD3ε человека и *Callithrix jacchus*, *Saguinus oedipus* или *Saimiri sciureus*, но также за счет распознавания этого специфического эпитопа вместо ранее описанных эпитопов для связывающихся молекул CD3 в биспецифических молекулах, рекрутирующих Т-клетки, они не активируют неспецифично Т-клетки в той же степени, как это наблюдали для предыдущего поколения антител-рекрутеров Т-клеток. Это снижение активации Т-клеток было связано с меньшим или сниженным перераспределением Т-клеток у пациентов, что было определено как риск возникновения побочных эффектов.

Конструкции на основе антител, описанные в патентном документе WO 2008/119567, вероятно, подвержены быстрому выведению из организма; таким образом, несмотря на то, что они способны быстро достигать большинства частей тела и их можно быстрее получить и проще использовать, их применение *in vivo* может быть ограничено их короткой персистенцией *in vivo*. Длительное введение путем непрерывной внутривенной инфузии используется для достижения терапевтических эффектов из-за короткого периода полужизни *in vivo* этой небольшой одноцепочечной молекулы. Однако такие непрерывные внутривенные инфузии считаются неудобными для пациентов, например, поскольку инфузионные пакеты необходимо часто заменять с частотой по меньшей мере каждый второй день, чтобы избежать микробного загрязнения и, следовательно, таких побочных эффектов, как сепсис.

Добавление консервантов рассматривается в качестве одного из решений данной проблемы. Их основная функция заключается в подавлении роста микробов и обеспечении стерильности продукта в течение всего срока годности или срока использования лекарственного препарата. Традиционно используемые консерванты включают бензиловый спирт, фенол и м-крезол. Хотя консерванты имеют долгую историю применения с низкомолекулярными парентеральными препаратами, разработка белковых составов, включающих консерванты, является сложной задачей. Консерванты практически всегда оказывают дестабилизирующее действие (агрегацию) на белки, и это стало основным фактором, ограничивающим их использование в белковых составах. Таким образом, на сегодняшний день большинство белковых лекарственных средств составлены только для одноразового использования. До настоящего времени были возможны только несколько составов, содержащих консерванты, например человеческий

гормон роста (hGH), где разработка содержащих консерванты составов привела к коммерциализации более удобных форм выпуска в виде многоразовой шприц-ручки. В настоящее время на рынке доступны по меньшей мере четыре таких устройства в виде ручек, содержащих стабилизированные составы hGH. Нордитропин (жидкость, Novo Nordisk), Нутропин AQ (жидкость, Genentech) и Генотропин (лиофилизированный - двухкамерный картридж, Pharmacia & Upjohn) содержат фенол, в то время как соматроп (Eli Lilly) содержит м-крезол. При составлении и разработке стабилизированных составов необходимо учитывать несколько аспектов. Эффективная концентрация консерванта в лекарственном продукте должна быть оптимизирована. Это требует проверки данного консерванта в лекарственной форме с диапазонами концентраций, которые обеспечивают антимикробную эффективность без вреда для стабильности белка. Важно отметить, что эффективность консерванта должна быть продемонстрирована в конечном составе, содержащем активное лекарственное средство и все вспомогательные компоненты.

Следовательно, целью настоящего изобретения является создание улучшенных фармацевтических композиций, содержащих конструкции на основе биспецифических антител, которые предпочтительно предохранены таким образом, что непрерывные инфузии можно проводить с более длинными интервалами, т.е. с повышением комфорта пациента, и в то же время являются стабильными как при хранении, так и при введении. Однако подходящая содержащая консерванты фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию на основе биспецифического антитела, была бы полезна также для таких конструкций на основе биспецифического антитела, которые не требуют непрерывной инфузии в течение нескольких дней, а всего лишь в течение нескольких часов, поскольку инфузии этих конструкций на основе биспецифического антитела с увеличенным периодом полужизни (HLE) также могут занимать несколько часов, в течение которых следует снизить риск микробного загрязнения и, следовательно, инфекции. В то же время получение фармацевтической композиции и содержащейся в ней конструкции на основе биспецифического антитела также является задачей настоящего изобретения.

Увеличенный период полужизни обычно используется в применении иммуноглобулинов *in vivo*, особенно антител и наиболее особенно фрагментов антител небольшого размера. Подходы, описанные в данной области техники, для достижения такого эффекта, включают слияние малой конструкции на основе биспецифического антитела с более крупными белками, которые предпочтительно не влияют на терапевтический эффект конструкции на основе антитела ViTE®. Примеры таких дополнительных разработок биспецифических активаторов, рекрутирующих Т-клетки, включают биспецифические Fc-молекулы, например, описанные в патентных документах US 2014/0302037, US 2014/0308285, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Тем не менее, избегание агрегации белка является основным препятствием при консервации. Агрегация белка представляет собой основное событие физической нестабильности белков и происходит из-за присущей им тенденции к минимизации термодинамически неблагоприятных взаимодействий между растворителем и остатками гидрофобного белка. Это особенно проблематично, поскольку обычно встречается во время процессов рефолдинга, очистки, стерилизации, доставки и хранения. Агрегация может возникать в таких условиях раствора, когда нативное состояние белка является весьма термодинамически благоприятным (например, нейтральный показатель pH и 37°C) и при отсутствии стрессов (Chi et al., *Pharm Res*, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, *Trends Biotechnol.* 2014 Jul; 32(7):372-80, Wang, *Int J Pharm.* 1999 Aug 20; 185(2):129-88, Mahler *J Pharm Sci.* 2009 Sep; 98(9):2909-34.).

Кроме того, конструкции на основе антитела с увеличенным периодом полужизни, такие как биспецифические активаторы, рекрутирующие Т-клетки, содержащие форму, удлиняющую период полужизни, такую как Fc-молекулы, должны быть защищены от агрегации белка и/или других явлений деградации. Агрегация белка представляет собой проблему, поскольку она может нарушать биологическую активность терапевтических белков. Более того, агрегация белков приводит к нежелательным органолептическим свойствам лекарственного продукта и снижает выход продукта из-за сложных стадий очистки, которые требуются для удаления агрегатов из конечного продукта. В последнее время также растет значение и доказательство того, что присутствие агрегированных белков (даже гуманизированных или полностью человеческих белков) может значительно увеличить риск развития у пациента иммунного ответа на активный мономер белка, что приводит к образованию нейтрализующих антител и лекарственной устойчивости, или к другим неблагоприятным побочным эффектам (Mahler *J Pharm Sci.* 2009 Sep; 98(9):2909-34.).

В целом, в литературных источниках сообщалось о нескольких попытках минимизировать агрегацию белка с помощью различных механизмов. Белки могут быть стабилизированы и таким образом защищены от образования агрегатов и других химических изменений путем модификации их первичной структуры, за счет чего увеличивается внутренняя гидрофобность и уменьшается внешнюю гидрофобность. Однако изменение белков посредством генной инженерии может привести к нарушению функциональности и/или к повышению иммуногенности. Другой подход фокусируется на диссоциации агрегатов (называемых "деагрегация") для восстановления функциональных нативных мономеров с использованием различных механизмов, таких как температура, давление, показатель pH и соли. В настоящее время белковые агрегаты удаляются в виде примесей в основном на стадиях заключительной очистки с помощью последовательности способов обработки. Однако в случаях высоких уровней примесей высо-

комолекулярных веществ (HMW) удаление значительного количества HMW-веществ не только приводит к существенной потере выхода, но также усложняет разработку надежного последующего процесса (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, No. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336).

Консервация состава конструкции на основе биспецифического антитела в широком диапазоне концентраций при сохранении его стабильности и обеспечении его количественного извлечения из контейнера для введения создает серьезные проблемы. В данной области существует потребность в оптимизированных фармацевтических композициях, которые обеспечивают улучшенную стабилизацию содержащих консерванты терапевтических белковых составов. Задача настоящего изобретения состоит в том, чтобы удовлетворить эту потребность как в отношении конструкций на основе биспецифического антитела без увеличенного периода полужизни, так и в отношении конструкций на основе биспецифического антитела с увеличенным периодом полужизни, таких как биспецифические активаторы, рекрутирующие Т-клетки, содержащие форму, удлиняющую период полужизни, такую как Fc-молекулы.

Краткое описание изобретения

Безопасное количественное и необязательно пролонгированное введение фармацевтических препаратов на основе белка, таких как конструкции на основе биспецифических антител, включая конструкции на основе биспецифических антител-рекрутеров Т-клеток, как правило осуществляемое внутривенно, является затруднительным. Поэтому в контексте настоящего изобретения предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая:

i. конструкцию на основе биспецифического антитела, связывающуюся с поверхностным антигеном клетки-мишени посредством первого связывающего домена и с Т-клеточным поверхностным антигеном CD3 посредством второго связывающего домена, где конструкция на основе цепей антитела присутствует в концентрации в диапазоне от 0,5 мкг/мл до 20 мг/мл, предпочтительно от 0,5 мкг/мл до 10 или 5 мг/мл;

ii. по меньшей мере один консервант, выбранный из бензилового спирта, хлорбутанола, фенола, мета-крезола, метилпарабена, феноксиэтанола, пропилпарабена и тиомерсала, в концентрации, эффективной для подавления роста микроорганизмов;

iii. разбавитель, в котором конструкция на основе биспецифического антитела является стабильной.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что конструкция на основе биспецифического антитела присутствует в концентрации в диапазоне, выбранном из перечня, состоящего из:

(a) от 0,5 до 200 мкг/мл при pH от 6,5 до 7,5, или

(b) от 0,5 до 1000 мкг/мл при pH от 4,0 до 6,0, или

(c) от 0,5 мкг до 2 мг в присутствии средства, стабилизирующего CD3-связывающий домен, предпочтительно цитрата, при pH от 4,0 до 7,5, или

(d) от 0,5 мкг до 20 мг, предпочтительно от 0,5 мкг до 10 или 5 мг/мл при pH от 4,0 до 7,5, где биспецифическое антитело содержит третий связывающий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнирный участок, домен CH2 и CH3, при этом указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом с помощью пептидного линкера, и при этом указанный третий связывающий домен содержит в порядке от амино- к карбоксильному концу:

шарнирный участок-CH2-CH3-линкер-шарнирный участок-CH2-CH3.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что фармацевтическая композиция содержит конструкцию на основе биспецифического антитела, которая представляет собой конструкцию на основе биспецифического одноцепочечного антитела.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что конструкция на основе биспецифического антитела присутствует в концентрации в диапазоне от 1,0 до 20 мкг/мл, или 1,0 до 10 мкг/мл, или 1,0 до 5 мкг/мл или 1,0 до 4 мкг/мл или 1,0 до 3 мкг/мл, или 1,0 до 2 мкг/мл или 1,0 до 1 мкг/мл или 1,5 до 5 мкг/мл или 1,5 до 4 мкг/мл или 1,5 до 3 мкг/мл, или 1,5 до 2 мкг/мл или 1,5 до 1 мкг/мл или 1,5 до 200 мкг/мл.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что по меньшей мере один консервант присутствует в концентрации в диапазоне от 0,001 до 1,0% вес./об.

Еще в большей степени в контексте настоящего изобретения предусматривается, что консервант присутствует в концентрации в диапазоне от 0,009 до 0,9% вес./об., предпочтительно от 0,11 до 0,9%, или от 0,5 до 0,75% вес./об. или от 0,6 до 0,74% вес./об.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что разбавитель представляет собой буфер, содержащий соль, выбранную из группы, состоящей из фосфата, ацетата, цитрата, сукцината и тартрата, и/или где буфер содержит гистидин, глицин, трис-глицин, трис или их смеси.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что разбавитель представляет собой буфер, выбранный из группы, состоящей из фосфата калия, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тартрата натрия и гистидина/гистидина-HCl или их смесей.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что разбавитель представляет собой буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от 0,1 до 150 мМ, предпочтительно в диапазоне от 0,25 до 50 мМ.

Еще в большей степени в контексте настоящего изобретения предусматривается, что разбавитель представляет собой буфер, содержащий цитрат в концентрации в диапазоне от 0,25 до 50 мМ.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что pH композиции присутствует в диапазоне от 4,0 до 8,0, предпочтительно в диапазоне от 4,0 до 5,0, или от 6,5 до 7,5 или предпочтительно pH составляет 7,0.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или несколько вспомогательных веществ, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита, сорбита, аргинина, лизина, полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188, плюроники и их комбинаций.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что фармацевтическая композиция дополнительно содержит полисорбат, предпочтительно полисорбат 80 и/или лизин-HCL.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что фармацевтическая композиция не содержит полисорбат, предпочтительно полисорбат 80, и/или лизин-HCL, если концентрация конструкции на основе биспецифического антитела составляет по меньшей мере 10 мкг/мл, предпочтительно 15 или 20 мкг/мл.

Еще в большей степени в контексте настоящего изобретения предусматривается, что первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела связывается с по меньшей мере одним поверхностным антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA и PSMA.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что первый связывающий домен содержит VH-участок, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-участок, содержащий CDR-L1, CDR-L2, и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 1, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 2, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 3, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 4, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 6,

(b) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 29, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 30, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 31, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 34, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 35, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 36,

(c) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 42, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 43, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 44, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 45, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 46, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 47,

(d) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 53, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 54, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 55, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 56, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 57, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 58,

(e) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 65, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 66, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 67, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 68, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 70,

(f) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 83, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 84, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 85, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 86, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 87, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 88,

(g) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 94, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 95, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 96, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 97, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 98, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 99,

(h) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 105, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 106, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 107, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 109, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 110, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 111,

(i) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 115, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 116, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 117, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 118, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 119, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 120,

(j) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 126, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 127, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 128, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 129, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 130, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 131,

(k) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 137, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 138, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 139, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 140, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 141, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 142,

(l) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 152, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 153, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 154, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 155, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 156, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 157, и

(m) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 167, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 168, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 169, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 107, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 171, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 172;

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что конструкция на основе

биспецифического антитела содержит фрагмент, увеличивающий время полужизни (HLE), предпочтительно домен scFc.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что фармацевтическая композиция представляет собой жидкость, лиофилизированную или замороженную жидкость.

Еще в большей степени в контексте настоящего изобретения предусматривается, что композиция содержит <5% мультимеров конструкции на основе биспецифического антитела, предпочтительно <1%.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что мультимеры являются димерами.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что композиция содержит <5% мультимеров конструкции на основе биспецифического антитела, предпочтительно <1% в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 4 дня, предпочтительно по меньшей мере 10 дней, более предпочтительно по меньшей мере 14 дней, при комнатной температуре.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что фармацевтической композицией заполняют пластиковый контейнер для введения, предпочтительно изготовленный из EVA, полиолефина и/или PVC.

Еще в большей степени в контексте настоящего изобретения предусматривается, что конструкция на основе биспецифического одноцепочечного антитела извлекается на по меньшей мере 90%, предпочтительно на по меньшей мере 95, 96, 97, 98 или даже на по меньшей мере 99% из разбавленного раствора, находящегося в пластиковом контейнере для введения, содержащего по меньшей мере один из буферов и/или вспомогательных веществ, указанных в пп.6-13.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 0,25 мМ цитрата, по меньшей мере 0,0125 мМ лизина и/или по меньшей мере 0,001% полисорбата 80 при pH от 6,5 до 7,5.

Дополнительно предусматривается, что фармацевтическая композиция в контексте настоящего изобретения представляет собой раствор для хранения, хранящийся при -50°C, предпочтительно при -40, -30 или -20°C.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что фармацевтическая композиция, предоставляемая в виде раствора для хранения, хранящегося при -50°C, предпочтительно при -40, -30 или -20°C, содержит биспецифическое антитело, содержащее третий связывающий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнирный участок, домен CH2 и CH3, где указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом с помощью пептидного линкера, и при этом указанный третий связывающий домен содержит в порядке от amino- к карбоксильному концу: шарнирный участок-CH2-CH3-линкер-шарнирный участок-CH2-CH3.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что конструкция на основе биспецифического антитела предоставляется в виде лиофилизата, причем лиофилизат предпочтительно содержит лиопротектор, буфер и/или поверхностно-активное вещество, и где лиофилизат восстанавливают разбавителем, содержащим консервант и предпочтительно содержащим буфер и/или вспомогательное вещество.

В контексте настоящего изобретения в особенности предусматривается, что фармацевтическая композиция хранится до применения в виде раствора, в виде раствора в замороженном состоянии или в виде лиофилизата, а затем вводится, необязательно после разбавления или восстановления, без необходимости в добавлении дополнительных вспомогательных веществ, выбранных из консервантов, стабилизаторов или поверхностно-активных веществ.

В контексте настоящего изобретения также предусматривается, что фармацевтическая композиция предназначена для применения при лечении злокачественного заболевания.

Еще в большей степени в контексте настоящего изобретения предусматривается способ лечения или снижения тяжести злокачественного заболевания, включающий стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением или полученной в соответствии со способом по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения предусматривается, что фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению вводится внутривенно, предпочтительно непрерывно, в течение 1-24 ч, предпочтительно 1-10 или 2-5 ч.

В контексте настоящего изобретения дополнительно предусматривается, что фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению вводится внутривенно непрерывно в течение 2-14 дней, предпочтительно в течение 2-10 дней, наиболее предпочтительно в течение 4-7 дней.

В контексте настоящего изобретения также предусмотрен набор, содержащий конструкцию на основе биспецифического антитела в виде лиофилизата, причем лиофилизат предпочтительно содержит лиопротектор, буфер и/или поверхностно-активное вещество и разбавитель, содержащий консервант и предпочтительно содержащий буфер и/или вспомогательное вещество согласно настоящему изобретению.

Описание фигур

Фиг. 1. Диаграмма стабильности в процентах высокомолекулярных (HMW) частиц конструкций на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, как определено при помощи SEC-HPLC, в случае кон-

сервантов, представляющих собой хлорбутанол, метилпарабен, фенол и тиомерсал, при 25°C и pH 4.

Фиг. 2. Диаграмма стабильности в процентах высокомолекулярных (HMW) частиц конструкций на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, как определено при помощи SEC-HPLC, в случае консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, в зависимости от концентрации конструкций на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 при 25°C и pH 7.

Фиг. 3. Диаграмма стабильности в процентах основного пика (A) и высокомолекулярных (HMW) частиц конструкций на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, как определено при помощи SEC-HPLC, в случае консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, в зависимости от концентрации консерванта при 25°C (B) и в зависимости от материала контейнера для введения (C). Диаграмма стабильности в процентах основного пика (мономера) конструкций на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, как определено при помощи SEC-HPLC, в случае консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, в зависимости от концентрации консерванта при 25°C и в зависимости от материала контейнера для введения (D).

Фиг. 4. Диаграмма денатурации конструкций на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 в концентрации 1 мг/мл в присутствии или в отсутствие консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, как определено при помощи флуоресцентной спектроскопии при pH 4.

Фиг. 5. Диаграммы роста микроорганизмов *E.coli* (A), *P. agugenosa* (B), *E.cloace* (C), *S.aureus* (D), *M.luteus* (E) и *S.albicans* (F) в составах, содержащих конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 и 0, 0,5, 0,6 или 0,7% бензинового спирта.

Фиг. 6. Стабилизационные эффекты цитрата в присутствии, где это применимо, бензинового спирта в отношении FAPα (A), домена, связывающего CD3, где пептид 108-112 в домене, связывающем CD3 (YISYW), соответствует пептиду 367-370 в FAPα (B), конструкций на основе биспецифического антитела к CD33×CD3, где пептид 364-368 в конструкциях на основе биспецифического антитела к CD33×CD3 (YISYW) соответствует пептиду 366-370 в FAPα (C), и конструкций на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3, где пептид 365-369 в конструкциях на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 (YISYW) соответствует пептиду 366-370 в FAPα (D). На фиг. 6E и F показано влияние цитрата и бензинового спирта в отдельности, а на фиг. 6G и H - в комбинации, при этом в каждом случае при концентрации конструкции на основе биспецифического антитела или отдельного домена 600 мкг/мл. Результаты одинаковы для домена, связывающего CD3, конструкций на основе биспецифического антитела к CD33×CD3, FAPα и конструкций на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3.

Фиг. 7. Хроматограмма с обращенной фазой после инъекций 50 мкл конструкции не предусматривающего HLE биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 с применением колонки C8 при разведении до 1 мкг/мл в 0-10% IVSS соответственно в 0,9% физиологическом растворе (A). Площадь пика для каждого элюированного образца конструкции на основе не предусматривающего HLE биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 строится в зависимости от концентрации IVSS в процентах [% IVSS], включенного в раствор для разведения (B).

Фиг. 8. Оцениваются влияние и необходимость наличия вспомогательных веществ на процент извлечения. Наблюдается в течение 24 ч при 25°C, при этом не требуется добавления комбинации цитрата, лизина и полисорбата 80 (комбинация, сокращенно обозначенная в данном документе как IVSS), чтобы обеспечить количественное извлечение конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, если концентрация конструкции составляет по меньшей мере 15 мкг/мл (8A). Средство, способствующее количественному извлечению, представляет собой полисорбат 80, в то время как вспомогательные вещества, не являющиеся поверхностно-активными веществами, не требуются для этого эффекта (8B). 0,002% полисорбата 80 обеспечивает извлечение конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 в пакете для внутривенного введения даже при очень низких концентрациях 1 и 0,05 мкг/мл (8C). 0,02% полисорбата 80 соответствует типичной концентрации в IVSS.

Фиг. 9. Консервант бензиловый спирт улучшает стабильность при замораживании фармацевтических композиций, содержащих конструкции на основе биспецифических антител к CD19×CD3, CD33×CD3, BCMA×CD3 и DLL3×CD3, содержащих третий домен (домен HLE) в концентрации 1 мг/мл при pH 4, как показано после хранения в течение 4 недель при -20°C.

Фиг. 10. Стабилизирующее действие консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, в отношении стабильности при замораживании является самым лучшим при концентрации выше 0,1% и обеспечивает снижение количества HMW-частиц даже при высоких концентрациях конструкции на основе биспецифического антитела, составляющей 5 мг/мл, как проиллюстрировано с использованием DLL3×CD3 при pH 4 после хранения при -20°C в течение 4 недель.

Подробное описание изобретения

Общая концепция, лежащая в основе настоящего изобретения, заключается в неожиданном открытии того, что стабильность фармацевтической композиции, как в жидком, так и в замороженном состоянии, содержащей конструкцию на основе биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением, улучшается путем добавления консерванта в жидкую фармацевтическую композицию, как

правило, в зависимости от концентрации конструкции на основе биспецифического антитела и консерванта. Неожиданно было обнаружено, что фармацевтическая композиция, которая содержит конструкцию на основе биспецифического антитела, которая предпочтительно представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела, такую как конструкция на основе антитела ViTE®, как содержащую третий домен, как определено в данном документе, т.е. являющуюся конструкцией на основе биспецифического антитела с увеличенным периодом полужизни (HLE), так и не содержащую его, если она присутствует в определенной концентрации от приблизительно 0,5 мкг/мл до 5 мг/мл, не только является стабильной в присутствии консерванта, но может даже быть стабилизирована этим консервантом. Это особенно удивительно, поскольку в данной области техники было известно, что консерванты, такие как бензиловый спирт, м-крезол и феноксиэтанол, способствуют агрегации белков, таких как антитела. Однако, в зависимости, например, от характеристики концентрации биспецифического антитела и необязательно от pH и присутствия дополнительного комплементарного стабилизирующего средства фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению является стабильной. При этом первый связывающий домен, как описано в данном документе (нацеливающий домен), имеет меньшее значение, поскольку стабилизирующее действие консерванта и необязательного дополнительного стабилизирующего комплементарного вспомогательного вещества, такого как цитрат, в первую очередь связано с взаимодействием со вторым связывающим доменом (CD3-связывающим доменом). Предпочтительно консервант может служить для физической и микробиологической стабилизации фармацевтической композиции во время хранения, например в замороженном состоянии и, после необязательной регулировки pH и/или разбавления, при введении. Следовательно, удобной представляется возможность использования одной и той же фармацевтической композиции, несмотря на необязательную регулировку pH, например от низкого pH, такого как 4,0-6,5, до нейтрального pH от 6,5 до 7,5, и разбавление для целей внутривенного введения. В целом, концентрация конструкции на основе биспецифического антитела, тем не менее, присутствует в диапазоне от 0,5 мкг/мл до 5 мг/мл или в некоторых обстоятельствах в диапазоне от 0,3 мкг/мл до 10, 20 или даже 30 мг/мл. Таким образом, фармацевтическая композиция, предусматривающая контейнеры, такие как пакеты для внутривенной инфузии, может только требовать замены с более длительными интервалами времени, такими как 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или даже 14 дней, из-за уменьшенной склонности к микробному загрязнению, что значительно повышает комфорт пациента.

Стабилизирующие и микробиологически эффективные консерванты включают без ограничения бензиловый спирт, хлорбутанол, метилпарабен, фенол и тиомерсал. Применимые консерванты для составления фармацевтических композиций в целом включают противомикробные средства (например, антибактериальные и противогрибковые средства), антиоксиданты, хелатирующие средства, инертные газы и т.п.; примеры представляют собой: хлорид бензалкония, бензойную кислоту, салициловую кислоту, тиомерсал, феноксиэтанол, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновую кислоту или пероксид водорода). Противомикробные консерванты представляют собой вещества, которые используются для продления срока годности лекарств за счет снижения микробной пролиферации. Консерванты, которые в частности применимы для составления фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают бензиловый спирт, хлорбутанол, фенол, мета-крезол, метилпарабен, феноксиэтанол, пропилпарабен тиомерсал. Структура и типичная концентрация для применения этих консервантов описаны в табл. 1 согласно Meyer et al., J Pharm Sci. 96(12), 3155.

Вышеупомянутые консерванты могут присутствовать в фармацевтической композиции в различных концентрациях. Например, бензиловый спирт может присутствовать в концентрации в диапазоне от 0,2 до 1,1% вес./об., предпочтительно от 0,5 до 0,9% вес./об., хлорбутанол в концентрации в диапазоне 0,3-0,5% вес./об., фенол в концентрации в диапазоне от 0,07 до 0,5% вес./об., метакрезол в концентрации в диапазоне от 0,17 до 0,32% вес./об. или тиомерсал в концентрации в диапазоне от 0,003 до 0,01% вес./об. Предпочтительные концентрации для метилпарабена находятся в диапазоне от 0,05 до 0,5% вес./об., для феноксиэтанола в диапазоне от 0,1 до 3% вес./об. и для пропилпарабена в диапазоне от 0,05 до 0,5% вес./об.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, консерванты, такие как бензиловый спирт, связываются с сайтами димеризации конструкций на основе биспецифических антител, таких как конструкция на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, в подходящей концентрации и, таким образом, уменьшают возможность образования димеров или других мультимеров. Таким образом, риск агрегации значительно снижается, например, в конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, BCMA×CD3, PSAM×CD3, CD33×CD3 или EGFRvIII×CD3. Это особенно удивительно, поскольку несколько областей развертывания позволяют предположить, что консервант, такой как бензиловый спирт, дестабилизирует мономер конструкции на основе биспецифического антитела, что должно привести к увеличению образования димеров/агрегатов. Однако некоторые из этих областей перекрываются с областями, которые, вероятно, связаны с образованием димера. Это региональное развертывание может нарушать образование димера с превращением обратно в мономер и общим стабилизирующим эффектом, пока концентрация биспецифических антител остается в определенных пределах.

В определенных вариантах осуществления буфер и/или вспомогательное вещество можно исполь-

зовать для увеличения стабильности конструкции на основе биспецифического антитела в присутствии консерванта в фармацевтической композиции для внутривенного введения согласно настоящему изобретению. Такое вспомогательное вещество упоминается в данном документе как комплементарное стабилизирующее средство, которое взаимодействует с CD3-связывающим доменом. В конкретных вариантах осуществления, например, при нейтральном pH и/или в случае конструкции на основе биспецифического антитела, не имеющей третьего связывающего домена, как описано в данном документе, и присутствии в фармацевтической композиции в более высокой концентрации, например выше 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мкг/мл, как правило при по меньшей мере 50 или 200 мкг/мл, такое комплементарное стабилизирующее средство может быть предпочтительным для обеспечения стабильности конструкции на основе биспецифического антитела в присутствии консерванта. Это может иметь место, например, для конструкций на основе биспецифических антител без третьего связывающего домена, как описано в данном документе, например конструкции на основе биспецифического антитела к CD33×CD3. Предполагается, что не требуются такие комплементарные стабилизирующие средства, как цитрат, если концентрация конструкции на основе биспецифического антитела составляет, например, 200, 150, 100 или 50 мкг/мл или ниже. Однако другие буферы/вспомогательные вещества, такие как полисорбат, например полисорбат 80, могут быть предпочтительными при концентрации конструкции на основе биспецифического антитела, составляющей 20, 15 или 10 мкг/мл, чтобы обеспечить количественное извлечение, т.е. потеря, например, из-за адсорбции к контейнеру для введения, является низкой, а извлеченное количество в процентах соответствует по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, или даже 99,5%. Это является особым преимуществом, поскольку избыточные вспомогательные вещества сохраняются как для практического использования (обработка), так и для медицинских целей (аллергии, побочные эффекты).

Низкое значение pH дополняет стабилизацию конструкции на основе биспецифического антитела консервантом также при более высокой концентрации, чем при нейтральном pH, поэтому фармацевтическая композиция, содержащая более высокие концентрации, такие как, по меньшей мере, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мкг/мл, является стабильной, т.е. предпочтительно демонстрирует низкое процентное значение концентрации НМВ, составляющее менее 5, 4, 3, 2, 1 или даже 0,5%.

Буферы и/или вспомогательные вещества, используемые в определенных вариантах осуществления для стабилизации конструкции на основе биспецифического антитела в присутствии консерванта, могут включать без ограничения цитрат, лизин и полисорбат 80. Любое из этих соединений по отдельности или в любой комбинации или сравнимое соединение в отношении его функции или структуры может быть использовано для получения стабилизирующего эффекта для конструкции на основе биспецифического антитела в присутствии консерванта согласно настоящему изобретению и/или для увеличения извлечения, а также в отсутствие консерванта, где последний не требуется для стабильности или микробиологической стабильности.

Буферы и/или вспомогательные вещества, используемые в определенных вариантах осуществления для стабилизации конструкции на основе биспецифического антитела в присутствии консерванта, неожиданно могут также и/или одновременно использоваться для улучшения извлечения конструкции на основе биспецифического антитела из (пластикового) контейнера, который используется для введения фармацевтической композиции пациенту. Поскольку лекарственные средства в соответствии с настоящим изобретением обычно вводят в очень низких концентрациях, например, адсорбция к контейнеру для введения, такому как пакет для внутривенной инфузии, может оказать существенное влияние на эффективное введение дозы. Следовательно, очень полезно, чтобы добавление таких буферов и/или вспомогательных веществ могло увеличить извлечение лекарственного средства из контейнера. Например, добавление комбинации цитрата, лизина и/или полисорбата 80 к фармацевтической композиции для введения пациенту может увеличить извлечение до 250% по сравнению с концентрацией лекарственного средства в отсутствие этих соединений. Относительно низкие количества, например по меньшей мере 0,25-1 мМ цитрата, 0,0125 М лизина и/или 0,001% полисорбата 80, могут быть достаточными для этого. Это означает, что пациенту следует вводить 1% раствора IVSS, что может быть достаточным. Еще лучшие результаты можно получить с более высокими количествами, такими как 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% IVSS. 4% IVSS могут быть предпочтительными. Однако не все компоненты IVSS могут потребоваться для получения эффекта улучшения извлечения. Например, полисорбат отдельно может значительно снизить адсорбцию лекарственного средства к контейнеру для введения. Указанный аспект настоящего изобретения способствует повышению надежности дозы для крайне сильнодействующих лекарственных средств, таких как конструкции на основе биспецифических антител. Следовательно, безопасность пациента также улучшается с помощью настоящего изобретения.

Однако свыше определенного порога такие буферы и/или вспомогательные вещества могут больше не требоваться для улучшения извлечения. Такой порог составляет, например, 10, 15 или 20 мкг/мл, предпочтительно 15 мкг/мл. Однако, как правило, предпочтительной является фармацевтическая композиция, которая содержит по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество в качестве вспомогательного вещества в отношении извлечения, такое как полисорбат, особенно полисорбат 80.

В другом аспекте настоящего изобретения, основываясь на результатах HDX, консерванты, такие

как бензиловый спирт, могут специфически дестабилизировать второй связывающий домен (домен, связывающий CD3) конструкций на основе биспецифического антитела согласно настоящему изобретению посредством (гидрофобного) взаимодействия, если конструкция на основе биспецифического антитела присутствует в количестве выше определенного порога, величина которого зависит от отсутствия или присутствия третьего связывающего домена согласно настоящему изобретению и/или pH фармацевтической композиции. Как правило, порог выше, если присутствует третий связывающий домен, как описано в данном документе, и/или pH является кислым, таким как pH 4,0-6,5. Не желая быть связанными какой-либо теорией, такая дестабилизация конструкции на основе биспецифического антитела может быть связана с повышенной конформационной динамикой, которая, в свою очередь, обычно может быть связана с пониженной стабильностью молекулы. Однако в данном документе было неожиданно обнаружено, что буферы и/или вспомогательные вещества, такие как цитрат-содержащие буферы или вспомогательные вещества, могут уравнивать этот дестабилизирующий эффект. Противостоящие эффекты между такими буферами и/или вспомогательными веществами и консервантом могут быть применимы ко всем конструкциям биспецифических антител (с учетом конформации), имеющим домен, связывающий CD3, который характеризуется CDR, представленными под SEQ ID NO: 18-23. Как было видно в отношении таких конструкций на основе биспецифических антител, при более низких концентрациях (например, ниже 50 мкг/мл) не требуется наличия стабилизирующего вспомогательного вещества в присутствии консерванта, такого как бензиловый спирт, тогда как консервант, такой как бензиловый спирт, может сам по себе неожиданно иметь стабилизирующие свойства благодаря подавлению или уменьшению количества димеров. Как правило, это не относится к более высоким концентрациям, например к более высокой концентрации, чем 200 мкг/мл, при условии, что фармацевтическая композиция имеет pH выше 6,5 и/или конструкция на основе биспецифического антитела содержит третий домен, как описано в данном документе. В случае, если дестабилизирующий эффект консерванта перевешивает его стабилизирующий эффект, основанный на концентрации конструкции на основе биспецифического антитела, в качестве дополнительного и комплементарного стабилизирующего вспомогательного вещества может использоваться такое вспомогательное вещество, как цитрат. Следовательно, добавление дополнительного стабилизирующего средства, такого как цитрат, обеспечивает более универсальное применение (диапазон концентраций) конструкций на основе биспецифических антител в присутствии консерванта, такого как бензиловый спирт.

В качестве альтернативы в контексте настоящего изобретения предусматривается, что фармацевтическая композиция предназначена, например, для инфузии в течение 7 дней с использованием бактериостатического средства в виде 0,9% хлорида натрия класса USP (содержащего 0,9% бензинового спирта). В частности, предусматривается, что этот вариант доступен для пациентов с массой тела, превышающей или равной определенному порогу по соображениям безопасности. Такой порог может составлять 20, 22 или 25 кг.

В конкретном варианте осуществления в контексте настоящего изобретения предусматривается, что конструкция на основе биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением поставляется во флаконах с однократной дозой в виде стерильного не содержащего консервантов лиофилизованного порошка от белого до грязно-белого цвета для внутривенного введения. Каждый флакон с однократной дозой конструкции на основе антитела к CD19×CD3 содержит 35 мкг конструкции на основе биспецифического антитела по настоящему изобретению, лимонной кислоты моногидрат (3,35 мг), лизина гидрохлорид (23,23 мг), полисорбат 80 (0,64 мг), трегалозы дигидрат (95,5 мг) и натрия гидроксид для доведения pH до 7,0. После восстановления с помощью 3 мл 0,9% хлорида натрия класса USP (содержащего 0,9% бензинового спирта) полученная концентрация составляет 12,5 мкг/мл конструкции на основе биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением. Стабилизатор для внутривенного раствора (IVSS) поставляется во флаконе с однократной дозой в виде стерильного не содержащего консервантов прозрачного раствора от бесцветного до слегка желтого цвета. Каждый флакон с однократной дозой стабилизатора для внутривенного раствора содержит лимонной кислоты моногидрат (52,5 мг), лизина гидрохлорид (2283,8 мг), полисорбат 80 (10 мг), натрия гидроксид для доведения pH до 7,0 и воду для инъекций.

В пределах настоящего изобретения, термин "стабильность" или "стабилизация" относится к стабильности фармацевтической композиции в целом и в частности к стабильности самого активного ингредиента (например, конструкции на основе биспецифического одноцепочечного антитела), а именно в ходе составления, наполнения, транспортировки, хранения и введения. Термины "стабильность" или "стабильный" в контексте фармацевтической композиции по настоящему изобретению и конструкции на основе биспецифического одноцепочечного антитела в частности относятся к уменьшению или предотвращению образования белковых агрегатов (HMWS). В частности, термин "стабильность" также относится к коллоидной стабильности конструкций на основе биспецифических (одноцепочечных) антител, содержащихся в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе. "Коллоидная стабильность" представляет собой способность коллоидных частиц (таких как белки) оставаться диспергированными в жидкостях в течение длительного периода времени (от дней до лет). Когда речь идет о стабильности в отношении консервации, используется термин микробиологическая стабильность.

Термин "(белковый) агрегат", применяемый в настоящем документе, в целом охватывает белковые фрагменты более высокой молекулярной массы, такие как "олигомеры" или "мультимеры" вместо требуемых определенных фрагментов (например, мономера). Термин применяется взаимозаменяемо в данном документе с терминами "высокомолекулярные соединения" и "НМWS". Белковые агрегаты, как правило, могут отличаться по размеру (в диапазоне от небольших (димеры) до крупных скоплений (невидимые или даже видимые частицы) и от нанометрового до микрометрового диапазона в диаметре), по морфологии (от примерно сферической до фибриллярной), по структуре белка (нативная или ненативная/денатурированная), по типу межмолекулярной связи (ковалентная или нековалентная), по обратимости и растворимости. Растворимые агрегаты охватывают диапазон размеров от примерно 1 до 100 нм, а белковые частицы охватывают невидимые (~0,1-100.м) и видимые (>100.м) диапазоны. Все вышеупомянутые типы белковых агрегатов обычно охватываются этим термином. Таким образом, термин "(белковый) агрегат" относится ко всем видам физической связанных или химически связанных ненативных соединений двух или более белковых мономеров.

Таким образом, термин "агрегация белка" или "ненативная агрегация" обозначает процесс(ы), посредством которых белковые молекулы собираются в комплексы, состоящие из двух или более белков, причем отдельные белки обозначены как мономер. Существует множество путей, приводящих к агрегации белка, которые могут быть вызваны широким разнообразием условий, включая температуру, механический стресс, такой как встряхивание и перемешивание, перекачивание, замораживание и/или размораживание и составление.

Повышение температуры ускоряет химические реакции, такие как окисление и дезамидирование белков, что в свою очередь может способствовать агрегации. Более высокая температура также напрямую влияет на конформацию белков на четвертичном, третичном и вторичном структурном уровнях и может привести к температурному разворачиванию, которое может способствовать агрегации. Температуры, указанные в настоящей заявке, обычно представляют собой температуру глубокого замораживания для длительного хранения чувствительных фармацевтических препаратов на основе белков (-70°C), обычную температуру замораживания (-20°C), температуру охлаждения (4°C), комнатную температуру (25°C) и физиологическую температуру (37°C).

Следовательно, было неожиданно обнаружить, что добавление консерванта в фармацевтическую композицию по настоящему изобретению может подавлять агрегацию в замороженном состоянии в отношении конструкций на основе биспецифических антител по настоящему изобретению. Такие конструкции на основе биспецифических антител могут, соответственно, храниться при -50, -40°C или предпочтительно даже при -30 или -20°C вместо -70°C без проявления агрегации в замороженном состоянии, т.е. присутствие агрегатов, таких как высокомолекулярные (НМW) частицы, остается ниже 1% или даже ниже 0,8, 0,6, 0,4% или даже ниже 0,3% в течение срока хранения по меньшей мере 1 месяц, такого как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 или 24 месяца. Преимущественно, энергию можно сберечь, если хранение при -70°C можно заменить хранением при более высокой температуре хранения при замораживании или объеме для хранения при -70°C можно отвести для других более деликатных предметов хранения. В то же время уменьшаются проблемы с транспортировкой, если для хранения фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением требуется всего лишь температура хранения при обычной заморозке вместо диапазона температур для глубокой заморозки. Не желая быть связанными теорией, агрегаты в замороженном состоянии, вероятно, образуются из-за гидрофобных взаимодействий между конкретными областями первого связывающего домена и второго связывающего домена конструкции на основе биспецифического антитела. Добавление консерванта, такого как бензиловый спирт, может поддерживать низкую агрегацию в замороженном состоянии, например менее 1% НМW-частиц по отношению к общему количеству конструкции на основе биспецифического антитела в (замороженном) растворе путем связывания с гидрофобным участком во втором связывающем домене конструкции на основе биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением. Это, в частности, справедливо для конструкций на основе биспецифических антител, содержащих третий домен согласно настоящему изобретению, такой как обеспечивающий HLE домен scFc.

Предпочтительно фармацевтическая композиция для хранения в замороженном состоянии имеет рН в диапазоне от 4,0 до 6,5, предпочтительно от 4,2 до 4,8. Перед введением пациенту рН можно увеличить для лучшей совместимости с внутривенным введением. Однако, как правило, фармацевтическую композицию можно использовать без необходимости в удалении конкретных компонентов, таких как вспомогательные вещества, перед введением. Соответственно, консервант, который функционировал в качестве физического стабилизирующего средства в течение, например, хранения в замороженном состоянии, может впоследствии действовать в качестве стабилизирующего средства в водимой жидкой фармацевтической композиции, необязательно после разбавления и/или корректировки рН, а также может служить в качестве консерванта для обеспечения микробиологической стабильности фармацевтической композиции в соответствии с настоящим изобретением.

Денатурация и агрегация белка могут происходить в ходе замораживания/размораживания из-за сложных физических и химических изменений, таких как образование новых границ раздела лед/раствор, адсорбция на поверхностях контейнера, криоконцентрирование белка и растворенных веществ, а

также изменения показателя рН из-за кристаллизации буферных компонентов.

Увеличение концентрации белка также может усиливать образование белковых агрегатов. При высоких концентрациях белка происходит макромолекулярное уплотнение, термин, применяемый для описания влияния высокой суммарной объемной нагрузки макромолекулярными растворенными веществами на свойства каждого макромолекулярного фрагмента в этом растворе. Согласно этой теории исключенного объема может быть благоприятна самосборка и, следовательно, потенциальная агрегация.

Известно, что противомикробные консерванты, такие как бензиловый спирт и фенол, обеспечивают в жидких составах стерильность в течение срока их годности и, кроме того, требуются в составах для многодозового введения и в определенных системах доставки лекарственных средств, например в шприц-ручках, мини-насосах и для местного применения. Сообщалось, что многие консерванты вызывают агрегацию белка, хотя основной механизм не совсем понятен. Предположили, что консерванты связываются с развернутыми состояниями белка и занимают их, которые склонны к агрегации.

Преимущественно фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно являются стабильными, то есть остаются свободными или по сути свободными от белковых агрегатов, даже когда подвергаются стрессу, в частности тепловому стрессу, хранению, поверхностному стрессу (такому как циклы замораживания/размораживания, вспенивание), концентрированию (путем ультра- и диализации) или смешиванию с органическими соединениями, такими как антимикробные консерванты. Предпочтительно фармацевтические композиции могут иметь сходные или даже улучшенные характеристики по сравнению с композициями, имеющими низкий показатель рН, которые были оценены в прилагаемых примерах.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой гомогенные растворы фармацевтических препаратов на основе белка, таких как диспергированные конструкции на основе мономерных биспецифических одноцепочечных антител с увеличенным периодом полужизни.

Специалисту будет понятно, что несмотря на то, что фармацевтическая композиция эффективно обеспечивает стабилизацию активного ингредиента (т.е. уменьшает или подавляет образование белковых агрегатов конструкции на основе биспецифического одноцепочечного антитела), некоторые агрегаты или конформеры иногда могут образовываться, однако без существенного ухудшения общей применимости фармацевтической композиции. В этом контексте "практически не содержит" агрегатов означает, что количество агрегатов остается ниже, чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% вес./об., в частности также под воздействием стрессовых условий окружающей среды, например как оценивается в прилагаемых примерах.

Способы определения присутствия растворимых и нерастворимых белковых агрегатов были, помимо прочего, рассмотрены Mahler et al., J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34. Образование растворимых белковых агрегатов можно оценить с помощью сверхвысокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии (SE-UPLC), как описано в прилагаемых примерах. SEC является одним из наиболее используемых аналитических методов обнаружения и количественного определения белковых агрегатов. Анализ SEC учитывает как размеры агрегатов, так и их количественную оценку. SEQ-UPLC обеспечивает селективное и быстрое разделение макромолекул на основе их формы и размера (гидродинамический радиус) в диапазоне молекулярных масс, составляющем приблизительно 5-1000 кДа.

Белковые растворы проявляют оптическое свойство, называемое опалесценцией или помутнением. Оптическое свойство раствора зависит от присутствующих частиц, которые рассеивают и поглощают свет. Белки являются природными коллоидами, и при этом помутнение водных составов зависит от концентрации белка, присутствия нерастворенных частиц, размера частиц и количества частиц на единицу объема. Помутнение может быть измерено с помощью спектроскопии в УФ- и видимой областях спектра в виде оптической плотности в диапазоне 340-360 нм и использоваться для обнаружения как растворимых, так и нерастворимых агрегатов.

Более того, проверка образцов визуальными средствами все еще является важным аспектом оценки белковых агрегатов. Визуальная оценка отсутствия или присутствия видимых агрегатов предпочтительно выполняется в соответствии с тестом 5 Немецкого кодекса лекарственных средств (DAB).

Как изложено в другом месте данного документа, предусматривается, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, скорее всего под действием низкого рН и необязательно дополнительных стабилизирующих средств, содержащихся в ней, способствует повышенной коллоидной стабильности конструкций на основе биспецифических одноцепочечных антител и, таким образом, демонстрирует пониженное разделение фаз жидкость-жидкость (LLPS) или даже его отсутствие. LLPS представляет собой термодинамически обусловленное событие, при котором однородный раствор белка разделяется на фазу с низким содержанием белка (обычно верхний слой) и фазу с высоким содержанием белка (обычно нижний слой) с понижением температур. LLPS обычно является полностью обратимым лишь за счет смешивания двух фаз и повышения температуры раствора. Возникновение LLPS связывают с притягивающими белок-белковыми взаимодействиями ближнего действия, что делает его показателем силы белок-белкового притяжения. Было обнаружено, что фармацевтические композиции, содержащие β -циклодекстрины в соответствии с настоящим изобретением, содержат более высокие концентрации

конструкции на основе биспецифического одноцепочечного антитела в фазе LLPS с низким содержанием белка по сравнению с фармацевтическими композициями, не содержащими β -циклодекстрины. Соответственно, предполагается, что фармацевтические композиции по настоящему изобретению демонстрируют пониженное LLPS или отсутствие LLPS по сравнению с контрольными и тем самым способствуют повышенной коллоидной стабильности конструкций на основе биспецифических одноцепочечных антител по настоящему изобретению. LLPS можно индуцировать, и содержание белка в разных фазах можно исследовать, как описано в прилагаемых примерах.

Стрессы, обусловленные окружающей средой, в частности из-за термической и/или химической денатурации, также могут привести к конформационным изменениям, которые в свою очередь могут способствовать агрегации. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что конструкции на основе биспецифических одноцепочечных антител также стабилизируются в отношении конформационных изменений, что оценено путем измерения интенсивности испускания собственной флуоресценции ароматических аминокислот. Таким образом, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно также уменьшает или ингибирует образование конформеров (т.е. ненативных, аномально уложенных белковых соединений).

Как объяснялось ранее, стабильная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит конструкцию на основе биспецифического одноцепочечного антитела, связывающуюся с поверхностным антигеном клетки-мишени с помощью первого связывающего домена и с Т-клеточным поверхностным антигеном CD3 с помощью второго связывающего домена.

Термин "конструкция на основе антитела" относится к молекуле, у которой структура и/или функция основаны/основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или целой молекуле иммуноглобулина, и/или является/являются полученными из доменов варибельного участка тяжелой цепи (VH) и/или варибельного участка легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Следовательно, конструкция на основе антитела способна связываться со своей специфической мишенью или своим антигеном. Кроме того, связывающий домен конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением предусматривает минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. Это минимальное требование может быть, например, определено присутствием по меньшей мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 участка VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 участка VH), предпочтительно из всех шести CDR. Альтернативным подходом для определения минимальных структурных требований к антителу является определение эпитопа антитела в пределах структуры специфической мишени соответственно, белкового домена белка-мишени, образующего участок эпитопа (кластер эпитопа), или путем указания специфического антитела, конкурирующего за эпитоп определенного антитела. Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с изобретением, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

Связывающий домен конструкции на основе антитела в соответствии с изобретением может, например, содержать вышеуказанные группы CDR. Предпочтительно CDR расположены в каркасном участке варибельного участка легкой цепи (VL) антитела и варибельного участка тяжелой цепи (VH) антитела; однако обязательно содержание их обоих. Fd-фрагменты, например, имеют два VH-участка и часто сохраняют в некоторой мере антиген-связывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Дополнительные примеры формата фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают (1) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент с доменами VL, VH, CL и CH1; (2) F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент с двумя Fab-фрагментами, соединенными дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (3) Fd-фрагмент с двумя VH и CH1 доменами; (4) Fv-фрагмент с доменами VL и VH из одного плеча антитела, (5) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который имеет домен VH; (6) выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), и (7) одноцепочечный Fv (scFv), причем последний является предпочтительным (например, получен из библиотеки scFv). Примеры вариантов осуществления конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением описаны, например, в WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Также в пределах определения "связывающий домен" или "домен, который связывает" находятся фрагменты полноразмерных антител, такие как VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')₂ или "r IgG" ("полуантитело"). Конструкции на основе антител согласно настоящему изобретению могут также содержать модифицированные фрагменты антител, также называемые вариантами антител, такие как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-застежка, scFab, Fab₂, Fab₃, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные di-scFv, тандемные tri-scFv, "мультитела", такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним варибельным доменом, содержащие только один варибельный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, которые специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V-участков или доменов.

В контексте данного документа термины "одноцепочечный Fv", "одноцепочечные антитела" или "scFv" относятся к содержащим одну полипептидную цепь фрагментам антител, которые содержат ва-

риабельные участки как из тяжелой, так и из легкой цепей, но в которых отсутствуют константные участки. Обычно одноцепочечное антитело дополнительно содержит полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, который обеспечивает возможность образования необходимой структуры, которая позволяет связывать антиген. Одноцепочечные антитела подробно обсуждаются Pluckthun в *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994). Известны различные способы создания одноцепочечных антител, включая описанные в патентах США №№ 4694778 и 5260203; в международной публикации заявки на патент № WO 88/01649; Bird (1988) *Science* 242:423-442; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Ward et al. (1989) *Nature* 334:54454; Skerra et al. (1988) *Science* 242:1038-1041. В конкретных вариантах осуществления одноцепочечные антитела также могут быть биспецифическими, мультиспецифическими, человеческими и/или гуманизированными и/или синтетическими.

Кроме того, определение термина "конструкция на основе антитела" включает моновалентные, бивалентные и поливалентные/мультивалентные конструкции и, следовательно, биспецифические конструкции, специфически связывающиеся только с двумя антигенными структурами, а также полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связывают более двух антигенных структур, например, трех, четырех или более, через определенные связывающие домены. Более того, определение термина "конструкция на основе антитела" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы состоящие из более чем одной полипептидной цепи, цепи которых могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотримеры или гомоолигомеры), либо разными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры для определенных выше антител и вариантов или их производных описаны, помимо прочего, в Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) и *Using Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2nd ed. 2010 и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press 2009.

Используемый в данном документе термин "биспецифический" относится к конструкции на основе антитела, которая является "по меньшей мере биспецифической", т.е. она содержит по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (в данном документе: поверхностный антиген клетки-мишени), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (в данном документе: CD3). Соответственно, конструкции на основе антител в соответствии с настоящим изобретением имеют специфичность в отношении по меньшей мере двух разных антигенов или мишеней. Например, первый домен предпочтительно не связывается с внеклеточным эпитопом CD3ε одного или нескольких видов, как описано в данном документе. Термин "поверхностный антиген клетки-мишени" относится к антигенной структуре, которая экспрессируется клеткой и которая присутствует на клеточной поверхности, поэтому она доступна для конструкции на основе антитела, описанной в данном документе. Он может являться белком, предпочтительно внеклеточной частью белка, или углеводной структурой, предпочтительно углеводной структурой белка, такой как гликопротеин. Предпочтительно он является опухолевым антигеном. Термин "конструкция на основе биспецифического антитела" по настоящему изобретению также охватывает мультиспецифические конструкции на основе антител такие как триспецифические конструкции на основе антител, где последние включают три связывающие домена, или конструкции с более чем тремя (например, четырьмя, пятью, ...) видами специфичности.

Учитывая, что конструкции на основе антител в соответствии с изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не присутствуют в природе и выражено отличаются от продуктов природного происхождения. Следовательно, конструкция на основе "биспецифического" антитела или иммуноглобулин является искусственным гибридным антителом или иммуноглобулином по меньшей мере с двумя определенными связывающими участками с разными специфичностями. Конструкции на основе биспецифических антител можно получать с помощью разных способов, включающих слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990).

По меньшей мере два связывающих домена и переменные домены (VH/VL) конструкции на основе антитела согласно данному изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" согласно настоящему изобретению предусматривает аминокислотную последовательность, с помощью которой аминокислотные последовательности одного (переменного и/или связывающего) домена и другого (переменного и/или связывающего) домена конструкции на основе антитела по настоящему изобретению соединены друг с другом. Пептидные линкеры также можно использовать для слияния третьего домена с другими доменами конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. Важной технической характеристикой такого пептидного линкера является то, что у него отсутствует полимеризационная активность. К подходящим пептидным линкерам относятся описанные в патентах США 4751180 и 4935233 или WO 88/09344. Пептидные линкеры также можно использовать для присоединения других доменов, или модулей, или участков (таких как домены, удлиняющие время полужизни) к конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению.

Конструкции на основе антител по настоящему изобретению представляют собой предпочтительно "конструкции на основе антител, полученные *in vitro*". Этот термин относится к конструкции на основе антитела согласно определению выше, где весь переменный участок или его часть (например, по меньшей мере один CDR) получен в ходе отбора на неиммунных клетках, например, с помощью фагового дисплея *in vitro*, белкового чипа или любого другого способа, в котором кандидатные последовательности можно тестировать в отношении их способности к связыванию с антигеном. Предпочтительно этот термин исключает последовательности, созданные исключительно путем геномной перестройки в иммунной клетке животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, полученное с использованием технологии рекомбинантной ДНК или геномной инженерии.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или конструкция на основе моноклонального антитела, применяемый в данном документе, относится к антителу, полученному из практически однородной популяции антител, то есть отдельные антитела, образующие популяцию, являются идентичными за исключением возможных существующих в природе мутаций и/или посттрансляционных модификаций (например, изомеризаций, амидирований), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, будучи направленными против одного антигенного участка или одной детерминанты на антигене, в противоположность препаратам традиционных (поликлональных) антител, которые, как правило, содержат разные антитела, направленные против разных детерминант (или эпитопов). В дополнение к их специфичности, моноклональные антитела имеют преимущество в том, что они синтезируются гибридомой в культуре, не загрязненной другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на природу антитела как полученного из практически однородной популяции антител, и его не следует толковать как требующий получения антитела с помощью какого-либо конкретного способа.

Для получения моноклональных антител можно применять любую методику, обеспечивающую получение антител с помощью непрерывных культур линий клеток. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению, можно получать с помощью гибридомного способа, впервые описанного в Koehler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), или можно получать с помощью способов рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных методик получения человеческих моноклональных антител включают методику триомы, методику человеческой В-клеточной гибридомы (Kozbor, *Immunology Today* 4 (1983), 72) и методику EBV-гибридомы (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Гибридомы затем подвергают скринингу с применением стандартных способов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и анализ, основанный на поверхностном плазмонном резонансе (BIAcore™), для идентификации одной или нескольких гибридом, продуцирующих антитело, специфично связывающееся с определенным антигеном. В качестве релевантного антигена можно применять любую форму определенного антигена, например рекомбинантный антиген, существующие в природе формы, любые его варианты или фрагменты, а также его антигенный пептид. Поверхностный плазмонный резонанс, используемый в системе BIAcore, можно использовать для повышения эффективности фаговых антител, связывающихся с эпитопом поверхностного антигена клетки-мишени, (Schiefer, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13).

Другой иллюстративный способ получения моноклональных антител включает скрининг библиотек экспрессируемых белков, например, библиотек фагового дисплея или рибосомного дисплея. Фаговый дисплей описан, например, в Ladner et al., патенте США № 5223409; Smith (1985) *Science* 228:1315-1317, Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

В дополнение к применению дисплейных библиотек релевантный антиген можно применять для иммунизации животного, например, грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте осуществления животное, отличное от человека, содержит по меньшей мере часть гена иммуноглобулина человека. Например, можно создавать линии мышей с дефицитом продуцирования мышинных антител, имеющих крупные фрагменты локусов генов Ig (иммуноглобулина) человека. При помощи гибридомной технологии можно получать и отбирать антиген-специфичные моноклональные антитела, получаемые из генов с требуемой специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green et al. (1994) *Nature Genetics* 7:13-21, патентные документы US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело можно получить от отличного от человека животного, а затем можно получить модифицированное, например, гуманизированное, деиммунизированное, химерное, антитело с применением методик рекомбинантных ДНК, известных в данной области техники. Примеры модифицированных конструкций на основе антител включают гуманизированные варианты не являющихся человеческими антител, "афинно зрелые" антитела (см., например, Hawkins et al. *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) и мутантные антитела с измененной эффекторной функцией(функциями) (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, при котором В-клетки продуцируют антитела с повышенной аффинностью к антигену в ходе иммунного ответа. При повторном воз-

действии того же антигена организм-хозяин будет продуцировать антитела возрастающими показателями аффинности. Аналогично природному образцу, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и селекции. Созревание аффинности *in vitro* успешно применяется для оптимизации антител, конструкций на основе антител и фрагментов антител. Случайные мутации внутри CDR вводятся с применением ионизирующего излучения, химических мутагенов или ПНР с внесением ошибок. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено путем шаффлинга цепей. Два или три цикла мутации и селекции с применением таких методик дисплея, как фаговый дисплей, обычно приводят к появлению фрагментов антител с аффинностями в низком наномолярном диапазоне.

Предпочтительный тип аминокислотного замещающего варианта конструкций на основе антител включает замену одного или более остатков гипервариабельного участка исходного антитела (например, гуманизированного или антитела человека). Как правило, полученные в результате варианты, отобранные для дополнительной разработки, должны иметь улучшенные биологические свойства относительно родительского антитела, из которого они получены. Удобный способ создания таких вариантов с заменами включает созревание аффинности с применением фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельного участка (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутациям с получением всех возможных аминокислотных замен в каждом участке. Варианты антител, полученные таким образом, представлены в моновалентном виде на частицах нитевидного фага в виде молекул слияния с продуктом гена III M13, упакованных в каждой частице. Затем фаг-дисплейные варианты подвергаются скринингу в отношении их биологической активности (например, аффинности связывания,) как раскрыто в данном документе. Чтобы определить кандидатные участки гипервариабельного участка для проведения модификации, можно проводить аланин-сканирующий мутагенез для определения остатков гипервариабельного участка, которые вносят существенный вклад в связывание антигена. Как альтернатива или дополнительно целесообразным может быть проведение анализа кристаллической структуры комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между связывающим доменом и, например, поверхностным антигеном клетки-мишени человека. Такие контактирующие остатки и соседние остатки являются кандидатами для замены согласно методикам, разработанным в данном документе. После создания таких вариантов панель вариантов подвергается описанному в данном документе скринингу, а антитела с превосходящими свойствами в одном или нескольких релевантных анализах отбирают для дополнительной разработки.

Моноклональные антитела и конструкции на основе антител по настоящему изобретению, в частности, включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученных из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи(цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также к фрагментам таких антител при условии, что они проявляют требуемую биологическую активность (патент США № 4816567; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Химерные антитела, представляющие интерес, в данном документе включают "приматизированные" антитела, содержащие антиген-связывающие последовательности вариабельных доменов, полученные от отличного от человека примата (например, маргышковой обезьяны, человекообразной обезьяны и т.п.), и последовательности константных участков человека. Были описаны разнообразные подходы к получению химерных антител. См. например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature 314:452, 1985; Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494; и GB 2177096.

Антитело, конструкция на основе антитела, фрагмент антитела или вариант антитела можно также модифицировать путем специфической делеции Т-клеточных эпитопов человека (способом, называемым "деиммунизация") посредством способов, раскрытых в патентных документах WO 98/52976 или WO 00/34317. Вкратце, вариабельные домены тяжелой и легкой цепи антитела можно проанализировать в отношении наличия пептидов, которые связываются с МНС класса II; эти пептиды представляют потенциальные Т-клеточные эпитопы (по определению в WO 98/52976 и WO 00/34317). Для выявления потенциальных Т-клеточных эпитопов можно применять подход компьютерного моделирования, называемый "протягиванием пептидов", и, кроме того, в базе данных пептидов, связывающихся с молекулами МНС класса II человека, можно осуществить поиск мотивов, присутствующих в последовательностях VH и VL, как описано в WO 98/52976 и WO 00/34317. Эти мотивы связываются с любым из 18 основных DR-аллотипов МНС класса II и, таким образом, составляют потенциальные Т-клеточные эпитопы. Выявленные потенциальные Т-клеточные эпитопы можно устранить посредством замены небольшого количества аминокислотных остатков в вариабельных доменах или предпочтительно посредством одиночных аминокислотных замен. Обычно производят консервативные замены. Часто, но не исключительно, может использоваться аминокислота, обычно присутствующая в данном положении в последовательностях антител человеческой зародышевой линии. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в Tomlinson, et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. et al. (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; и Tomlinson et al. (1995) EMBO J. 14: 14:4628-4638. Директория V BASE представляет исчерпывающую директорию последовательностей вариабельных участков человеческого иммуноглобу-

лина (составлена Tomlinson, L.A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Кембридж, Великобритания). Эти последовательности можно применять в качестве источника человеческих последовательностей, например, для каркасных участков и CDR. Также можно использовать консенсусные человеческие каркасные участки, например, описанные в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкции на основе антител, их варианты или фрагменты (такие как Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антиген-связывающие последовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины преимущественно с последовательностями человека, которые содержат минимальное количество последовательности (последовательностей), полученных из иммуноглобулина, не являющегося иммуноглобулином человека. Гуманизированные антитела по большей части представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из гипервариабельного участка (также CDR) реципиента заменены остатками из гипервариабельного участка антитела от отличных от человека (например, грызуна) видов (антитело-донор), такого как мышь, крыса, хомяк или кролик, которое обладает требуемой специфичностью, аффинностью и способностью к связыванию. В некоторых случаях остатки Fv каркасного участка (FR) человеческого иммуноглобулина замещены соответствующими остатками, не являющимися человеческими. Кроме того, "гуманизированные антитела", применяемые в данном документе, могут также содержать остатки, не выявленные ни в антителе-реципиенте, ни в антителе-доноре. Эти модификации производят для дополнительного улучшения и оптимизации эффективности антител. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, из человеческого иммуноглобулина. Подробнее см. Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты можно создавать путем замены последовательностей вариабельного домена Fv, не участвующих непосредственно в связывании с антигеном, эквивалентными последовательностями вариабельных доменов Fv человека. Типовые способы получения гуманизированных антител или их фрагментов предоставлены в Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi et al. (1986) *BioTechniques* 4:214; и в патентных документах US 5585089; US 5693761; US 5693762; US 5859205; и US 6407213. Эти способы включают выделение последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих целые вариабельные домены Fv иммуноглобулина или их части по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи, манипуляции с ними и их экспрессию. Такие нуклеиновые кислоты можно получать из гибридомы, продуцирующей антитело к предварительно определенной мишени, описанной выше, а также из других источников. Рекомбинантную ДНК, кодирующую молекулу гуманизированного антитела, можно затем клонировать в подходящий вектор экспрессии.

Гуманизированные антитела также можно получать, используя трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены тяжелой и легкой цепей человека, но не способны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина мыши. Winter описывает иллюстративный способ перевивания CDR, который можно применять для получения гуманизированных антител, описанных в данном документе (патент США № 5225539). Каждый CDR конкретного антитела человека может быть по меньшей мере частично заменен CDR, не являющимся CDR человека, или только некоторые CDR могут быть заменены CDR, не являющимся CDR человека. Необходимо только заменить количество CDR, требующееся для связывания гуманизированного антитела с предварительно определенным антигеном.

Гуманизированное антитело можно оптимизировать путем введения консервативных замен, замен консенсусными последовательностями, замен остатками из конфигурации зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулинов можно получать согласно любой из нескольких методик, известных в данной области техники, (например, Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 7308-7312, 1983; Kozbor et al., *Immunology Today*, 4: 7279, 1983; Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 92: 3-16, 1982, и EP 239 400).

Термин "антитело человека", "конструкция на основе антитела человека" и "связывающий домен человека" включает антитела, конструкции на основе антител и связывающие домены с участками антител, такими как вариабельный и константный участки или домены, которые соответствуют в основном последовательностям иммуноглобулинов зародышевой линии, известных в данной области техники, включая, например, описанные в Kabat et al. (1991) (*loc. cit.*). Антитела человека, конструкции на основе антител или связывающие домены по настоящему изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями генов иммуноглобулинов человека в конфигурации зародышевой линии (например, в результате мутаций, вводимых посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматических мутаций *in vivo*), например в CDR, и, в частности, в CDR3. Человеческие антитела, конструкции на основе антител или связывающие домены могут содержать по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять или более положений, замещенных аминокислотным остатком, не кодируемым последовательностью иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Определение антител человека, конструкций на основе антител и связывающих доменов, используемое в данном документе, однако также рассматривает "полные антитела человека", которые включают только не являющиеся искусственными и/или генетически измененные последовательности собственно антител

человека, которые могут быть получены с применением методик или систем, такой как Xenomouse. Предпочтительно "полное антитело человека" не включает аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии.

В некоторых вариантах осуществления, конструкции на основе антител по настоящему изобретению являются "выделенными" или "практически чистыми" конструкциями на основе антител. "Выделенный" или "практически чистый", применяемое для описания конструкций на основе антител, раскрытых в данном документе, означает конструкцию антитела, которая была идентифицирована, отделена и/или извлечена из компонента ее среды получения. Предпочтительно конструкция на основе антитела не связана или по сути не связана со всеми остальными компонентами среды, в которой она продуцируется. Примеси в среды, в которой происходит продуцирование, такие как образующиеся из рекомбинантных трансфицированных клеток, представляют собой материалы, которые, как правило, мешают диагностическому или терапевтическому применению полипептида, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Конструкции на основе антител могут, например, представлять собой по меньшей мере приблизительно 5%, или по меньшей мере приблизительно 50% по весу от общего белка в заданном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5% до 99,9% по весу от общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Полипептид можно получать в существенно большей концентрации посредством применения индуцируемого промотора или промотора, обеспечивающего высокий уровень экспрессии, так, чтобы он продуцировался при повышенном уровне концентрации. Данное определение включает получение конструкции на основе антитела в широком ряде организмов и/или клеток-хозяев, которые известны в данной области техники. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения конструкцию на основе антитела очищают (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (2) до гомогенности по SDS-PAGE в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением окрашивания кумасси синим или предпочтительно серебром. При этом обычно конструкцию на основе антитела получают с помощью по меньшей мере одной стадии очистки.

Термин "связывающий домен" применительно к настоящему изобретению характеризует домен, который (специфически) связывается с/взаимодействует с/распознает указанный эпитоп-мишень или указанный участок молекул-мишеней (антигенов), например CD33 и CD3 соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего, например, CD33), и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего CD3), основана/основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина и/или является/являются полученными из доменов переменного участка тяжелой цепи (VH) и/или переменного участка легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Предпочтительно первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-участка) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-участка). Второй связывающий домен предпочтительно также предусматривает минимальные структурные требования антитела, которые обеспечивают связывание мишени. Более предпочтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VL-участка) и/или три CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 VH-участка). Подразумевается, что первый и/или второй связывающий домен производят или получают с помощью способов фагового дисплея или скрининга библиотек, а не путем прививания последовательностей CDR из уже существующего (моноклонального) антитела в каркас.

В соответствии с данным изобретением связывающие домены имеют форму одного или нескольких полипептидов. Такие полипептиды могут содержать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические перекрестно-сшивающие средства, такие как глутаральдегид). "Белки" (в том числе их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты, и пептиды, обычно имеющие менее 30 аминокислот) содержат две или более аминокислот, соединенных друг с другом ковалентной пептидной связью (с образованием в результате цепи аминокислот).

Термин "полипептид", применяемый в данном документе, описывает группу молекул, содержащих обычно более 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е. содержащие более одной молекулы полипептида. Молекулы полипептидов, образующие такие димеры, тримеры и т.п., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры высшего порядка таких мультимеров, следовательно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.п. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей существующей в природе форме содержит две идентичные легкие полипептидные цепи и две идентичные тяжелые полипептидные цепи. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к модифицированным естественным образом пептидам/полипептидам/белкам, где модификация осуществляется посредством, например, посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. "Пептид", "полипептид" или "белок", упомянутый в данном документе, может быть также модифицирован химическим путем, как например, посредством пегилирования. Такие модификации хорошо известны в данной области техники и описаны ниже в данном документе.

Предпочтительно связывающий домен, который связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени, и/или связывающий домен, который связывается с CD3ε, является/являются связывающим(и) доменом(ами) человека. Антитела и конструкции на основе антител, содержащие по меньшей мере один связывающий домен человека, позволяют избежать ряда проблем, связанных с антителами или конструкциями на основе антител, которые имеют переменные и/или константные участки, не относящиеся к человеческим, такие как участки от грызунов (например, мыши, крысы, хомяка или кролика). Присутствие таких белков из организма грызуна может приводить к быстрому выведению антител или конструкций на основе антител или может приводить к выработке иммунного ответа на антитело или конструкцию на основе антитела у пациента. Чтобы избежать применения полученных от грызунов антител или конструкций на основе антител, можно создавать человеческие или полностью человеческие антитела/конструкции на основе антител путем введения в организм грызуна функциональных участков человеческого антитела так, чтобы у грызуна продуцировались полностью человеческие антитела.

Возможность клонировать и воссоздавать локусы человека размером порядка миллиона пар оснований в YAC и вводить их в мышиную зародышевую линию обеспечивает эффективный подход для изучения функциональных компонентов очень крупных или грубо картированных локусов, а также для создания полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, применение такой технологии для замены мышинных локусов их человеческими эквивалентами может обеспечить уникальную информацию об экспрессии и регуляции генных продуктов человека во время развития, их взаимодействия с другими системами и их роли в индуцировании и прогрессировании заболеваний.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Введение локусов человеческого иммуноглобулина (Ig) в организм мышей, у которых были инактивированы эндогенные гены Ig, предоставляет возможность изучения механизмов, лежащих в основе программируемой экспрессии и сборки антител, а также их роли в развитии В-клеток. Кроме того, такая стратегия может обеспечить идеальный источник для получения полностью человеческих моноклональных антител (mAb) - ключевой точки на пути к созданию терапевтических средств на основе антител для болезней человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции на основе антител сведут к минимуму иммуногенные и аллергические ответы, присущие мышинным или полученным от мышей mAb, и, следовательно, повысят эффективность и безопасность вводимых антител/конструкций на основе антител. Можно ожидать, что применение полностью человеческих антител или конструкций на основе антител обеспечит существенное преимущество в лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, таких как воспаление, аутоиммунные реакции и рак, при которых требуются повторные введения соединений.

Один подход в направлении этой цели состоял в конструировании мышинных линий с дефицитом продуцирования мышинных антител с большими фрагментами локусов человеческого Ig в ожидании, что такие мыши будут вырабатывать большой репертуар человеческих антител в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты человеческого Ig должны сохранять широкое разнообразие переменных генов, а также надлежащее регулирование продуцирования и экспрессии антитела. При применении мышинового аппарата для расширения разнообразия и отбора антител и отсутствии иммунологической толерантности к человеческим белкам, воспроизведенный репертуар человеческих антител в этих мышинных штаммах должен привести к получению высокоаффинных антител к любому представляющему интерес антигену, включая человеческие антигены. Используя гибридную технологию, можно легко получать и проводить отбор антиген-специфических человеческих mAb с необходимой специфичностью. Эта общая стратегия была продемонстрирована в связи с созданием первых линий мышей XenoMouse (см. Green et al., *Nature Genetics* 7:13-21 (1994)). Были сконструированы линии XenoMouse с дрожжевыми искусственными хромосомами (YAC), содержащими фрагменты размером 245 т.п. и 190 т.п. конфигурации зародышевой линии человеческого локуса тяжелой цепи и локуса каппа легкой цепи соответственно, которые содержали внутренние последовательности переменного и константного участков. Содержащие человеческий Ig YAC, оказались совместимыми с мышинной системой в отношении как перестройки, так и экспрессии антител, и были способны заменять инактивированные гены мышинового Ig. Это было продемонстрировано их способностью индуцировать развитие В-клеток, продуцировать человеческий репертуар взрослого типа полностью человеческих антител и продуцировать антиген-специфические человеческие mAb. Эти результаты также позволяют предположить, что введение более крупных частей человеческих локусов Ig, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных участков человеческого Ig, может практически повторять полный репертуар, который характерен для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al. Была недавно расширена до введения более приблизительно 80% репертуара антител человека путем введения фрагментов YAC размером порядка миллиона пар оснований конфигурации зародышевой линии человеческого локуса тяжелой цепи и локуса каппа легкой цепи соответственно. См. Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и заявку на патент США с порядковым № 08/759620.

Получение мышей XenoMouse дополнительно обсуждается и описывается в заявках на патент США, порядковый № 07/466008, порядковый № 07/610515, порядковый № 07/919297, порядковый № 07/922649, порядковый № 08/031801, порядковый № 08/112848, порядковый № 08/234145, порядковый

№ 08/376279, порядковый № 08/430938, порядковый № 08/464584, порядковый № 08/464582, порядковый № 08/463191, порядковый № 08/462837, порядковый № 08/486853, порядковый № 08/486857, порядковый № 08/486859, порядковый № 08/462513, порядковый № 08/724752 и порядковый № 08/759620; и патентах США № 6162963; 6150584; 6114598; 6075181 и 5939598, и патентах Японии № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие, в том числе GenPharm International, Inc., использовали подход "минилокус". В подходе минилокуса локус экзогенного Ig имитируют путем включения частей (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или более генов VH, один или более генов DH, один или более генов JH, мю константный участок и второй константный участок (предпочтительно гамма константный участок) составляют в конструкцию для вставки в организм животного. Этот подход описан в патенте США № 5545807 авторства Surani et al. и патент США № 5545806; 5625825; 5625126; 5633425; 5661016; 5770429; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299 и 6255458, каждый авторства Lonberg и Kay, патентах США № 5591669 и 6023010 под авторством Krimpenfort и Berns, патентах США № 5612205; 5721367; и 5789215 авторства Berns et al. и патент США № 5643763 авторства Choi и Dunn, и заявке на патент США от GenPharm International, порядковый № 07/574748, порядковый № 07/575962, порядковый № 07/810279, порядковый № 07/853408, порядковый № 07/904068, порядковый № 07/990860, порядковый № 08/053131, порядковый № 08/096762, порядковый № 08/155301, порядковый № 08/161739, порядковый № 08/165699, порядковый № 08/209741. Также см. EP 0546073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. См. дополнительно Taylor et al. (1992), Chen et al. (1993), Tuailon et al. (1993), Choi et al. (1993), Lonberg et al. (1994), Taylor et al. (1994) и Tuailon et al. (1995), Fishwild et al. (1996).

Kirin также продемонстрировал создание человеческих антител с использованием мышей, которым вводили крупные участки хромосом или целые хромосомы посредством опосредованного микроклетками слияния. Смотрите заявки на Европейский патент № 773288 и 843961. Xenex Biosciences разрабатывают технологию для потенциального создания человеческих антител. В этой технологии мышей SCID восстанавливают с помощью человеческих лимфатических клеток, например, В- и/или Т-клеток. Затем мышей иммунизируют антигеном и у них может индуцироваться иммунный ответ на этот антиген. Смотрите патенты США № 5476996; 5698767 и 5958765.

Ответы человеческого антимышиного антитела (НАМА) привели в данной отрасли к созданию химерных или иным способом гуманизованных антител. При этом ожидается, что будут наблюдаться ответы некоторых человеческих антител к химерам (НАСА), в частности, при постоянном или многодозовом применении антитела. Таким образом, было бы желательно предоставить конструкции на основе антител, включающие человеческий связывающий домен, связывающий поверхностный антиген клетки-мишени, и человеческий связывающий домен, связывающий CD3ε, с тем чтобы ослабить нежелательные явления и/или эффекты ответа НАМА или НАСА.

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "направлен (специфически) на" и "(специфически) вступает в реакцию с" означают в соответствии с данным изобретением, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с данным эпитопом или с данным участком-мишенью на молекулах-мишенях (антигенах), в данном документе: поверхностным антигеном клетки-мишени и CD3ε соответственно.

Термин "эпитоп" относится к участку антигена, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело или иммуноглобулин или производное, фрагмент или вариант антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным, и поэтому термин "эпитоп" иногда также упоминается в данном документе как "антигенная структура" или "антигенная детерминанта". Таким образом, связывающий домен представляет собой "участок взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимают как определяющее "специфичное распознавание".

"Эпитопы" могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, размещенными рядом при укладке белка в третичную структуру. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, где первичная аминокислотная последовательность образует распознаваемый эпитоп. Линейный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4, и чаще по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например, от приблизительно 8 до приблизительно 10 аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп", в отличие от линейного эпитопа, представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот, образующая эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознаваемого эпитопа (например, эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот не обязательно распознается связывающим доменом). Обычно конформационный эпитоп содержит увеличенное количество аминокислот по сравнению с линейным эпитопом. В отношении распознавания конформационных эпитопов связывающий домен распознает трехмерную

структуру антигена, предпочтительно пептид или белок или его фрагмент (в контексте данного изобретения антигенная структура для одного из связывающих доменов содержится в пределах целевого белка антигена клеточной поверхности). Например, когда молекула белка подвергается укладке с образованием трехмерной структуры, определенные аминокислоты и/или полипептидный скелет, образующие конформационный эпитоп, оказываются размещенными рядом друг с другом, что делает возможным распознавание эпитопа антителом. Способы определения конформации эпитопов включают без ограничения рентгеновскую кристаллографию, двумерную спектроскопию ядерного магнитного резонанса (2D-ЯМР) и спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) с сайт-направленным спин-мечением.

Способ картирования эпитопов описан следующим образом: когда участок (непрерывный аминокислотный сегмент) в белке поверхностного антигена клетки-мишени человека заменяют/замещают соответствующим участком поверхностного антигена клетки-мишени, не являющимся человеческим и не являющимся антигеном примата (например, поверхностным антигеном клетки-мишени мыши, но другие, такие как куриный, крысиный, хомяка, кролика и т.д., также возможны), ожидается снижение связывания связывающего домена, если только связывающий домен не является перекрестно-реактивным для применения с поверхностным антигеном клетки-мишени, не являющимся человеческим и не являющимся антигеном примата. Указанное снижение предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40 или 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70 или 80%, и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100% по сравнению со связыванием с соответствующим участком белка поверхностного антигена клетки-мишени человека, где связывание с соответствующим участком белка поверхностного антигена клетки-мишени человека принято за 100%. Предусматривается, что вышеупомянутые химеры поверхностного антигена клетки-мишени человека/поверхностного антигена клетки-мишени, не являющегося человеческим, экспрессируются в клетках СНО. Также предусматривается, что химеры поверхностного антигена клетки-мишени человека/поверхностного антигена клетки-мишени, не являющегося человеческим, слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого мембраносвязанного белка, такого как ЕpСAM.

В альтернативном или дополнительном способе картирования эпитопа можно создавать несколько усеченных вариантов внеклеточного домена поверхностного антигена клетки-мишени человека, чтобы определить специфический участок, который распознается доменом связывания. В этих усеченных вариантах различные домены/субдомены или участки внеклеточного поверхностного антигена клетки-мишени постадийно удаляют, начиная с N-конца. Предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут экспрессироваться в клетках СНО. Также предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут быть слиты с трансмембранным доменом и/или цитоплазматическим доменом другого мембраносвязанного белка, такого как ЕpСAM. Также предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут содержать сигнальный пептидный домен на своем N-конце, например сигнальный пептид, который получен из сигнального пептида тяжелой цепи IgG мыши. Более того, предусматривается, что усеченные варианты поверхностного антигена клетки-мишени могут содержать домен v5 на своем N-конце (после сигнального пептида), что позволяет подтвердить их правильную экспрессию на поверхности клетки. Ожидается, что снижение или потеря связывания будут происходить в случае тех усеченных вариантов поверхностного антигена клетки-мишени, которые больше не содержат участок поверхностного антигена клетки-мишени, который распознается связывающим доменом. Снижение связывания предпочтительно составляет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50%; более предпочтительно по меньшей мере 60, 70, 80%, и наиболее предпочтительно 90, 95 или даже 100%, где связывание с целым белком поверхностного антигена клетки-мишени человека (или его внеклеточным областью или доменом) принято за 100.

Дополнительный способ определения вклада конкретного остатка поверхностного антигена клетки-мишени в распознавание конструкцией на основе антитела или связывающим доменом представляет собой сканирование аланином (см., например, Morrison K.L. & Weiss G.A. *Cur Opin Chem Biol.* 2001 Jun; 5(3):302-7), где каждый анализируемый остаток заменяют на аланин, например, посредством сайт-направленного мутагенеза. Применение аланина обусловлено наличием в нем небольшой, химически инертной метильной функциональной группы, которая, тем не менее, имитирует предпочтения к вторичной структуре, которыми обладают многие другие аминокислоты. В тех случаях, когда требуется сохранить размер остатков, подвергнутых мутации, иногда можно использовать крупные аминокислоты, такие как валин или лейцин. Сканирование аланином является проверенной технологией, которую используют уже длительное время.

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или участком, содержащим эпитоп, подразумевает, что связывающий домен проявляет существенную аффинность к эпитопу/участку, содержащему эпитоп, на определенном белке или антигене (в данном случае: поверхностный антиген клетки-мишени и CD3 соответственно), и, как правило, не проявляет значимой перекрестной реактивности с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3. "Значимая аффинность" включает связывание с аффинностью, составляющей приблизительно 10^{-6} М (KD) или выше. Предпочтительно связывание считается специфичным, если аффинность связывания составляет приблизительно 10^{-12} - 10^{-8} М, 10^{-12} - 10^{-9} М, 10^{-12} - 10^{-10} М, 10^{-11} - 10^{-8} М, предпочтительно приблизительно 10^{-11} -

10^{-9} М. Специфичность реакции или связывания связывающего домена с мишенью можно легко проверить с помощью, среди прочих, сравнения реакции указанного связывающего домена с белком- или антигеном-мишенью и реакции указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3. Предпочтительно связывающий домен по настоящему изобретению по сути или практически не связывается с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3 (т.е. первый связывающий домен не способен к связыванию с белками, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени, и второй связывающий домен не способен к связыванию с белками, отличными от CD3). Подразумеваемой характеристикой конструкций на основе антител в соответствии с данным изобретением является то, что они имеют превосходящие характеристики аффинности по сравнению с другими HLE-форматами. Следовательно, такая превосходящая аффинность предполагает удлиненное время полужизни *in vivo*. Большее время полужизни конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением может снизить длительность и частоту введения, что, как правило, влияет на улучшение соблюдения пациентом режима лечения. Это является исключительно важным, поскольку конструкции антител по настоящему изобретению являются исключительно благоприятными для сильно ослабленных или даже полиморбидных раковых пациентов.

Термин "по сути/практически не связывается" или "не способен к связыванию" означает, что связывающий домен настоящего изобретения не связывается с белком или антигеном, отличным от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3, т.е. проявляет реактивность, составляющую не более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена клетки-мишени или CD3, где связывание с поверхностным антигеном клетки-мишени или CD3 соответственно принято за 100%.

Полагают, что специфичное связывание осуществляется благодаря специфическим мотивам в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается за счет их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также за счет вторичных модификаций указанных структур. Специфичное взаимодействие сайта, взаимодействующего с антигеном, и его специфичного антигена может приводить к простому связыванию указанного сайта с антигеном. Более того, специфичное взаимодействие части, взаимодействующей с антигеном, и ее специфического антигена может в качестве альтернативы или дополнительно приводить к возникновению сигнала, например, в связи с индукцией изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т. п.

Термин "вариабельный" относится к частям доменов антител или иммуноглобулинов, у которых проявляется вариабельность их последовательности, а также участвующим в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. к "вариабельному(вариабельным) домену(доменам)"). Посредством спаривания вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и вариабельного участка легкой цепи (VL) образуется единый антиген-связывающий участок.

Вариабельность неравномерно распределена между вариабельными доменами антител; она сконцентрирована в субдоменах каждого из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей. Эти субдомены называются "гипервариабельными участками" или "участками, определяющими комплементарность" (CDR). Более консервативные (т.е. не являющиеся гипервариабельными) участки вариабельных доменов называются "каркасными" участками (FRM или FR) и обеспечивают каркас для шести CDR в трехмерном пространстве для формирования антиген-связывающей поверхности. Каждый из вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей природного происхождения содержит четыре FRM-участка (FR1, FR2, FR3 и FR4), принимающие большей частью β -складчатую конфигурацию, соединенные тремя гипервариабельными участками, которые образуют петли, соединяющие, и в некоторых случаях образующие часть β -складчатой структуры. Гипервариабельные участки в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости с помощью FRM и вместе с гипервариабельными участками другой цепи способствуют образованию антиген-связывающего участка (см. Kabat et al., loc. cit.).

Термин "CDR" и его множественное число относятся к участку, определяющему комплементарность, три из которых придают связывающий характер вариабельному участку легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а еще три придают связывающий характер вариабельному участку тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большинство остатков, отвечающих за специфическое взаимодействие антитела с антигеном и, следовательно, вносят свой вклад в функциональную активность молекулы антитела: они являются основными детерминантами специфичности к антигену.

Точное определение границ и размеров CDR является предметом разных классификаций и систем нумерации. Соответственно, CDR могут быть указаны согласно Kabat, Chothia, контактной или любой другой системе определения границ, включающей систему нумерации, описанной в данном документе. Несмотря на различающиеся границы, каждая из этих систем имеет определенную степень перекрытия, представляющую так называемые "гипервариабельные участки" в вариабельных последовательностях. Следовательно, определения CDR в соответствии с этими системами могут отличаться по длине и граничным участкам по отношению к прилегающему каркасному участку. См. например Kabat (подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей), Chothia (подход, основанный на кри-

сталлографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196: 901-917; и MacCallum et al., J. Mol. Biol, 1996, 262: 732). Еще одним стандартом для характеристики антиген-связывающего участка является определение AbM, используемое в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В случае если две методики идентификации остатков определяют остатки перекрывающихся, но не идентичных участков, их можно комбинировать для определения гибридной CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Обычно CDR образуют петлевую структуру, которая может быть отнесена к канонической структуре. Выражение "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, принимаемой антиген-связывающими петлями (CDR). По результатам сравнительных структурных исследований было обнаружено, что пять из шести антиген-связывающих петель имеют только ограниченный набор доступных конформаций. Каждая каноническая структура может характеризоваться спиральными углами полипептидного скелета. Следовательно, соответствующие петли среди антител могут иметь высокой степени подобности трехмерные структуры, несмотря на высокую аминокислотную вариабельность в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196: 901; Chothia et al., Nature, 1989, 342: 877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263: 800). Кроме того, существует взаимосвязь между принимаемой петлей структурой и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях в петле, а также в пределах консервативного каркасного участка (т.е. вне петли). Таким образом, отнесение к конкретному каноническому классу можно проводить на основании присутствия этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать аспекты, относящиеся к линейной последовательности антитела, например перечисленные согласно Kabat (Kabat et al., в указанной работе). Схема (система) нумерации согласно Kabat является широко распространенным стандартом нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела последовательным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в данном изобретении, что также упоминается в другом месте данного документа. Для определения канонической структуры антитела также можно использовать дополнительные структурные факторы. Например, различия, не в полной мере отображаемые системой нумерации по Kabat, можно описать с помощью системы нумерации по Chothia et al. и/или выявить с помощью других методик, например, кристаллографии или двух- или трехмерного компьютерного моделирования. Соответственно, указанную последовательность антитела можно поместить в канонический класс, что позволяет, среди прочих, проводить идентификацию соответствующих последовательностей каркасных участков (например, на основании необходимости включения разнообразных канонических структур в библиотеку). Система нумерации аминокислотных последовательностей антител по Kabat и структурные особенности, описанные Chothia и соавт. в указанной работе, а также их значение для интерпретации канонических аспектов структуры антител описаны в литературе. Структурные субъединицы и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов различных классов хорошо известны в данной области техники. В отношении обзора структуры антител см. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и в особенности CDR3 тяжелой цепи могут составлять наиболее важные детерминанты в связывании антигена в пределах вариабельных участков легкой и тяжелой цепей. В некоторых конструкциях на основе антител CDR3 тяжелой цепи составляет основную площадь контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых варьирует только CDR3, могут использоваться для изменения свойств связывания антитела или определения того, какие остатки способствуют связыванию антигена. Следовательно, CDR3 обычно является источником наибольшего молекулярного разнообразия в связывающем сайте антитела. Например, H3 может иметь длину всего из двух аминокислотных остатков или более 26 аминокислот.

В классическом полноразмерном иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа H-цепи. Домен CH₁, расположенный наиболее близко к VH, обычно обозначается как CH₁. Константные домены ("C") не принимают непосредственного участия в связывании с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как, антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность и активация системы комплемента. Fc-участок антитела находится в пределах константных доменов тяжелой цепи и, например, способен взаимодействовать с расположенными на поверхности Fc-рецепторами.

Последовательности генов антител после сборки и соматической мутации являются весьма изменчивыми, и эти изменчивые гены по оценкам кодируют 10 различных молекул антител (Immunoglobulin Genes, 2nd ed., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, в иммунной системе образуется репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, полностью или частично полученной из по меньшей мере одной после-

довательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательность(последовательности) можно получить путем *in vivo* перегруппировки V-, D- и J-сегментов генов тяжелых цепей и V- и J-сегментов генов легких цепей. Альтернативно последовательность(последовательности) можно получать из клетки посредством, например, стимуляции *in vitro*, в ответ на которую происходит перегруппировка. В альтернативном варианте часть или всю(все) последовательность(и) можно получать посредством сплайсинга ДНК, синтеза нуклеотидов, мутагенеза и других способов, смотрите, например, патент США 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или может включать множество последовательностей, включая находящиеся в генетически разнородной коллекции.

В связи с настоящим изобретением термин "Fc-часть" или "Fc-мономер" означает полипептид, содержащий по меньшей мере один домен, имеющий функцию домена CH2, и по меньшей мере один домен, имеющий функцию домена CH3 молекулы иммуноглобулина. Из термина "Fc-мономер" видно, что полипептид, содержащий эти домены CH, представляет собой "полипептидный мономер". Fc-мономер может представлять собой полипептид, содержащий по меньшей мере фрагмент константного участка иммуноглобулина за исключением первого домена константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина (CH1), но сохраняющий по меньшей мере функциональную часть одного домена CH2 и функциональную часть одного домена CH3, причем домен CH2 является аминоконцевым по отношению к домену CH3. В предпочтительном аспекте этого определения Fc-мономер может представлять собой полипептидный константный участок, содержащий часть шарнирного участка Ig-Fc, участок CH2 и участок CH3, причем шарнирный участок является аминоконцевым по отношению к домену CH2. Подразумевается, что шарнирный участок согласно настоящему изобретению стимулирует димеризацию. Такие молекулы Fc-полипептидов можно получать, например и без ограничения, путем расщепления папаином участка иммуноглобулина (что дает димера из двух Fc-полипептидов). В другом аспекте этого определения Fc-мономер может представлять собой полипептидный участок, содержащую часть участка CH2 и участка CH3. Такие молекулы Fc-полипептидов можно получать, например и без ограничения путем расщепления пепсином молекулы иммуноглобулина. В одном варианте осуществления полипептидная последовательность Fc-мономера является практически аналогичной последовательности Fc-полипептида: Fc-участка IgG₁, Fc-участка IgG₂, Fc-участка IgG₃, Fc-участка IgG₄, Fc-участка IgM, Fc-участка IgA, Fc-участка IgD и Fc-участка IgE. (См., например, Padlan, *Molecular Immunology*, 31(3), 169-217 (1993)). Ввиду существования некоторой вариативности между иммуноглобулинами и исключительно для ясности Fc-мономер означает последние два домена константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и последние три домена константного участка тяжелой цепи иммуноглобулина IgE и IgM. Как упоминалось, Fc-мономер также может содержать гибкий шарнирный участок, расположенный с N-конца по отношению к этим доменам. В случае IgA и IgM Fc-мономер может включать J-цепь. В случае IgG Fc-часть содержит домены CH2 и CH3 иммуноглобулина и шарнирный участок между первыми двумя доменами и CH2. Хотя границы Fc-части могут варьироваться, например, в случае Fc-части тяжелой цепи IgG человека, содержащей функциональный шарнирный участок, домены CH2 и CH3 могут быть заданы, например, так, чтобы они содержали остатки от D231 (шарнирного домена - в соответствии с D234 в табл. 1 ниже) до P476, соответственно L476 (для IgG₄) карбокси-конца домена CH3, где нумерация используется согласно Kabat. Две Fc-части или два Fc-мономера, слитые друг с другом посредством пептидного линкера, определяют третий домен конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению, который также может быть определен как домен scFc.

В одном варианте осуществления изобретения подразумевается, что описанный в данном документе домен scFc, соответственно Fc-мономеры, слитые друг с другом, находятся только в третьем домене конструкции на основе антитела.

В соответствии с данным изобретением шарнирный участок IgG можно определить по аналогии, используя нумерацию Kabat, как показано в табл. 1. В соответствии с вышеизложенным предполагается, что шарнирный домен/участок по настоящему изобретению содержит аминокислотные остатки, соответствующие участку последовательности IgG₁ от D234 до P243 согласно нумерации Kabat. Аналогично подразумевается, что шарнирный домен/шарнирный участок согласно настоящему изобретению содержит или состоит из шарнирной последовательности IgG₁ DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 1449) (соответствует участку от D234 до P243, как показано в табл. 1 ниже - варианты указанной последовательности также предусмотрены при том условии, что шарнирный участок по-прежнему способствует димеризации). В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению участок гликозилирования в позиции 314 по Kabat доменов CH2 в третьем домене конструкции на основе антитела удален путем замены N314X, где X представляет собой любую аминокислоту, исключаящую Q. Указанная замена является предпочтительно заменой N314G. В более предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанный домен CH2 дополнительно содержит следующие замены (положения в соответствии с Kabat): V321C и R309C (эти замены вводят внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat).

Также подразумевается, что третий домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержит в направлении от аминоконца к карбоксильному концу: DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 1449) (т.е. шарнирный участок) -CH2-CH3-линкер-DKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 1449) (т.е. шарнирный

участок) -CH₂-CH₃ или состоит из них. Пептидный линкер из вышеупомянутой конструкции на основе антитела в предпочтительном варианте осуществления характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, то есть Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, то есть (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число от 5 или более (например, 5, 6, 7, 8 и т. д. или более), при этом предпочтительным является 6 ((Gly₄Ser)₆). Указанная конструкция может дополнительно содержать вышеупомянутые замены N314X, предпочтительно N314G, и/или дополнительные замены V321C и R309C. В предпочтительном варианте осуществления конструкций на основе антител по настоящему изобретению, как определено в данном документе ранее, предусматривается, что второй домен связывается с внеклеточный эпитопом цепи CD3ε человека и/или Масаса.

Таблица 1. Нумерация аминокислотных остатков шарнирного участка по Kabat

Нумерация IMGT для шарнирного участка	Трансляция аминокислоты для IgG ₁	Нумерация по Kabat
1	(E)	226
2	P	227
3	K	228
4	S	232
5	C	233
6	D	234
7	K	235
8	T	236
9	H	237
10	T	238
11	C	239
12	P	240
13	P	241
14	C	242
15	P	243

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения шарнирный домен/участок содержит или состоит из шарнирной последовательности подтипа IgG₂ ERKCCVECPCPCP (SEQ ID NO: 1450), последовательности подтипа IgG₃ ELKTPDTHHTCPCPCP (SEQ ID NO: 1451) или ELKTPDTHHTCPCPCP (SEQ ID NO: 1458) и/или последовательности подтипа IgG₄ ESKYGPPCPCPCP (SEQ ID NO: 1452). Последовательность шарнирного участка подтипа IgG₁ может быть следующей: EPKSCDKTHTCPPCP (как показано в табл. 1 и SEQ ID NO: 1459). Таким образом, эти основные шарнирные участки также подразумеваются в контексте данного изобретения.

Положение и последовательность домена CH₂ IgG и домена CD3 IgG можно определить по аналогии, используя нумерацию Kabat, как показано в табл. 2.

Таблица 2. Нумерация аминокислотных остатков участка CH₂ и CH₃ IgG по Kabat

Подтип IgG	ак трансляция CH ₂	Нумерация CH ₂ по Kabat	ак трансляция CH ₃	Нумерация CH ₃ по Kabat
IgG ₁	ARE...KAK	244...360	GQP...PGK	361...478
IgG ₂	APP...KTK	244...360	GQP...PGK	361...478
IgG ₃	ARE...KTK	244...360	GQP...PGK	361...478
IgG ₄	ARE...KAK	244...360	GQP...LGK	361...478

В одном варианте осуществления настоящего изобретения выделенные жирным аминокислотные остатки в домене CH₃ первого или обоих Fc-мономеров удалены.

Пептидный линкер, посредством которого полипептидные мономеры ("Fc-часть" или "Fc-мономер") третьего домена слиты друг с другом, предпочтительно содержит по меньшей мере 25 аминокислотных остатков (25, 26, 27, 28, 29, 30 и т.д.). Более предпочтительно этот пептидный линкер содержит по меньшей мере 30 аминокислотных остатков (30, 31, 32, 33, 34, 35 и т.д.). Также предпочтительно, чтобы линкер содержал до 40 аминокислотных остатков, более предпочтительно до 35 аминокислотных остатков, наиболее предпочтительно именно 30 аминокислотных остатков. Предпочтительным вариантом осуществления такого пептидного линкера является вариант, характеризующийся аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, то есть Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число 5 или больше (например, 6, 7 или 8). Предпочтительно целое число равно 6 или 7, более предпочтительно целое число равно 6.

В случае, если линкер используется для слияния первого домена со вторым доменом или первого или второго домена с третьим доменом, этот линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточную, чтобы гарантировать, что каждый из первого и второго доменов может независимо

от другого сохранять свою дифференциальную специфичность связывания. Для пептидных линкеров, которые связывают по меньшей мере два связывающих домена (или два вариабельных домена) в конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, те пептидные линкеры являются предпочтительными, которые содержат лишь несколько аминокислотных остатков, например, 12 аминокислотных остатков или меньше. Таким образом, предпочтительными являются пептидные линкеры из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Подразумевается, что пептидный линкер с меньше чем 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 или одну аминокислоту, причем предпочтительными являются Gly-богатые линкеры. Предпочтительный вариант осуществления пептидного линкера для слияния первого и второго доменов приведен в SEQ ID NO: 1. Предпочтительный линкер в варианте осуществления пептидного линкера для слияния второго и третьего домена представляет собой (Gly)₄-линкер, соответственно G₄-линкер.

Особенно предпочтительной "единственной" аминокислотой в контексте одного вышеописанного "пептидного линкера" является Gly. Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять из одной аминокислоты Gly. В предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению пептидный линкер характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser (SEQ ID NO: 1), или ее полимерами, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число 1 или больше (например, 2 или 3). Предпочтительные линкеры приведены в SEQ ID NO: от 1 до 12. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие стимуляции образования вторичных структур, известны в данной области техники и описаны, например, в Dall'Acqua et al. (Biochem. (1998) 37, 9266-9273), Cheadle et al. (Mol Immunol (1992) 29, 21-30) и Raag and Whitlow (FASEB (1995) 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые, помимо прочего, не стимулируют образование каких-либо вторичных структур. Связь указанных доменов друг с другом может быть обеспечена, например, с помощью генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и их экспрессии в клетках млекопитающих или бактериях хорошо известны в данной области техники (например, WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и второй домены образуют конструкцию на основе антитела в формате, выбранном из группы, состоящей из (scFv)₂, scFv-однодоменного mAb, диатела и олигомеров любого из тех форматов.

Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления и как задокументировано в прилагаемых примерах, первый и второй домены конструкции на основе антитела по настоящему изобретению представляют собой "конструкцию на основе биспецифического одноцепочечного основе антитела", более предпочтительно биспецифичный "одноцепочечный Fv" (scFv). Хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, описанного в данном документе выше, позволяющего им образовывать единую белковую цепь, в которой VL- и VH-участки спариваются с образованием моновалентной молекулы; см. например, Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Эти фрагменты антител получают, используя традиционные методики, известные специалистам в данной области техники, и оценивают фрагменты в отношении функции таким же образом, как и полноразмерные антитела. Следовательно, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) представляет собой слитый белок вариабельного участка тяжелой цепи (VH) и легкой цепи (VL) иммуноглобулинов, обычно соединенных коротким линкерным пептидом длиной от приблизительно десяти до приблизительно 25 аминокислот, предпочтительно от приблизительно 15 до 20 аминокислот. Линкер обычно богат глицином для обеспечения гибкости, а также серином или треонином для обеспечения растворимости и может либо соединять N-конец VH с C-концом VL, либо наоборот. Этот белок сохраняет специфичность оригинального иммуноглобулина, несмотря на удаление константных участков и введение линкера.

Конструкции на основе биспецифических одноцепочечных антител являются известными в данной области техники и описаны в WO 99/54440, Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Методики, описанные для получения одноцепочечных антител (см., помимо прочего, патент США 4946778, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. and Little (2009), loc. cit.) можно приспособить для получения конструкций на основе одноцепочечных антител специфически распознающих выбранную(выбранные) мишень(мишени).

Бивалентные (также называемые двухвалентные) или биспецифические одноцепочечные вариабельные фрагменты (bi-scFv или di-scFv с форматом (scFv)₂) могут быть сконструированы путем соединения двух молекул scFv (например, с линкерами, описанными в данном документе выше). Если эти две молекулы scFv имеют одинаковую специфичность связывания, то получаемая в результате молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться бивалентной (т.е. она имеет две антигенные детерминанты для одного и того же целевого эпитопа). Если две молекулы scFv характеризуются разной специфичностью связывания, то получаемая в результате молекула (scFv)₂ предпочтительно будет называться биспеци-

фичной. Связывание может быть осуществлено путем получения одной пептидной цепи с двумя участками VH и двумя участками VL, в результате чего образуются тандемные scFv (см., например, Kufer P. et al. (2004) Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Другой возможностью является создание молекул scFv с линкерными пептидами, которые слишком коротки для того, чтобы два переменных участка складывались вместе (например, приблизительно пять аминокислот), вынуждая scFv димеризоваться. Такой тип известен под названием диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al. (July 1993) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90 (14): 6444-8).

В соответствии с настоящим изобретением любой из первого, второго или первый и второй домены могут составлять однодоменное антитело, соответственно переменный домен или по меньшей мере часть CDR однодоменного антитела. Однодоменные антитела содержат только один (мономерный) переменный домен антитела, который способен избирательно связываться с конкретным антигеном, независимо от других V-участков или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из тяжелой цепи антител, выявленных у верблюдов, и они называются фрагментами V_HH. Хрящевые рыбы также имеют антитела с тяжелой цепью (IgNAR), из которых могут быть получены однодоменные антитела, называемые фрагментами V_{NAR}. Альтернативный подход заключается в разделении димерных переменных доменов обычных иммуноглобулинов, например, человека или грызунов, на мономеры с получением таким образом VH или VL в качестве однодоменного Ab. Хотя в настоящее время большинство исследований относительно однодоменных антител базируется на переменных доменах тяжелой цепи, также было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с эпитопами-мишенями. Примеры однодоменных антител называются sdAb, нанотелами или антителами, содержащими один переменный домен.

Следовательно, (однодоменное mAb)₂ представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух однодоменных моноклональных антител, которые по отдельности выбраны из группы, включающей V_H, VL, V_HH и V_{NAR}. Линкер предпочтительно имеет форму пептидного линкера. Аналогично "scFv-однодоменное mAb" представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из по меньшей мере одного однодоменного антитела, описанного выше, и одной молекулы scFv, описанной выше. Опять же линкер предпочтительно имеет форму пептидного линкера.

Конкурирует ли конструкция на основе антитела за связывание с другой указанной конструкцией на основе антитела, можно определить в конкурентном анализе, таком как конкурентный ИФА или клеточный конкурентный анализ. Также можно использовать покрытые авидином микрочастицы (гранулы). Аналогично с покрытием авидином планшета для ИФА при проведении реакции с биотинилированным белком каждую из этих гранул можно использовать в качестве субстрата для проведения анализа.

Антиген наносят на гранулу, а затем предварительно наносят первое антитело. Добавляют второе антитело и определяют присутствие какого-либо дополнительного связывания. Возможные средства для считывания данных включают проточную цитометрию.

T-клетки или T-лимфоциты являются типом лимфоцитов (которые сами по себе являются типом белых кровяных телец), который играет основную роль в клеточноопосредованном иммунитете. Существует несколько подгрупп T-клеток, каждая из которых имеет отличную функцию. T-клетки можно отличить от других лимфоцитов, таких как B-клетки и NK-клетки, по присутствию T-клеточного рецептора (ТКР) на клеточной поверхности. ТКР отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), и состоит из двух разных белковых цепей. В 95% T-клеток ТКР состоит из альфа (α) и бета (β) цепи. Когда ТКР вступает в контакт с антигенным пептидом и МНС (комплексом пептид/МНС), происходит активация T-лимфоцита посредством последовательности биохимических событий, опосредованных ассоциированными ферментами, ко-рецепторами, специализированными адапторными молекулами и активированными или высвобожденными транскрипционными факторами.

Комплекс CD3-рецептора представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит CD3γ (гамма) цепь, CD3δ (дельта) цепь и две CD3ε (эпсилон) цепи. Эти цепи связываются с T-клеточным рецептором (ТРК) и так называемой ζ (дзета) цепью с образованием комплекса T-клеточного рецептора и CD3 и генерацией сигнала активации в T-лимфоцитах. Цепи CD3γ (гамма), CD3δ (дельта) и CD3ε (эпсилон) являются высокородственными белками клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозинный активирующий мотив или сокращенно ITAM, который является ключевым для функции сигнального пути ТРК. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном CD3E, который расположен на хромосоме 11. Наиболее предпочтительный эпитоп CD3 эпсилон находится в пределах аминокислотных остатков 1-27 внеклеточного домена человеческого CD3 эпсилон. Предполагается, что конструкции на основе антител в соответствии с данным изобретением, как правило и преимущественно, меньше демонстрируют неспецифическую активацию T-клеток, которая является нежелательной в специфической иммунотерапии. Это приводит к снижению

риска возникновения побочных явлений.

Перенаправленный лизис клеток-мишеней посредством привлечения Т-клеток мультиспецифической, по меньшей мере конструкцией на основе биспецифического антитела включает образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Рекрутированные Т-клетки способны последовательно осуществлять лизис клеток-мишеней и на них не влияют механизмы уклонения от иммунологического надзора, создающие помехи для процессинга и презентации пептидных антигенов или клональной дифференцировки Т-клеток; смотрите, например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованную конструкциями на основе антител по настоящему изобретению, можно определять различными путями. Эффекторными клетками могут представлять собой, например, обогащенные (человеческие) CD8-положительные Т-клетки или нестимулированные (человеческие) мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Если клетки-мишени получены от макака либо экспрессируют либо трансфицированы поверхностным антигеном клетки-мишени макака, который связан первым доменом, эффекторные клетки также должны быть получены от макака, как например, в случае линии Т-клеток макака, например, 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать (по меньшей мере внеклеточный домен) поверхностный антиген клетки-мишени, например, поверхностный антиген клетки-мишени человека или макака. Целевые клетки могут представлять собой линию клеток (таких как клетки CHO), стабильно или временно трансфицированных поверхностным антигеном клетки-мишени, например, поверхностным антигеном клетки-мишени человека или макака. В качестве альтернативы клетки-мишени могут представлять собой природную клеточную линию, положительно экспрессирующую поверхностный антиген клетки-мишени. Обычно ожидается, что значения EC_{50} будут более низкими для линий целевых клеток, экспрессирующих поверхностный антиген клетки-мишени на поверхности клетки на более высоких уровнях. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) обычно составляет приблизительно 10:1, но также может варьироваться. Цитотоксическую активность конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ можно измерить в анализе высвобождения ^{51}Cr (время инкубирования приблизительно 18 ч) или в анализе цитотоксичности на основе FACS (время инкубирования приблизительно 48 ч). Также возможны модификации времени инкубации (цитотоксической реакции) в анализе. Другие способы определения цитотоксичности хорошо известны специалистам и включают MTT- или MTS-анализ, анализы на основе АТФ, включая биолюминесцентный анализ, анализ с сульфородамино В (SRB), анализ WST, клоногенный анализ и методику ECIS.

Цитотоксическую активность, опосредованную конструкциями на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ по настоящему изобретению, предпочтительно измеряют в клеточном анализе цитотоксичности. Это также можно измерить в анализе высвобождения ^{51}Cr . Это представлено значением EC_{50} , которое соответствует полумаксимальной эффективной концентрации (концентрации конструкции на основе антитела, индуцирующей половинную цитотоксическую реакцию между исходным уровнем и максимумом). Предпочтительно значение EC_{50} для конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ составляет ≤ 5000 пМ или ≤ 4000 пМ, более предпочтительно ≤ 3000 пМ или ≤ 2000 пМ, еще более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 400 пМ или ≤ 300 пМ, еще более предпочтительно < 200 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ, еще более предпочтительно ≤ 50 пМ, еще более предпочтительно ≤ 20 пМ или ≤ 10 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 5 пМ.

Указанные выше значения EC_{50} могут быть получены в различных анализах. Специалисту известно, что можно ожидать, что значение EC_{50} будет ниже, когда стимулированные/обогащенные $CD8^+$ Т-клетки используются в качестве эффекторных клеток по сравнению с нестимулированными PBMC. Кроме того, можно ожидать, что значения EC_{50} будут ниже, когда клетки-мишени экспрессируют большое количество поверхностного антигена клетки-мишени по сравнению с низкой целевой экспрессией у крыс. Например, когда в качестве эффекторных клеток используются стимулированные/обогащенные $CD8^+$ Т-клетки человека (и либо клетки, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени, такие как клетки CHO, или клеточные линии человека, положительные по поверхностному антигену клетки-мишени используются в качестве клеток-мишеней), значение EC_{50} для конструкции на основе биспецифического антитела к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ составляет предпочтительно ≤ 1000 пМ, более предпочтительно ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 250 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ, еще более предпочтительно ≤ 50 пМ, еще более предпочтительно ≤ 10 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 5 пМ. Когда в качестве эффекторных клеток используются PBMC человека, значение EC_{50} для конструкции на основе биспецифического антитела к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ составляет предпочтительно ≤ 5000 пМ или ≤ 4000 пМ (в частности, когда клетками-мишенями являются клеточные линии человека, положительные по поверхностному антигену клетки-мишени), более предпочтительно ≤ 2000 пМ (в частности, когда клетками-мишенями являются клетки, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени, такие как клетки CHO), более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 200 пМ, еще более предпочтительно ≤ 150 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 50 пМ или ниже. Если в качестве эффекторных клеток используется

линия Т-клеток макака, такая как LpPx4119, а в качестве целевой клеточной линии используются клетки, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени макака, такие как клетки СНО, то значение EC_{50} для конструкции на основе биспецифического антитела к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ составляет предпочтительно ≤ 2000 пМ или ≤ 1500 пМ, более предпочтительно ≤ 1000 пМ или ≤ 500 пМ, еще более предпочтительно ≤ 300 пМ или ≤ 250 пМ, еще более предпочтительно ≤ 100 пМ и наиболее предпочтительно ≤ 50 пМ.

Предпочтительно конструкции на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ по настоящему изобретению не индуцируют/не опосредуют лизис или по сути не индуцируют/не опосредуют лизис клеток, негативных по поверхностному антигену клетки-мишени, таких как клетки СНО.

Термин "не индуцирует лизис", "по сути не индуцирует лизис", "не опосредуют лизис" или "по сути не опосредуют лизис" означает, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению индуцирует или опосредует лизис не более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% клеток, негативных по поверхностному антигену клетки-мишени, где лизис клеточной линии человека, положительной по поверхностному антигену клетки-мишени, принят за 100%. Это обычно соответствует концентрациям конструкции на основе антитела, составляющим не более 500 нМ. Специалисту известно, как определить лизис клеток без излишних усилий. Кроме того, в данном описании приведены конкретные инструкции для определения лизиса клеток.

Различие в цитотоксической активности между мономерной и димерной изоформами отдельных конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену $\times CD3$ клетки-мишени называют "расхождением в эффективности". Это расхождение в эффективности можно, например, рассчитать как соотношение значений EC_{50} для мономерных и димерных форм молекул. Расхождение в эффективности конструкций на основе биспецифических антител к поверхностному антигену клетки-мишени $\times CD3$ по настоящему изобретению составляет предпочтительно ≤ 5 , более предпочтительно ≤ 4 , еще более предпочтительно ≤ 3 , еще более предпочтительно ≤ 2 и наиболее предпочтительно ≤ 1 .

Первый и/или второй (или любой дополнительный) связывающий домен(домены) конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно отличаются межвидовой специфичностью для представителей приматов класса млекопитающих. Отличающиеся межвидовой специфичностью CD3-связывающие домены описаны, например, в WO 2008/119567. Согласно одному варианту осуществления первый и/или второй связывающий домен в дополнение к связыванию с поверхностным антигеном клетки-мишени человека и CD3 человека соответственно будут также связываться с поверхностным антигеном клетки-мишени/CD3, включая (без ограничения) приматов нового света (таких как *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*), приматов старого света (таких как бабуины и макаки), гиббонов и представителей *homininae*, не являющихся человеком.

В одном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый домен связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени человека и дополнительно связывается с поверхностным антигеном клетки-мишени макака, с таким как поверхностный антиген клетки-мишени *Macaques fascicularis*, а более предпочтительно поверхностный антиген клетки-мишени макака, экспрессирующийся на поверхности клеток макака. Аффинность первого связывающего домена с поверхностным антигеном клетки-мишени макака составляет предпочтительно ≤ 15 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ, еще более предпочтительно ≤ 5 нМ, еще более предпочтительно ≤ 1 нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,5$ нМ, еще более предпочтительно $\leq 0,1$ нМ, и наиболее предпочтительно $\leq 0,05$ нМ или даже $\leq 0,01$ нМ.

Предпочтительно расхождение в аффинности конструкций на основе антител согласно настоящему изобретению для связывания с поверхностным антигеном клетки-мишени макака в сравнении с поверхностным антигеном клетки-мишени человека [та поверхностный антиген клетки-мишени:hu поверхностный антиген клетки-мишени] (как определено, например, с помощью анализа *BiaCore* или *Scatchard*) составляет < 100 , предпочтительно < 20 , более предпочтительно < 15 , дополнительно предпочтительно < 10 , даже более предпочтительно < 8 , более предпочтительно < 6 и наиболее предпочтительно < 2 . Предпочтительные диапазоны для расхождения в аффинности конструкций антител согласно настоящему изобретению для связывания с поверхностным антигеном клетки-мишени по сравнению с поверхностным антигеном клетки-мишени человека составляют от 0,1 до 20, более предпочтительно от 0,2 до 10, еще более предпочтительно от 0,3 до 6, еще более предпочтительно от 0,5 до 3 или от 0,5 до 2,5, и наиболее предпочтительно от 0,5 до 2 или от 0,6 до 2.

Второй (связывающий) домен конструкции на основе антитела по настоящему изобретению связывается с CD3-эпсилон человека и/или с CD3-эпсилон *Macaques*. В предпочтительном варианте осуществления второй домен дополнительно связывается с CD3-эпсилон *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*. Оба *Callithrix jacchus* и *Saguinus oedipus* представляют собой приматов нового света, относящихся к семейству *Callitrichidae*, тогда как *Saimiri sciureus* представляет собой примата нового света, относящегося к семейству *Cebidae*.

Для конструкции на антителапо настоящему изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с внеклеточный эпитопом CD3 человека и/или Масаса, содержал VL-участок, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из:

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

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

(c) CDR-L1, приведенного под SEQ ID NO: 153 в WO 2008/119567, CDR-L2, приведенного под SEQ ID NO: 154 в WO 2008/119567, и CDR-L3, приведенного под SEQ ID NO: 155 в WO 2008/119567.

Также в предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению второй домен, который связывается с внеклеточным эпитопом цепи CD3-эпсилон человека и/или цепи Масаса содержит VH-участок, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, выбранные из:

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

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

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

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

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

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

(g) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 120 в WO 2008/119567, CDR-H2, приведенного под SEQ ID NO: 121 в WO 2008/119567, и CDR-H3, приведенного под SEQ ID NO: 122 в WO 2008/119567;

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

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

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

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению вышеописанные три группы VL CDR комбинируют с вышеописанными десятью группами VH CDR в пределах второго связывающего домена для получения (30) групп, каждая из которых содержит CDR-L 1-3 и CDR-H 1-3.

Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VL-участок, выбранный из группы, состоящей из VL-участка, приведенного под SEQ ID NO: 17, 21, 35, 39, 53, 57, 71, 75, 89, 93, 107, 111, 125, 129, 143, 147, 161, 165, 179 или 183 из WO 2008/119567, или приведенного в настоящем перечне последовательностей под SEQ ID NO: 16 или 25;

Также предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VH-участок, выбранный из группы, состоящей из VH-участка, приведенного под SEQ ID NO: 15, 19, 33, 37, 51, 55, 69, 73, 87, 91, 105, 109, 123, 127, 141, 145, 159, 163, 177 или 181 из WO 2008/119567, или приведенного в настоящем перечне последовательностей под SEQ ID NO: 15 или 24;

Более предпочтительно конструкция на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3, содержащим VL-участок и VH-участок, выбранные из группы, состоящей из:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Также в связи с конструкцией на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы второй домен, который связывается с CD3, содержал VL-участок, приведенный под SEQ ID NO: 16 или 25, и VH-участок, приведенный в настоящем перечне последовательностей под SEQ ID NO: 15 или 24;

В соответствии с предпочтительным вариантом конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и/или второй домен имеют следующий формат: пары VH-участков и VL-участков имеют формат одноцепочечного антитела (scFv). VH- и VL-участки расположены в порядке VH-VL или VL-VH. Предпочтительно, чтобы VH-участок был расположен с N-конца по отношению к линкерной последовательности, а VL-участок был расположен с C-конца по отношению к линкерной последовательности.

Предпочтительный вариант описанной выше конструкции антитела согласно данному изобретению характеризуется вторым доменом, который связывается с CD3, содержащим аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23, 25, 41, 43, 59, 61, 77, 79, 95, 97, 113, 115, 131, 133, 149, 151, 167, 169, 185 или 187 из WO 2008/119567 или приведенную в настоящем перечне последовательностей под SEQ ID NO: 26;

Ковалентные модификации конструкций на основе антител также включены в объем этого изобретения и в целом, но не в каждом случае, осуществляются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций конструкции на основе антитела вводят в молекулу за счет проведения реакции между конкретными аминокислотными остатками конструкции на основе антитела с органическим дериватирующим средством, которое способно вступать в реакцию с избранными боковыми цепями N- или C-концевых остатков.

Остатки цистеинила чаще всего взаимодействуют с α -галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с образованием карбоксиметильных или карбоксиамидометильных производных. Остатки цистеинила также подвергают дериватизации за счет реакции с бромтрифторацетоном, α -бром- β -(5-имидозоил)пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил 2-пиридилдисульфидом, p-хлормеркурибензоатом, 2-хлормеркури-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидильные остатки подвергают дериватизации за счет реакции с диэтилпирокарбонатом при показателе pH 5,5-7,0, поскольку это средство относительно специфично для гистидильной боковой цепи. Также используют пара-бромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1M какодilate натрия при pH 6,0. Лизинильные и аминоконцевые остатки реагируют с ангидридами янтарной или другой карбоновой кислоты. Дериватизация с этими средствами имеет эффект обращения заряда лизинильных остатков. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают сложные имидоэфиры, такие как метилпиколиминидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфоокислота; O-метилизомочевина; 2,4-пентандион и катализируемая трансаминазой реакция с глиоксилатом.

Аргинильные остатки могут быть модифицированы за счет реакции с одним или несколькими стандартными реагентами, среди которых фенилглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация остатков аргинина требует проведения реакции в щелочных условиях из-за высокого pKa функциональной группы гуанидина. Кроме того, эти реагенты могут реагировать с группами лизина, а также эpsilon-аминогруппой аргинина.

Специфическая модификация тирозильных остатков может быть проведена с особым интересом к введению спектральных меток в тирозильные остатки за счет реакции с ароматическими соединениями диазония или с тетранитрометаном. Чаще всего N-ацетилимидизол и тетранитрометан используются для образования O-ацетилтирозильных фрагментов и 3-нитропроизводных соответственно. Тирозильные остатки иодируют с использованием ^{125}I или ^{131}I с целью получения меченых белков для использования в радиоиммуноанализе, при этом описанный выше способ с хлорамином T является подходящим.

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

Дериватизацию бифункциональными средствами используют для перекрестного сшивания конструкций на основе антител по настоящему изобретению с водонерастворимой иммобилизирующей матрицей или поверхностью для применения в различных способах. Обычно используемые сшивающие средства включают, например, сложные эфиры 1,1-бис(диазоацетил)-2-фенилэтана, глутаральдегида, N-

гидроксисукцинимиды, например, сложные эфиры 4-азидосалициловой кислоты, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, включая сложные дисукцинимидильные эфиры, такие как 3,3'-дитиобис(сукцинимидилпропионат) и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимида-1,8-октан. Дериватизирующие средства, такие как метил-3-[(p-азидофенил)дитио]пропиоимидат, в результате дают фотоактивируемые промежуточные соединения, которые способны образовывать поперечные связи в присутствии света. В альтернативном варианте для иммобилизации белков применяют реакционноспособные водонерастворимые матрицы, такие как активируемые цианогенбромидом углеводы, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США №№ 3969287; 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440 применяются для иммобилизации белка.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют до соответствующих глутамильных и аспартильных остатков. Альтернативно эти остатки дезамидируются в умеренно кислых условиях. Любая форма этих остатков находится в пределах объема настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксилирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонильных остатков, метилирование α-аминогрупп лизина, аргинина и гистидина боковых цепей (Т.Е. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

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

Гликозилирование полипептидов, как правило, является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи остатка аспарагина. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серина и аспарагин-X-треонина, где X представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, представляют собой последовательности распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, наиболее часто серину или треонину, хотя также можно использовать 5-гидроксипролин или 5-гидроксизин.

Добавление участков гликозилирования в конструкцию на основе антитела удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы она содержала одну или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение также может быть осуществлено путем добавления или замены одним или несколькими сериновыми или треониновыми остатками в исходной последовательности (для O-связанных сайтов гликозилирования). Для удобства аминокислотную последовательность конструкции на основе антитела предпочтительно изменяют посредством изменений на уровне ДНК, в частности, осуществляя мутацию ДНК, кодирующую полипептид, в предварительно выбранных основаниях так, чтобы создать кодоны, которые будут транслироваться в необходимые аминокислоты.

Другим средством повышения количества углеводных компонентов в конструкции на основе антитела является химическое или ферментативное сопряжение гликозидов с белком. Эти процедуры предпочтительны по той причине, что они не требуют продуцирования белка в клетке-хозяине, которая обладает способностями к гликозилированию для N- и O-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого вида сопряжения сахар(а) могут быть присоединены к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, как например, к группам цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, как например, к группам серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, как например, к остаткам фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Эти способы описаны в WO 87/05330, и в Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306.

Удаление углеводных компонентов, присутствующих в исходной конструкции на основе антитела, можно осуществлять химическим или ферментативным способом. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединением трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентным соединением. Такая обработка приводит в результате к расщеплению большинства или всех сахаров за исключением связывающего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), тогда как полипептид остается интактным. Химическое дегликозилирование описано в Hakimuddin et al., 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52 и в Edge et al., 1981, *Anal. Biochem.* 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептиды может быть достигнуто путем применения ряда эндо- и экзо-гликозидаз, как описано в Thotakura et al., 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350. Гликозилирование в потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено путем применения соединения туникамицина, как описано в Duskin et al., 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105. Туникамицин блокирует образование белок-N-гликозидных

связей.

Другие модификации конструкции на основе антитела также предусмотрены в данном документе. Например, другой тип ковалентной модификации конструкции на основе антитела включает связывание конструкции на основе антитела с различными небелковыми полимерами, включая без ограничения различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксиполиэтиленгликоли или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, как это описано в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области техники, можно проводить аминокислотные замены в различных положениях в конструкции на основе антитела, например, чтобы облегчить добавление полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения ковалентная модификация конструкции на основе антител по настоящему изобретению включает добавление одной или нескольких меток. Группа мечения может быть присоединенной к конструкции на основе антитела с помощью спейсерных групп различной длины для уменьшения возможного стерического несоответствия. В данной области техники известны различные способы мечения белков, которые можно применять при осуществлении данного изобретения. Термин "метка" или "группа мечения" относится к любой детектируемой метке. В целом метки делятся на множество классов в зависимости от анализа, в котором предполагается их выявление; при этом следующие примеры включают без ограничения:

- a) изотопные метки, которые могут быть радиоактивными или тяжелыми изотопами, как например, радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{89}Zr , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I);
- b) магнитные метки (например, магнитные частицы);
- c) активные в окислительно-восстановительных реакциях фрагменты;
- d) оптические красители (включая без ограничения хромофоры, люминофоры и флуорофоры) такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут быть "низкомолекулярными" флуоресцирующими средствами или белковыми флуоресцирующими средствами;
- e) ферментативные группы (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза);
- f) биотинилированные группы;
- g) заранее определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, связывающие участки для вторичных антител, домены, связывающие металлы, метки эпитопов и т.п.).

Под "флуоресцентной меткой" понимают любую молекулу, которая может быть детектирована с помощью присущих ей флуоресцентных свойств. Подходящие флуоресцентные метки включают без ограничения флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, желтый люцифер, голубой водопад J, техасский красный, IAE-DANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy 5, Cy 5.5, LC Red 705, зеленый Орегон, красители Alexa-Fluor (Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), голубой водопад, желтый водопад и R-фиикоэритрин (PE) (Molecular Probes, Юджин, Орегон), FITC, родамин и техасский красный (Pierce, Рокфорд, Иллинойс), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, Питтсбург, Пенсильвания). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в Molecular Probes Handbook by Richard P. Haugland.

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

Конструкция на основе антитела по настоящему изобретению также может содержать дополнительные домены, которые, например, полезны при выделении молекулы или связаны с адаптированным фармакокинетическим профилем молекулы. Домены, которые способствуют выделению конструкции на основе антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных компонентов, которые могут быть захвачены в способе выделения, например, в колонке для выделения. Неограничивающие варианты осуществления таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Мус-метка, НАТ-метка, НА-метка, ТАР-метка, GST-метка, хитин-связывающий домен (CBD-метка), мальтоза-связывающий домен (MBP-метка), Flag-метка, Strep-метка и ее варианты (например, StrepII-метка) и His-метка. Все конструкции на основе антител, раскрытые в данном документе, характеризующиеся определенными CDR, могут содержать домен с His-меткой, который обычно известен как повтор последовательных остатков His в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно из пяти и более, предпочтительно из шести остатков His (гекса-гистидин). His-метка может быть располо-

жена, например, на N- или C-конце конструкции на основе антитела, предпочтительно она расположена на C-конце. Наиболее предпочтительно гекса-гистидиновая метка (НННННН) (SEQ ID NO: 16) связана посредством пептидной связи с C-концом конструкции на основе антитела в соответствии с настоящим изобретением. Кроме того, с полигистидиновой меткой можно комбинировать конъюгатную систему PLGA-PEG-PLGA для применений с замедленным высвобождением и для улучшения фармакокинетического профиля.

Также предполагаются модификации аминокислотных последовательностей описанных в данном документе конструкций на основе антител. Например, может требоваться улучшение аффинности связывания и/или других биологических свойств конструкции на основе антитела. Варианты аминокислотных последовательностей конструкций антител получают путем введения соответствующих нуклеотидных замен в нуклеиновые кислоты конструкций на основе антител или путем синтеза пептида. Все из описанных ниже модификаций аминокислотной последовательности должны в результате давать такую конструкцию на основе антитела, которая по-прежнему сохраняет требуемую биологическую активность (связывание с поверхностным антигеном клетки-мишени и с CD3) немодифицированной родительской молекулы.

Термины "аминокислота" или "аминокислотный остаток" обычно относятся к аминокислоте, имеющей определение, принятое в данной области техники, такой как аминокислота, выбранная из группы, состоящая из аланина (Ala или A); аргинина (Arg или R); аспарагина (Asn или N); аспарагиновой кислоты (Asp или D); цистеин (Cys или C); глутамин (Gln или Q); глутаминовую кислоту (Glu или E); глицина (Gly или G); гистидина (His или H); изолейцина (Ile или I); лейцина (Leu или L); лизина (Lys или K); метионина (Met или M); фенилаланина (Phe или F); пролина (Pro или P); серина (Ser или S); треонина (Thr или T); триптофана (Trp или W); тирозина (Tyr или Y) и валина (Val или V), хотя при необходимости можно применять модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. Обычно аминокислоты можно разделить на группы, имеющие неполярную боковую цепь (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженную боковую цепь (например, Asp, Glu); положительно заряженную боковую цепь (например, Arg, His, Lys) или незаряженную полярную боковую цепь (например, Asn, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Модификации аминокислот включают, например, делеции из и/или вставки в, и/или замены остатков в пределах аминокислотных последовательностей конструкций на основе антител. С целью получения конечной конструкции осуществляют любую комбинацию из делеции, вставки и замены, при условии, что конечная конструкция обладает необходимыми характеристиками. Изменения в аминокислотах также могут изменять посттрансляционные процессы, которым подвергаются конструкции на основе антител, такие как изменение количества или положения участков гликозилирования.

Например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот могут быть вставлены, замещены или удалены в каждом из CDR (конечно, в зависимости от их длины), тогда как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или 25 аминокислот могут быть вставлены, замещены или удалены в каждом из FR. Предпочтительно вставки аминокислотной последовательности в конструкцию на основе антитела включают слияние с аминокислотными карбоксильными концевыми группами по длине от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Соответствующие модификации также можно проводить в пределах третьего домена конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению. Инсерционный вариант конструкции на основе антитела по настоящему изобретению включает слияние фермента с N-концом или с C-концом конструкции на основе антитела или слияние с полипептидом.

Представляющие наибольший интерес для заместительного мутагенеза остатки включают (не ограничиваются этим) CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности гипервариабельные участки, но также предполагаются изменения FR в тяжелой и/или легкой цепи. Замены предпочтительно представляют собой консервативные замены, описанные в данном документе. Предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислоты могут быть замещены в CDR, тогда как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислоты могут быть замещены в каркасных участках (FR) в зависимости от длины CDR или FR. Например, если последовательность CDR охватывает 6 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух или трех из этих аминокислот. Аналогично, если последовательность CDR охватывает 15 аминокислот, подразумевается возможность замены одной, двух, трех, четырех, пяти или шести из этих аминокислот.

Применимый способ идентификации определенных остатков или участков в конструкциях на основе антител, которые являются предпочтительными местоположениями для мутагенеза, называется "аланин-сканирующий мутагенез", описанный в Cunningham and Wells in Science, 244: 1081-1085 (1989). В данном случае идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней в пределах конструкции на основе антитела (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) и заменяют их нейтральными или отрицательно заряженными аминокислотами (наиболее предпочтительно аланином или полиаланином), влияя на взаимодействие аминокислот с эпитопом.

Затем те местоположения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к заменам, корректируют путем введения дополнительных или других вариантов в участках замен

или для них. Таким образом, хотя участок для введения варианта аминокислотной последовательности определяют предварительно, собственно природа мутации не нуждается в предварительном определении. Например, чтобы проанализировать или оптимизировать характеристики мутации в данном сайте, можно провести сканирующий аланином или случайный мутагенез в целевом кодоне или участке и провести скрининг экспрессируемых вариантов конструкции на основе антитела в отношении оптимальной комбинации требуемой активности. Методики осуществления мутаций с замещением в предварительно определенных участках в ДНК с известной последовательностью, хорошо известны, например, это мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов проводится с применением анализов антиген-связывающей активности, такой как связывание поверхностного антигена клетки-мишени или CD3.

Как правило, если аминокислоты заменены в одной или нескольких или во всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, то предпочтительно, чтобы полученная таким образом последовательность "с заменами" была на по меньшей мере 60% или 65%, более предпочтительно на 70% или 75%, еще более предпочтительно на 80% или 85% и особенно предпочтительно на 90% или 95% идентична "исходной" последовательности CDR. Это означает, что степень ее идентичности по отношению к последовательности "с заменами" зависит от длины CDR. Например, CDR, содержащая 5 аминокислот, предпочтительно является на 80% идентичной своей замещенной последовательности, чтобы по меньшей мере одна аминокислота была заменена. Соответственно, CDR конструкции на основе антитела могут иметь разную степень идентичности со своими замещенными последовательностями, например, у CDRL1 это может составлять 80%, тогда как у CDRL3 это может составлять 90%.

Предпочтительные замены (замещения) представляют собой консервативные замены. Однако предусматривается любая замена (в том числе неконсервативная замена или одна или несколько из "иллюстративных замен", перечисленных в табл. 3 ниже) при условии, что конструкция на основе антитела сохраняет свою способность к связыванию с поверхностным антигеном клетки-мишени посредством первого домена и с CD3, соответственно CD3-эпсилон, посредством второго домена и/или его CDR, характеризующихся идентичностью к такой последовательности с заменами (которая на по меньшей мере 60 или 65%, более предпочтительно на 70 или 75%, еще более предпочтительно на 80 или 85% и особенно предпочтительно на 90 или 95% идентична "исходной" последовательности CDR).

Консервативные замены приведены в табл. 3 под заглавием "предпочтительные замены". Если такие замены приводят к изменению биологической активности, тогда можно вносить более существенные изменения, обозначенные в табл. 3 как "типичные замены" или дополнительно описанные ниже с привязкой к классам аминокислот, а продукты исследовать в отношении необходимой характеристики.

Таблица 3. Аминокислотные замены

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

Существенные модификации биологических свойств конструкции на основе антитела по настояще-

му изобретению осуществляют путем выбора замен, значительно различающихся по своему эффекту в отношении поддержания (а) структуры полипептидного скелета в области замены, например, в виде листовой или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом участке или (c) объема боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки подразделяют на группы на основании общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr, asn, gln; (3) кислые: asp, glu; (4) основные: his, lys, arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены включают замену представителя одного из этих классов представителем другого класса. Любой остаток цистеина, не принимающий участия в поддержании надлежащей конформации конструкции на основе антитела, можно заменять, как правило, серином, для улучшения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения аномального перекрестного связывания. Напротив, в антитело можно добавить цистеиновую(цистеиновые) связь(связи) для улучшения его стабильности (особенно если антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Для аминокислотных последовательностей идентичность последовательности и/или подобие определяется с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательности по Smith and Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания идентичности последовательности по Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, метод поиска сходства по Pearson and Lipman, 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 85:2444, компьютеризированные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, Висконсин), программу Best Fit sequence, описанную в Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно используя стандартные настройки или путем перебора. Предпочтительно процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB, основываясь на следующих параметрах: штраф за несовпадение 1; штраф за введение гэпа 1; штраф за длину гэпа 0,33; и штраф за связывание 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером используемого алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей, используя последовательные парные выравнивания. Он также может построить дерево, показывающее кластеризационные взаимосвязи, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение способа последовательного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, J. Mol. Evol. 35:351-360; способ подобен тому, который описан в Higgins and Sharp, 1989, CABIOS 5:151-153. Используемые параметры PILEUP включают стандартный штраф за введение гэпа 3,00, стандартный штраф за удлинение гэпа 0,10 и оцениваемые концевые гэпы.

Другим примером используемого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410; Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 90:5873-5787. Особенно применимой программой BLAST является программа WU-BLAST-2, созданная Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266:460-480. В WU-BLAST-2 используются несколько параметров поиска, для большинства из которых установлены стандартные значения. Корректируемые параметры установлены со следующими значениями: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T)=II. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и устанавливаются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, по которой проводится поиск представляющей интерес последовательности; при этом данные значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

Дополнительным используемым алгоритмом является BLAST с введением гэпов согласно Altschul et al., 1993, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402. В BLAST с введением гэпов используются баллы замены BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двух хитов для инициации удлинений без введения гэпов придает удлинению гэпа k значение $10+k$; X_u установлен на 16, и X_g установлен на 40 для стадии поиска в базе данных и 67 для завершающей стадии алгоритмов. Выравнивания с введением гэпами запускаются с помощью балла, соответствующего приблизительно 22 битам.

Как правило, аминокислотная гомология, сходство или идентичность отдельных вариантов CDR или последовательностей VH/VL составляет по меньшей мере 60% с последовательностями, приведенными в данном документе, и более типично с предпочтительно увеличивающейся гомологией или идентичностью по меньшей мере 65 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75 или 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и почти 100%. Аналогичным образом "процент (%) идентичности последовательности нуклеиновой кислоты" по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты связывающих белков, определенных в настоящем документе, определяется как процент нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам в кодирующей последовательности конструкции на основе антитела. В конкретном способе используется модуль BLASTN из WU-BLAST-2 с установленными по умолчанию параметрами, с длиной перекрытия и долей перекрытия установленными на 1 и 0,125 соответственно.

Как правило, гомология, сходство или идентичность последовательностей нуклеиновых кислот ме-

жду нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные варианты CDR или последовательности VH/VL, и нуклеотидными последовательностями, приведенными в данном документе, составляет по меньшей мере 60%, и более типично с предпочтительно увеличивающейся гомологией или идентичностью, составляющей по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 и почти 100%. Таким образом, "вариантный CDR" или "вариантный участок VH/VL" является таковым с указанной гомологией, сходством или идентичностью с родительским CDR/VH/VL по настоящему изобретению и характеризуется общей биологической функцией, включая без ограничения по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% специфичность и/или активность родительского CDR или VH/VL.

В одном варианте осуществления изобретения процент идентичности с человеческой зародышевой линией конструкций на основе антител в соответствии с настоящим изобретением составляет $\geq 70\%$ или $\geq 75\%$, более предпочтительно $\geq 80\%$ или $\geq 85\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$, $\geq 95\%$ или даже $\geq 96\%$. Считается, что идентичность с генными продуктами человеческого антитела зародышевой линии является важным фактором для снижения риска того, что терапевтические белки будут вызывать иммунный ответ против лекарственного препарата у пациента во время лечения. Hwang & Foote ("Immunogenicity of engineered antibodies"; Methods 36 (2005) 3-10) демонстрируют, что уменьшение количества частей, не являющихся человеческими, в конструкциях на основе антител, являющихся лекарственными препаратами, приводит к снижению риска индукции антител к лекарственным препаратам у пациентов во время лечения. При сравнении достаточного количества клинически оцененных лекарственных препаратов на основе антител и соответствующих данных по иммуногенности, была выявлена тенденция, что гуманизация V-участков антител делает белки менее иммуногенными (в среднем для 5,1% пациентов), чем антитела, несущие неизмененные нечеловеческие V-участки (в среднем для 23,59% пациентов). Следовательно, для белковых терапевтических средств на основе V-участка в форме конструкций на основе антител необходима большая степень идентичности с человеческими последовательностями. С целью определения идентичности зародышевой линии можно проводить выравнивание V-участков VL с аминокислотными последовательностями V-сегментов и J-сегментов человеческой зародышевой линии (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>), используя программное обеспечение Vector NTI, и рассчитывать аминокислотную последовательность путем деления идентичных аминокислотных остатков на общее число аминокислотных остатков VL в процентах. То же самое можно осуществлять в отношении VH-сегментов (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) за исключением того, что CDR3 VH может быть исключена вследствие высокой степени разнообразия и отсутствия партнеров по выравниванию среди CDR3 VH человеческой зародышевой линии. Затем можно применять рекомбинантные технологии для повышения идентичности последовательностей с генами человеческого антитела зародышевой линии.

В дополнительном варианте осуществления конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению проявляют высокие выходы мономеров в стандартных условиях исследовательского масштаба, например, в стандартном двухстадийном способе очистки. Предпочтительно выход мономеров конструкций на основе антител в соответствии с изобретением составляет $\geq 0,25$ мг/л супернатанта, более предпочтительно $\geq 0,5$ мг/л, даже более предпочтительно ≥ 1 мг/л и наиболее предпочтительно ≥ 3 мг/л супернатанта.

Аналогично можно определить выход изоформ димерной конструкции на основе антитела и, следовательно, процентную долю мономера (т.е. мономер: (мономер+димер)) конструкций на основе антител. Продуктивность мономерных и димерных конструкций на основе антител и рассчитанная процентная доля мономеров могут, например, быть полученным на стадии очистки культуры от супернатанта с помощью SEC при стандартизированном получении в исследовательских масштабах в роллерных флаконах. В одном варианте реализации изобретения процентное содержание мономеров конструкций на основе антител составляет $\geq 80\%$, более предпочтительно $\geq 85\%$, даже более предпочтительно $\geq 90\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 95\%$.

В одном варианте реализации изобретения конструкции на основе антитела предпочтительно характеризуются стабильностью в плазме крови (соотношением EC_{50} с плазмой крови и EC_{50} без плазмы крови), составляющей ≤ 5 или ≤ 4 , более предпочтительно $\leq 3,5$ или ≤ 3 , даже более предпочтительно $\leq 2,5$ или ≤ 2 и наиболее предпочтительно $\leq 1,5$ или ≤ 1 . Стабильность в плазме крови конструкции на основе антитела может быть проверена путем инкубации конструкции в плазме крови человека при $37^\circ C$ в течение 24 ч с последующим определением EC_{50} в анализе цитотоксичности с высвобождением хрома. Эффекторные клетки в анализе цитотоксичности могут представлять собой стимулированные обогащенные человеческие CD8-положительные Т-клетки. Клетками-мишенями могут быть, например, клетки CHO, трансфицированные поверхностным антигеном клетки-мишени человека. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней (E:T) может быть выбрано как 10:1. Применяемый в этих целях пул человеческой плазмы крови получают из крови здоровых доноров, собранной в покрытые EDTA шприцы. Клеточные компоненты удаляют путем центрифугирования, а верхнюю фазу в виде плазмы крови собирают и после этого объединяют. В качестве контроля конструкции на основе антитела разводят непосредст-

венно перед анализом цитотоксичности в среде RPMI-1640. Стабильность в плазме крови рассчитывают как соотношение EC_{50} (после инкубации плазмы крови) и EC_{50} (контроля).

Также предпочтительно, чтобы преобразование мономеров в димеры конструкций на основе антител было низким. Степень преобразования можно определять в разных условиях и анализировать с помощью высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Например, инкубацию мономерных изоформ конструкций на основе антител можно проводить в течение 7 дней при 37°C и концентрациях, например, 100 мкг/мл или 250 мкг/мл в инкубаторе. В таких условиях предпочтительно, чтобы конструкции на основе антител по настоящему изобретению демонстрировали процентное содержание димеров $\leq 5\%$, более предпочтительно $\leq 4\%$, даже более предпочтительно $\leq 3\%$, даже более предпочтительно $\leq 2,5\%$, даже более предпочтительно $\leq 2\%$, даже более предпочтительно $\leq 1,5\%$ и наиболее предпочтительно $\leq 1\%$ или $\leq 0,5\%$ или даже 0%.

Также предпочтительно, чтобы биспецифические конструкции на основе антител по настоящему изобретению характеризовались низким уровнем преобразования в димеры после некоторого количества циклов замораживания/размораживания. Например, мономер конструкции на основе антитела доводят до концентрации 250 мкг/мл, например, в буфере генерического состава препарата и подвергали трем циклам замораживания/размораживания (замораживание при -80°C в течение 30 мин с последующим размораживанием в течение 30 мин при комнатной температуре) с последующей высокоэффективной SEC для определения процентной доли исходно мономерной конструкции на основе антитела, которая была преобразована в димерную конструкцию на основе антитела. Предпочтительно процентное содержание димеров конструкций на основе биспецифических антител составляет $\leq 5\%$, более предпочтительно $\leq 4\%$, даже более предпочтительно $\leq 3\%$, даже более предпочтительно $\leq 2,5\%$, даже более предпочтительно $\leq 2\%$, даже более предпочтительно $\leq 1,5\%$ и наиболее предпочтительно $\leq 1\%$ или даже $\leq 0,5\%$, например, после трех циклов замораживания/размораживания.

Конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению предпочтительно демонстрируют хорошую термостабильность с температурой агрегации $\geq 45^\circ\text{C}$ или $\geq 50^\circ\text{C}$, более предпочтительно $\geq 52^\circ\text{C}$ или $\geq 54^\circ\text{C}$, даже более предпочтительно $\geq 56^\circ\text{C}$ или $\geq 57^\circ\text{C}$ и наиболее предпочтительно $\geq 58^\circ\text{C}$ или $\geq 59^\circ\text{C}$. Параметр термостабильности можно определить в контексте температуры агрегации антитела следующим образом: Раствор антитела в концентрации 250 мкг/мл переносят в одноразовую кювету и помещают в устройство для исследования методом динамического рассеяния света (DLS). Образец нагревают от 40 до 70°C при скорости нагрева 0,5°C/мин с постоянным измерением определяемого радиуса. Увеличение радиуса, указывающее на плавление и агрегацию белка, используют для расчета температуры агрегации антитела.

В альтернативном варианте температурные кривые плавления можно определить методом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для определения характеристичной биофизической стабильности белка конструкций антител. Эти эксперименты проводят с использованием устройства Micro-Cal LLC (Нортхемптон, Массачусетс, США) VP-DSC. Поглощение энергии образцом, содержащим конструкцию на основе антитела, регистрируют в диапазоне от 20 до 90°C и сравнивают с образцом, содержащим только буфер для состава. Конструкции на основе антител довели до конечной концентрации 250 мкг/мл, например, в SEC подвижном буфере. Для получения соответствующей кривой плавления пошагово повышают общую температуру образца. При каждой температуре T регистрируют поглощение энергии образца и стандартного буфера для состава. Разницу в поглощении энергии C_p (ккал/моль/°C) образца минус стандарт наносят на график как зависимость от соответствующей температуры. Температуру плавления определяют как температуру в первом максимуме поглощения энергии.

Также предполагается, что конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению к поверхностному антигену клетки-мишени $\times\text{CD}3$ характеризуются определенной мутностью (измеренной при OD340 после концентрирования очищенной конструкции на основе мономерного антитела до 2,5 мг/мл и в течение ночной инкубации), составляющей $\leq 0,2$, предпочтительно $\leq 0,15$, более предпочтительно $\leq 0,12$, еще более предпочтительно $\leq 0,1$ и наиболее предпочтительно $\leq 0,08$.

В дополнительном варианте осуществления конструкция на основе антитела согласно настоящему изобретению является стабильной при кислом показателе pH. Чем более толерантно конструкция на основе антитела ведет себя при нефизиологическом показателе pH, таком как pH 5,5 (pH, который требуется для проведения, например, катионообменной хроматографии) или ниже, таком как pH 4,0-5,5, тем выше степень извлечения конструкции на основе антитела, элюированной из ионообменной колонки, относительно общего количества загруженного белка. Извлечение конструкции на основе антитела из ионообменной (например, катионной) колонки при показателе pH 5,5 составляет предпочтительно $\geq 30\%$, более предпочтительно $\geq 40\%$, более предпочтительно $\geq 50\%$, еще более предпочтительно $\geq 60\%$, еще более предпочтительно $\geq 70\%$, еще более предпочтительно $\geq 80\%$, еще более предпочтительно $\geq 90\%$, еще более предпочтительно $\geq 95\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 99\%$.

Дополнительно подразумевается, что конструкции на основе биспецифических антител по настоящему изобретению демонстрируют терапевтическую эффективность или противоопухолевую активность. Это можно оценить, например, в исследовании, как описано в следующем примере модели ксе-

нотрансплантата опухоли человека на поздней стадии.

Специалистам известно, как модифицировать или адаптировать определенные параметры этого исследования, такие как количество инъецируемых опухолевых клеток, место инъекции, количество трансплантируемых человеческих Т-клеток, предназначенное для введения количество конструкций на основе биспецифических антител и график ведения, получая при этом значимый и воспроизводимый результат. Предпочтительно ингибирование роста опухоли Т/С [%] составляет ≤ 70 или ≤ 60 , более предпочтительно ≤ 50 или ≤ 40 , даже более предпочтительно ≤ 30 или ≤ 20 и наиболее предпочтительно ≤ 10 или ≤ 5 или даже $\leq 2,5$.

В предпочтительном варианте осуществления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению конструкция на основе антитела представляет собой конструкцию на основе одноцепочечного антитела.

Также в предпочтительном варианте осуществления конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит в домене HLE в порядке от amino- к карбоксильному концу: шарнирный участок-CH2-CH3-линкер-шарнирный участок-CH2-CH3.

Также в одном варианте осуществления по настоящему изобретению домен CH2 одного или предпочтительно каждого (обоих) полипептидных мономеров третьего домена содержит внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик. Как известно в данной области техники, термин "цистеиновый дисульфидный мостик" относится к функциональной группе с общей структурой R-S-S-R. Эта связь также называется SS-связью или дисульфидным мостиком и получена путем соединения двух тиоловых групп цистеиновых остатков. Для конструкции на основе антитела по настоящему изобретению в особенности предпочтительно, чтобы цистеины, образующие цистеиновый дисульфидный мостик в зрелой конструкции на основе антитела, были введена в аминокислотную последовательность домена CH2, соответствующую положениям 309 и 321 (нумерация Kabat).

В одном варианте осуществления по настоящему изобретению удален участок гликозилирования в положении 314 по Kabat домена CH2. Предпочтительно, что это удаление участка гликозилирования достигается путем замены N314X, где X представляет собой любую аминокислоту, исключая Q. Указанная замена предпочтительно представляет собой замену N314G. В более предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению указанный домен CH2 дополнительно содержит следующие замены (положения в соответствии с Kabat): V321C и R309C (эти замены вводят внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в позициях 309 и 321 по Kabat).

Предполагается, что предпочтительные характеристики конструкции на основе антитела по настоящему изобретению по сравнению, например, с известной в данной области техники конструкцией на основе биспецифического антитела на основе гетеро-Fc (фиг. 1b) могут быть, помимо прочего, связаны с введением вышеописанных модификаций в домен CH2. Таким образом, для конструкции по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы домены CH2 в третьем домене конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержали внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в положениях 309 и 321 по Kabat, и/или участок гликозилирования в положении 314 по Kabat был удален путем замены N314X как приведено выше, предпочтительно путем замены N314G.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления по настоящему изобретению домены CH2 в третьем домене конструкции на основе антитела по настоящему изобретению содержат внутридоменный цистеиновый дисульфидный мостик в положениях 309 и 321 по Kabat, а участок гликозилирования в положении 314 по Kabat удален посредством замены N314G.

В одном варианте осуществления по настоящему изобретению предложена конструкция на основе антитела, в которой:

- (i) первый домен содержит два переменных домена антитела, и второй домен содержит два переменных домена антитела;
- (ii) первый домен содержит один переменный домен антитела, и второй домен содержит два переменных домена антитела;
- (iii) первый домен содержит два переменных домена антитела, и второй домен содержит один переменный домен антитела; или
- (iv) первый домен содержит один переменный домен антитела, и второй домен содержит один переменный домен антитела.

Соответственно, первый и второй домены могут представлять собой связывающие домены, каждый из которых содержит два переменных домена антитела, таких как домены VH и VL. Примеры таких связывающих доменов, содержащих два переменных домена антитела, были описаны выше в данном документе и включают, например, Fv-фрагменты, scFv-фрагменты или Fab-фрагменты, описанные выше в данном документе. В альтернативном варианте один или оба этих связывающих домена могут содержать только один переменный домен. Примеры для таких однодоменных связывающих доменов, которые описаны в данном документе выше и содержат, например, нанотела или с единственным переменным доменом, содержат только один переменный домен, который может быть VHH, VH или VL, что специфически связывают антиген или эпитоп независимо от других V областей или доменов.

В предпочтительном варианте реализации конструкции на основе антитела по настоящему изобретению первый и второй домены слиты с третьим доменом посредством пептидного линкера. Предпочтительный пептидный линкер был описан в данном документе выше и характеризуется аминокислотной последовательностью, представляющей собой Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly₄Ser, или ее полимеры, т.е. (Gly₄Ser)_x, где x представляет собой целое число, составляющее 1 или больше (например, 2 или 3).

В одном аспекте настоящего изобретения поверхностный антиген клетки-мишени, который связывается первым доменом, представляет собой опухолевый антиген, антиген, специфичный для иммунологического нарушения, или вирусный антиген. Под термином "опухолевый антиген", используемым в данном документе, можно понимать те антигены, которые представлены на клетках опухоли. Эти антигены могут быть презентированы на поверхности клетки внеклеточной частью, которая часто комбинируется с трансмембранной и цитоплазматической частями молекулы. Эти антигены иногда могут быть презентированы только опухолевыми клетками, но нормальными никогда. Опухолевые антигены экспрессируются исключительно на опухолевых клетках или могут представлять собой специфичную для опухоли мутацию по сравнению с нормальными клетками. В этом случае их называют опухолеспецифическими антигенами. Более распространенными являются антигены, которые презентуются опухолевыми клетками и нормальными клетками, и их называют опухолеассоциированными антигенами. Эти опухолеассоциированные антигены могут сверхэкспрессироваться по сравнению с нормальными клетками или доступны для связывания антителами в опухолевых клетках из-за менее компактной структуры опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью. Неограничивающими примерами опухолевых антигенов, используемых в данном документе, являются CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA и PSMA.

Предусматривается, что опухолевый антиген, связываемый конструкцией на основе антитела по настоящему изобретению, выбран из группы, состоящей из CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA и PSMA.

В контексте настоящего изобретения примером конструкции на основе биспецифического антитела, направленной против CD19, является конструкция на основе антитела, имеющая CDR, приведенные под SEQ ID NO: от 1 до 6. CD3-связывающий домен характеризуется CDR, приведенными под SEQ ID NO: 9-14. Конкретным примером в контексте настоящего изобретения является конструкция на основе биспецифического антитела к CD19×CD3. В контексте настоящего изобретения примером обеспечивающей HLE конструкции на основе биспецифического антитела, направленной против CD19, является конструкция на основе антитела, имеющая CDR, приведенные под SEQ ID NO: 102-104 и 106-108. Конкретным примером в контексте настоящего изобретения является конструкция на основе биспецифического антитела к BCMA×CD3. В контексте настоящего изобретения примером конструкции на основе биспецифического антитела, направленной против CD33, является конструкция на основе антитела, имеющая CDR, приведенные под SEQ ID NO: 29-31 и 34-36. Конкретным примером в контексте настоящего изобретения является конструкция на основе биспецифического антитела к CD33×CD3. В контексте настоящего изобретения примером обеспечивающей HLE конструкции на основе биспецифического антитела, направленной против CD33, является конструкция на основе антитела, имеющая CDR, приведенные под SEQ ID NO: 29-31 и 34-36. Конкретным примером в контексте настоящего изобретения является конструкция на основе биспецифического антитела к CD33×CD3, содержащая третий домен, обеспечивающий HLE. В контексте настоящего изобретения примером конструкции на основе биспецифического антитела, направленной против EGFRvIII, является конструкция на основе антитела, имеющая CDR, приведенные под SEQ ID NO: от 42 до 47. Конкретным примером в контексте настоящего изобретения является конструкция на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3.

В одном аспекте конструкция на основе антитела по настоящему изобретению характеризуется тем, что имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- (a) SEQ ID NOs: 37 до 41; CD33
- (b) SEQ ID NOs: 51 и 52; EGFRvIII
- (c) SEQ ID NOs: 62, 63 и 64; MSLN
- (d) SEQ ID NOs: 74 до 82 CDH19
- (e) SEQ ID NOs: 103 и 103 DLL3
- (f) SEQ ID NOs: 17, 113 и 114 CD19
- (g) SEQ ID NOs: 92 и 93 FLT3
- (h) SEQ ID NOs: 124 и 125 CDH3
- (i) SEQ ID NOs: 135 и 136 BCMA
- (j) SEQ ID Nos: 146 до 151, 161 до 168 и 176 до 181 PSMA

Любая из вышеупомянутых конструкций на основе биспецифических антител может быть снабжена или не снабжена третьим доменом, представляющим собой домен, увеличивающий время полужизни, который предпочтительно представляет собой scFc-домен, или гетеро-Fc-домен, или домен, связывающий альбумин.

В настоящем изобретении дополнительно представлены полинуклеотид/молекула нуклеиновой кислоты, кодирующие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению. Полинуклеотид представляет собой биополимер, состоящий из 13 или больше нуклеотидных мономеров, ковалентно связанных в цепи. ДНК (такие как кДНК) и РНК (такие как мРНК) представляют собой примеры полинуклеотидов с определенной биологической функцией. Нуклеотиды представляют собой органические молекулы, служащие в качестве мономеров или субъединиц молекул нуклеиновых кислот, таких как ДНК или РНК. Молекула нуклеиновой кислоты или полинуклеотид может быть двухцепочечной или одноцепочечной, линейной или кольцевой. Предпочтительно она содержится в векторе, который предпочтительно находится в клетке-хозяине. Указанная клетка-хозяин, например, после трансформации или трансфекции вектором или полинуклеотидом по настоящему изобретению, способна к экспрессии конструкции на основе антитела. Для этой цели полинуклеотид или молекула нуклеиновой кислоты функционально связаны с регуляторными последовательностями.

Генетический код представляет собой набор правил, посредством которого информация, закодированная в генетическом материале (нуклеиновых кислотах), транслируется в белок. Биологическая расшифровка в живых клетках осуществляется рибосомой, которая связывает аминокислоты в порядке, определяемом мРНК, используя молекулы тРНК для переноса аминокислот и для считывания тринуклеотидов мРНК за раз. Код определяет, как последовательности этих нуклеотидных триплетов, называемых кодонами, определяют, какую аминокислоту следует добавлять следующей во время синтеза белка. За некоторыми исключениями тринуклеотидный кодон в последовательности нуклеиновой кислоты определяет одну аминокислоту. Так как подавляющее большинство генов кодируется абсолютно одинаковым кодом, этот конкретный код часто называют каноническим или стандартным генетическим кодом. Хотя генетический код определяет белковую последовательность для данной кодирующей области, другие геномные участки могут влиять на то, когда и где продуцируются эти белки.

Кроме того, в настоящем изобретении представлен вектор, содержащий полинуклеотид/молекулу нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению. Вектор представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, применяемую в качестве носителя для переноса (чужеродного) генетического материала в клетку. Термин "вектор" охватывает без ограничения плазмиды, вирусы, космиды и искусственные хромосомы. Обычно сконструированные векторы содержат точку начала репликации, участок мультиклонирования и селективный маркер. Собственно вектор, как правило, представляет собой нуклеотидную последовательность, обычно последовательность ДНК, содержащую вставку (трансген) и более крупную последовательность, которая служит в качестве "остова" вектора. Современные векторы могут включать дополнительные элементы помимо вставки трансгена и скелета: промотор, генетический маркер, устойчивость к антибиотикам, репортерный ген, нацеливающую последовательность, метку для очистки белка. Векторы, называемые экспрессионными векторами (экспрессионными конструкциями) специально предназначены для экспрессии трансгена в клетке-мишени и обычно содержат регуляторные последовательности.

Выражение "регуляторные последовательности" относится к последовательностям ДНК, необходимым для экспрессии функционально связанной кодирующей последовательности в конкретном организме-хозяине. Регуляторные последовательности, подходящие для прокариот, например, включают промотор, необязательно операторную последовательность и сайт связывания рибосом. Известно, что в эукариотических клетках используются промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

Нуклеиновая кислота "функционально связана", если она размещена в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК, кодирующая препоследовательность или лидерную последовательность для секреции, функционально связана с ДНК, кодирующей полипептид, если он экспрессируется в виде белка-предшественника, участвующего в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально связаны с кодирующей последовательностью, если они влияют на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен таким образом, чтобы содействовать трансляции. Как правило, "функционально связанный" означает, что связанные последовательности ДНК являются смежными, а в случае лидерной последовательности для секреции являются смежными и находятся в фазе считывания. При этом энхансеры не должны быть смежными. Связывание осуществляется путем лигирования в удобных сайтах рестрикции. Если такие участки не существуют, используют синтетические адаптеры или линкеры в соответствии с традиционной практикой.

"Трансфекция" представляет собой процесс преднамеренного введения молекул нуклеиновой кислоты или полинуклеотидов (в том числе векторы) в клетки-мишени. Этот термин используется в основном для невирусных методик в эукариотических клетках. Трансдукцию часто используют для описания опосредованного вирусом переноса молекул нуклеиновых кислот или полинуклеотидов. Трансфекция клеток животных обычно включает открытие временных пор или "отверстий" в клеточной мембране, чтобы обеспечить захват материала. Трансфекцию можно проводить, используя фосфат кальция, путем электропорации, путем сжимания клеток или путем смешивания катионного липида с материалом для получения липосом, которые сливаются с клеточной мембраной и оставляют свой груз внутри.

Термин "трансформация" применяется для описания невирусного переноса молекул нуклеиновой

кислоты или полинуклеотидов (включая векторы) в бактерии, а также в эукариотические клетки, не являющиеся животными, включая клетки растений. Следовательно, трансформация представляет собой генетическое изменение бактериальной или не принадлежащей животному эукариотической клетки в результате прямого поглощения через клеточную(ые) мембрану(ы) из окружающей среды и последующее включение экзогенного генетического материала (молекул нуклеиновых кислот). Трансформацию можно осуществлять с помощью искусственных средств. Для того чтобы произошла трансформация, клетки или бактерии должны находиться в состоянии компетентности, которое может наступать в виде ограниченного во времени ответа на внешние условия, такие как голодание и плотность клеток.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена клетка-хозяин, трансформированная или трансфицированная полинуклеотидом/молекулой нуклеиновой кислоты или вектором по настоящему изобретению. Как применяется в данном документе, термины "клетка-хозяин" или "клетка-реципиент" предназначены для включения любой отдельной клетки или культуры клеток, которые могут быть или была/были реципиентами векторов, молекул экзогенной нуклеиновой кислоты и полинуклеотидов, кодирующих конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению; и/или реципиентами самой конструкции антитела. Введение соответствующего материала в клетку проводят путем трансформации, трансфекции и т.д. Также предполагается, что термин "клетка-хозяин" включает потомство или потенциальное потомство одной клетки. Поскольку в последующих поколениях могут иметь место определенные модификации вследствие естественной, случайной или преднамеренной мутации или вследствие влияния со стороны окружающей среды, такое потомство может в действительности быть не полностью идентичным (по морфологии или по комплексу геномной или общей ДНК) родительской клетке, но по-прежнему включаться в объем выражения, применяемого в данном документе. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические или эукариотические клетки и также включают без ограничения бактерии, клетки дрожжей, клетки грибов, клетки растений и клетки животных, такие как клетки насекомых и клетки млекопитающих, например, мышей, крыс, макак или человека.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению можно получать в бактериях. После экспрессии конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению выделяют из клеточной массы *E. coli* в растворимой фракции, и ее можно очищать посредством, например, аффинной и/или эксклюзионной хроматографии. Завершающую очистку можно проводить аналогично способу очистки антитела, экспрессируемого, например, в клетках CHO.

Кроме прокариот, эукариотические микробы, такие как нитевидные грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии конструкции на основе антитела по настоящему изобретению. *Saccharomyces cerevisiae*, или обыкновенные пекарские дрожжи, наиболее часто применяются среди низших эукариотических микроорганизмов-хозяев. Тем не менее, ряд других родов, видов и штаммов являются общедоступными и применимыми в данном документе, такие как *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы-хозяева *Kluyveromyces*, такие как *K.lactis*, *K.fragilis* (ATCC 12424), *K.bulgaricus* (ATCC 16045), *K.wickerhamii* (ATCC 24178), *K.waltii* (ATCC 56500), *K.drosophilae* (ATCC 36906), *K.thermotolerans*, и *K.marxianus*; *yarrowia* (EP 402 226); *Pichia pastoris* (EP 183 070); *Candida*; *Trichoderma reesii* (EP 244 234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такие как *Schwanniomyces occidentalis*; и нитчатые грибы, такие как *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, и штаммы-хозяева *Aspergillus*, такие как *A.nidulans* и *A.niger*.

Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированной конструкции на основе антитела по настоящему изобретению получены из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Было идентифицировано множество штаммов и вариантов бакуловирусов и соответствующие перmissive клетки-хозяева от таких насекомых-хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombux mori*. Общедоступными являются различные штаммы вирусов для трансфекции, например, вариант L-1 NPV *Autographa californica* и штамм Bm-5 NPV *Bombux mori*, и такие вирусы можно применять в данном документе в качестве вируса согласно настоящему изобретению, в частности, для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*.

Растительные клеточные культуры хлопчатника, кукурузы, картофеля, сои, петунии, томата, арабидопсиса и табака также можно использовать в качестве хозяев. Клонированные и экспрессионные векторы, применяемые для получения белков в растительной клеточной культуре, известны специалистам в данной области техники. См., например, Hiatt et al., *Nature* (1989) 342: 76-78, Owen et al. (1992) *Bio/Technology* 10: 790-794, Artsaenko et al. (1995) *The Plant J* 8: 745-750, и Fecker et al. (1996) *Plant Mol Biol* 32: 979-986.

Однако наибольший интерес представляли клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (культуре тканей) стало обычной процедурой. Примерами используемых линий клеточных хозяев от млекопитающих являются линия клеток почек обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линия эмбриональных клеток почек человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59 (1977)); клетки почек новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)); клетки Сертоли мыши (TM4, Mather, *Biol.*

Reprod. 23: 243-251 (1980)); клетки почек обезьяны (CVI, ATCC CCL 70); клетки почек африканской зеленой марышки (VERO-76, ATCC CRL1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почек собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени крысы линии Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2.1413 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL5 1); клетки TRI (Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. (1982) 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4; и линия гепатомы человека (Hep G2).

В дополнительном варианте осуществления по настоящему изобретению представлен способ получения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, при этом указанный способ предусматривает культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, и выделение полученной конструкции на основе антитела из культуры.

Используемый в данном документе термин "культивирование" относится к поддержанию, дифференцировке, росту, пролиферации и/или размножению клеток *in vitro* в подходящих условиях в культуральной среде. Термин "экспрессия" включает любую стадию, включенную в получение конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, в том числе без ограничения транскрипцию, посттранскрипционную модификацию, трансляцию, посттрансляционную модификацию и секрецию.

При применении рекомбинантных технологий конструкцию на основе антитела можно получать внутри клетки, в периплазматическом пространстве или она может секретироваться непосредственно в среду. Если конструкцию на основе антитела получают внутриклеточно, то на первой стадии дебрис в форме частиц, клетки-хозяева или лизированные фрагменты удаляют, например путем центрифугирования или ультрафильтрации. В Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992) описана процедура выделения антител, секретируемых в периплазматическое пространство *E.coli*. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенилметилсульфонилфторида (PMSF) в течение приблизительно 30 мин. Клеточный дебрис можно удалить путем центрифугирования. Если антитело секретируется в среду, образцы надосадочной жидкости из таких систем экспрессии, как правило, вначале концентрируют с применением коммерчески доступного фильтра для концентрирования белков, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. На любой из предыдущих стадий может быть включен ингибитор протеазы, такой как PMSF, для ингибирования протеолиза, и могут быть включены антибиотики для предотвращения роста случайно занесенных загрязнителей.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, полученную из клеток-хозяев, можно выделять или очищать, используя, например, хроматографию на гидроксилapatите, гель-электрофорез, диализ и аффинную хроматографию. Также доступны другие методики очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-сефарозе (SEPHAROSE™), хроматография на анионообменной или катионообменной смоле (как например, в колонке с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония в зависимости от антитела, которое необходимо извлечь. Если конструкция на основе антитела по настоящему изобретению содержит домен CN3, для ее очистки применяют смолу Bakerbond ABX (J.T. Baker, Филлипсберг, Нью-Джерси).

Аффинная хроматография является предпочтительной методикой очистки. Матрица, к которой присоединяется аффинный лиганд, наиболее часто является агарозой, но также доступны другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемым размером пор или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают большую скорость потока и меньшее время обработки по сравнению с агарозой.

Кроме того, в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, содержащая конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению или конструкцию на основе антитела, полученную в соответствии со способом по настоящему изобретению. Для фармацевтической композиции по настоящему изобретению предпочтительно, чтобы гомогенность конструкции на основе антитела составляла $\geq 80\%$, более предпочтительно $\geq 81\%$, $\geq 82\%$, $\geq 83\%$, $\geq 84\%$ или $\geq 85\%$, еще более предпочтительно $\geq 86\%$, $\geq 87\%$, $\geq 88\%$, $\geq 89\%$ или $\geq 90\%$, еще более предпочтительно $\geq 91\%$, $\geq 92\%$, $\geq 93\%$, $\geq 94\%$ или $\geq 95\%$ и наиболее предпочтительно $\geq 96\%$, $\geq 97\%$, $\geq 98\%$ или $\geq 99\%$.

Применяемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции для введения пациенту, предпочтительно пациенту-человеку. В частности, предпочтительная фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит одну или множество конструкций на основе антител по настоящему изобретению, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве. Предпочтительно фармацевтическая композиция дополнительно содержит подходящие составы одного или нескольких (фармацевтически эффективных) носителей, стабилизаторов, вспомогательных веществ, разбавителей, солюбилизаторов, поверхностно-активных веществ, эмульгаторов, консервантов и/или адьювантов. Приемлемые составляющие компоненты композиции предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические компози-

ции по настоящему изобретению включают без ограничения жидкие, замороженные и лиофилизированные композиции.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать фармацевтически приемлемый носитель. В целом применяемый в данном документе "фармацевтически приемлемый носитель" означает какие-либо и все водные и неводные растворы, стерильные растворы, растворители, буферы, например, фосфатно-буферные солевые растворы (PBS), воду, суспензии, эмульсии, такие как эмульсии типа масло/вода, различные типы смачивающих средств, липосомы, дисперсионные среды и покрытия, которые совместимы с фармацевтическим введением, в частности с парентеральным введением. Применение таких сред и средств в фармацевтических композициях хорошо известно в данной области техники, а композиции, содержащие такие носители, можно составлять с помощью хорошо известных стандартных способов.

В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению представлены фармацевтические композиции, содержащие конструкцию на основе антигена по настоящему изобретению и дополнительно одно или более вспомогательных веществ, таких как те, которые в иллюстративных целях описаны в данном разделе и в другом месте данного документа. В этом отношении в настоящем изобретении могут применяться вспомогательные вещества для широкого спектра целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, таких как регулирование вязкости, и/или способы по настоящему изобретению, предназначенные для повышения эффективности и/или стабилизации таких составов, и способы, направленные против деградации и ухудшения качества, например, по причине стрессов, возникающих в ходе изготовления, доставки, хранения, подготовки перед использованием, введения и после него.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать материалы состава, предназначенные для изменения, поддержания или сохранения, например, показателя pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проникновения композиции (см., REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th Edition, (A.R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company). В таких вариантах осуществления подходящие материалы для состава могут включать без ограничения

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

противомикробные средства, такие как антибактериальные и противогрибковые средства;

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

буферы, буферные системы и буферные средства, которые используются для поддержания композиции при pH приблизительно 5,5-7,5, предпочтительно 6,5-7; примерами буферов являются борат, цитраты, фосфаты или другие органические кислоты, сукцинат, фосфат, гистидин и ацетат;

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

водные носители, в том числе вода, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе физиологический раствор и забуференные среды;

биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры;

объемобразующие средства, такие как маннит или глицин;

хелатообразующие средства, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA);

изотонические и задерживающие абсорбцию средства;

комплексообразующие средства, такие как кофеин, поливинилпирролидон, бета-циклодекстрин или гидроксипропил-бета-циклодекстрин;

наполнители;

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

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

красители и ароматизаторы;

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

разбавители;

эмульгаторы;

гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон;

солеобразующие противоионы, такие как натрий;

консерванты, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатообразующие средства, инертные газы и т.п.; примерами являются бензалкония хлорид, бензойная кислота, салициловая кислота,

тиомерсал, фенетиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлоргексидин, сорбиновая кислота или перекись водорода;

комплексы металлов, такие как комплексы Zn-белок;

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

сахара и сахарные спирты, такие как трегалоза, сахароза, октасульфат, маннит, сорбит или ксилит, стахиоза, манноза, сорбоза, ксилоза, рибоза, миоинозитола, галактоза, лактит, рибит, миоинозит, галактит, глицерин, циклиты (например, инозит), полиэтиленгликоль и многоатомные сахарные спирты;

суспендирующие средства;

поверхностно-активные вещества или смачивающие средства, такие как плуроники, PEG, сложные эфиры сорбита, полисорбаты, такие как полисорбат 20, полисорбат, тритон, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал; поверхностно-активные вещества могут быть детергентами, предпочтительно с молекулярной массой > 1,2 кДа, и/или полиэфиром, предпочтительно с молекулярной массой > 3 кДа; неограничивающими примерами предпочтительных детергентов являются Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80 и Tween 85; неограничивающими примерами предпочтительных полиэфиров являются PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 и PEG 5000;

средства, повышающие стабильность, такие как сахароза или сорбит;

средства, повышающие тоничность, такие как галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит, сорбит;

среды-носители для парентеральной доставки, в том числе раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстроза и хлорид натрия, раствор Рингера с лактатом или нелетучие масла;

среды-носители для внутривенной доставки, в том числе средства пополнения жидкости и питательных веществ, средства пополнения электролитов (например, основанные на растворе Рингера с декстрозой).

Для специалистов в данной области техники очевидно, что разные составляющие компоненты фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут выполнять разную функцию, например, аминокислота может действовать в качестве буфера, стабилизатора и/или антиоксиданта; маннит может действовать в качестве объемобразующего средства и/или средства, повышающего тоничность; хлорид натрия может действовать в качестве средства для доставки и/или средства, повышающего тоничность.

Подразумевается, что композиция по настоящему изобретению может содержать в дополнение к определенному в данном документе полипептиду по настоящему изобретению дополнительные биологически активные средства в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такие средства могут представлять собой лекарственные средства, действующие на желудочно-кишечный тракт, лекарственные средства, действующие в качестве цитостатических средств, лекарственные средства, предупреждающие гиперурикемию, лекарственные средства, подавляющие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительную реакцию, лекарственные средства, действующие на кровеносную систему, и/или средства, такие как цитокины, известные в данной области техники. Также предусматривается, что конструкция на основе антитела по настоящему изобретению применяется в качестве комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другим противораковым лекарственным препаратом.

В некоторых вариантах осуществления оптимальная фармацевтическая композиция будет определена специалистом в данной области техники в зависимости, например, от способа введения, формата доставки и требуемой дозировки. См., например, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, выше. В определенных вариантах осуществления по настоящему изобретению такие композиции могут влиять на физическое состояние, стабильность, скорость *in vivo* высвобождения и скорость *in vivo* выведения конструкции антитела согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления основная среда-носитель или основной носитель в фармацевтической композиции может быть либо водным, либо неводным по своей природе. Например, подходящей средой-носителем или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными примерами сред-носителей. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе антитела по настоящему изобретению композиции может быть подготовлена для хранения посредством смешивания выбранной композиции, обладающей требуемой степенью чистоты, с необязательными средствами для составления (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, см. выше) в виде лиофилизированной массы или водного раствора. Кроме того, в определенных вариантах осуществления конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению можно получать в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества, такие как сахароза.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции для применения в настоящем изобретении можно получать в виде апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего необходимую конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в фармацевтически приемлемой среде-носителе. В частности, подходящей средой-носителем

для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой конструкцию на основе антитела согласно изобретению готовят в виде стерильного, изотонического раствора, сохраняемого должным образом. В некоторых вариантах осуществления получение может включать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством инъекции вещества замедленного всасывания. В некоторых вариантах осуществления также может быть использована гиалуроновая кислота, обладающая эффектом обеспечения пролонгированного действия в системном кровотоке. В конкретных вариантах осуществления имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут быть использованы для введения требуемой конструкции на основе антитела.

Дополнительные фармацевтические композиции очевидны для специалистов в данной области техники, включая составы, содержащие конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению в составах для замедленного высвобождения или контролируемых доставки/высвобождения. Также специалистам в данной области техники известны способы составления ряда других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы, а также инъекционные вещества замедленного всасывания. См., например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (как описано в патенте США № 3773919 и публикации европейской заявки на патент № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, *Biopolymers* 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 и Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту (публикация заявки на европейский патент EP № 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены посредством любого из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:3688-3692; публикации заявок на европейский патент № EP 036676; EP 088046 и EP 143949.

Конструкцию на основе антитела также заключать в микрокапсулы, получаемые, например, с помощью методик коацервации или с помощью полимеризации на границе раздела фаз (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из полиметилметакрилата, соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, представлены в виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации с помощью стерильных фильтрационных мембран. Если композиция лиофилизирована, то стерилизация с помощью данного способа может быть выполнена либо до лиофилизации и восстановления, либо после них. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Как правило, парентеральные композиции помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Другой аспект изобретения включает самобуферизирующиеся составы конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, которые можно использовать как фармацевтические композиции, что описано в международной патентной заявке WO 06138181 A2 (PCT/US2006/022599). Различные экспозиции доступны в материалах и способах стабилизации белка и составления, полезных в этом отношении, таких как Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution" в: *RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE*, Carpenter and Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002), и Randolph et al., "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), в частности, смотрите части, относящиеся к вспомогательным веществам и связанным с ними процессам для самобуферизирующихся белковых составов в соответствии с данным изобретением, в особенности к белковым фармацевтическим продуктам и процессам для применений в ветеринарии и/или медицине человека.

Соли могут быть использованы в соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению с целью, например, регулирования ионной силы и/или изотоничности состава и/или улучшения растворимости и/или физической стабильности белка или другого ингредиента композиции в соответствии с настоящим изобретением. Хорошо известно, что ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимо-

действий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и за счет этого предотвращать или уменьшать агрегацию и нерастворимость белка.

Ионные соединения существенно различаются по своему воздействию на белки. Был разработан ряд категориальных градаций ионов и их влияний на белки, которые можно применять в составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров является ряд Хофмейстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для протезирования зубов и/или для солиubilизации белков ("всаливания"). Относительная эффективность ионов к "всаливанию" и "высаливанию" определяет их положение в ряде Хофмейстера.

Свободные аминокислоты можно использовать в составах конструкции на основе антитела по настоящему изобретению в соответствии с различными вариантами осуществления по настоящему изобретению в качестве объемобразующих средство, стабилизаторов и антиоксидантов, а также для других стандартных вариантов применения. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин применим в лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств лиофилизованной массы. Аргинин может быть применим для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизованных составах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта.

Полиолы включают сахара, например маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и для целей обсуждения в данном документе полиэтиленгликоль (PEG) и родственные ему вещества. Полиолы являются космотропными. Они представляют собой применимые стабилизирующие средства как в жидких, так и в лиофилизованных составах для защиты белков от физических и химических процессов деградации. Полиолы также применимы для регулирования тоничности составов. В число полиолов, применимых в некоторых вариантах осуществления по настоящему изобретению, входит маннит, обычно применяемый для обеспечения структурной стабильности массы в лиофилизованных готовых формах. Это обеспечивает структурную стабильность массы. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются одними из предпочтительных средств для регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, обусловленных замерзанием-оттаиванием, в ходе транспортировки или получения сыпучих материалов в процессе производства. Восстанавливающие сахара (которые содержат свободные альдегидные или кетонные группы), такие как глюкоза и лактоза, могут гликировать поверхностные остатки лизина и аргинина. Следовательно, они обычно не входят в число предпочтительных полиолов для применения в соответствии с изобретением. Кроме того, сахара, которые образуют такие реакционноспособные соединения, такие как сахароза, которая гидролизует до фруктозы и глюкозы в кислых условиях, и, следовательно, вызывает гликирование, также не входят в число предпочтительных полиолов по настоящему изобретению в этом отношении. PEG применим для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и может в этом отношении применяться в настоящем изобретении.

Варианты осуществления составов конструкции на основе антитела по настоящему изобретению дополнительно предусматривают поверхностно-активные вещества. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно обратно пропорциональны концентрации белка. Как правило, эти вредные взаимодействия обратно пропорциональны концентрации белка и обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим при транспортировке и манипуляции с продуктом. Поверхностно-активные вещества обычно применяются для предотвращения, минимизации или уменьшения поверхностной адсорбции. Применимые поверхностно-активные вещества в настоящем изобретении в этом отношении включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и сорбитанполиэтоксилатов и полоксамер 188. Поверхностно-активные вещества также обычно применяются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для белка, поскольку любое указанное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты чувствительны к окислительной деградации и, зачастую, при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует применять осторожно, и при их применении следует их использовать в наименьшей эффективной концентрации. В этом отношении полисорбаты служат примером общего правила, согласно которому вспомогательные вещества следует применять в их наименьших эффективных концентрациях.

Варианты осуществления составов конструкции на основе антитела по настоящему изобретению

дополнительно предусматривают антиоксиданты. В некоторой степени вредное окисление белков может быть предотвращено в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и предупреждения воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предотвращения окислительной деградации белков. К числу применимых антиоксидантов в этом отношении относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно являются водорастворимыми и сохраняют свою активность в течение всего срока годности продукта. EDTA является предпочтительным антиоксидантом в соответствии с настоящим изобретением в этом отношении. Антиоксиданты могут повреждать белки. Например, восстанавливающие средства, такие как глутатион в частности, могут нарушать внутримолекулярные дисульфидные связи. Таким образом, антиоксиданты для применения в настоящем изобретении выбраны среди прочих для устранения или достаточного уменьшения возможности повреждения белков в составе.

Составы в соответствии с настоящим изобретением могут включать ионы металлов, которые являются белковыми кофакторами и которые необходимы для образования белковых координационных комплексов, таких как цинк, необходимый для образования определенных суспензий инсулина. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки. Ионы магния (10-120 мМ) могут быть использованы для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако Mg^{+} , Mn^{+} и Zn^{+} могут дестабилизировать rhDNase. Аналогичным образом, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может быть дестабилизирован ионами Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов Al^{+3} .

Описанные в данном документе конструкции на основе антител также можно составить в виде имунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которая применима для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно имеют бислойную структуру, аналогичную липидной структуре биологических мембран. Липосомы, содержащие конструкцию на основе антитела, получают с помощью способов, известных в данной области техники, таких как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); в патентах США № 4485045 и 4544545; и WO 97/38731. Липосомы с увеличенным временем циркуляции в кровотоке раскрыты в патенте США № 5013556. С помощью способа обращенно-фазового выпаривания можно получить особенно применимые липосомы, в липидном составе которых содержатся фосфатидилхолин, холестерин и PEG-derivatизированный фосфатидилэтанолламин (PEG-PE). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор с получением липосом желаемого диаметра. Fab'-фрагменты конструкции на основе антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтическое средство, см. Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

После того как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла либо в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением.

Биологическую активность фармацевтической композиции, определенной в данном документе, можно определить, например, с помощью анализов цитотоксичности, описанных в следующих примерах, в WO 99/54440 или в Schlereth et al. (Cancer Immunol. Immunother. 20 (2005), 1-12). Термин "эффективность" или "in vivo эффективность", применяемый в данном документе, относится к ответу на терапию фармацевтической композицией по настоящему изобретению с применением, например, стандартизированных критериев ответа NCI. Успех или in vivo эффективность терапии с применением фармацевтической композиции по настоящему изобретению относится к эффективности композиции в отношении предполагаемой для нее задачи, т.е. способности композиции достигать требуемого эффекта, т.е. уничтожения патологических клеток, например, опухолевых клеток. In vivo эффективность можно контролировать с помощью общепринятых стандартных способов для соответствующих нозологических форм, включая без ограничения определение количества лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, сортировку клеток с активированной флуоресценцией, забор костного мозга. В дополнение можно использовать клиничко-химические параметры, специфические для конкретного заболевания, а также другие общепринятые стандартные способы. Кроме того, можно использовать компьютерную томографию, рентгеновское исследование, ядерную магнитно-резонансную томографию (например, для оценки ответа на основании критериев Национального института рака [Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B., Shipp M.A., Fisher R.I., Connors J.M., Lister T.A., Vose J., Grillo-Lopez A., Hagenbeek A., Cabanillas F., Klippenstein D., Hidde-mann W., Castellino R., Harris N.L., Armitage J.O., Carter W., Hoppe R., Canellos G.P. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International

Working Group. *J Clin Oncol.* 1999 Apr; 17(4): 1244]), позитронно-эмиссионное томографическое сканирование, подсчет количества лейкоцитов, определение лейкоцитарной формулы, сортировку клеток с активированной флуоресценцией, аспирацию костного мозга, исследования биоптатов/гистосрезов лимфатических узлов и различные клинико-химические показатели, специфические для лимфомы (например, уровень лактатдегидрогеназы), а также другие общепринятые стандартные способы.

Другой значительной проблемой в разработке лекарственных средств, таких как фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, является прогнозируемое модулирование фармакокинетических свойств. В связи с этим можно установить фармакокинетический профиль лекарственного средства-кандидата, т.е. профиль фармакокинетических параметров, влияющих на способность конкретного лекарственного средства к лечению указанного состояния. Фармакокинетические параметры лекарственного средства, влияющие на способность лекарственного средства к лечению определенной нозологической формы, включают без ограничения: период полувыведения, объем распределения, метаболизм при первом прохождении через печень и степень связывания с белками сыворотки крови. На эффективность указанного лекарственного средства может влиять любой из показателей, упомянутых выше.

"Период полужизни" означает время, когда 50% введенного лекарственного средства элиминируется посредством биологических процессов, например, метаболизма, экскреции и т.д. Под "метаболизмом первого прохождения в печени" подразумевается склонность препарата к метаболизму при первом контакте с печенью, т.е. в ходе его первого прохождения через печень. "Объем распределения" означает степень удержания лекарственного средства в различных компартментах организма, таких как, например, внутриклеточное и внеклеточное пространство, ткани и органы и т.п., и распределение лекарственного средства в этих компартментах. "Степень связывания с белками сыворотки крови" означает способность лекарственного средства к взаимодействию и связыванию с белками сыворотки крови, такими как альбумин, что приводит к уменьшению или потере биологической активности лекарственного средства.

Фармакокинетические параметры также включают биодоступность, лаг-период (T_{lag}), T_{max} , скорость всасывания, начало действия и/или C_{max} для заданного количества вводимого лекарственного препарата. "Биологическая доступность" означает количество лекарственного средства в компартменте крови. "Лаг-период" означает задержку по времени между введением лекарственного средства и его выявлением и измеримостью в крови или плазме крови. " T_{max} " представляет собой время, за которое достигается максимальная концентрация лекарственного средства в крови, а " C_{max} " представляет собой максимальную концентрацию в крови, которой достигает указанное лекарственное средство. На время, необходимое для достижения концентрации лекарственного средства в крови или ткани, которая требуется для биологического действия, влияют все параметры. Фармакокинетические показатели конструкций на основе биспецифических антител, проявляющих межвидовую специфичность, которые можно определить в доклиническом тестировании на животных с вовлечением приматов, отличных от шимпанзе, как указано выше, также изложены, например, в публикации Schlereth et al. (*Cancer Immunol. Immunother.* 20 (2005), 1-12).

В предпочтительном аспекте настоящего изобретения фармацевтическая композиция является стабильной в течение по меньшей мере четырех недель при приблизительно -20°C . Как очевидно из прилагающихся примеров, качество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению по сравнению с качеством соответствующих существующему уровню техники конструкций на основе антител можно исследовать, используя разные системы. Предполагается, что эти тесты соответствуют "ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C and Specifications: Test procedures and Acceptance Criteria for Biotech Biotechnological/Biological Products Q6B", и таким образом выбраны для обеспечения профиля, указывающего на стабильность, который обеспечивает уверенность в том, что выявляются изменения в идентичности, чистоте и эффективности продукта. Является общепринятым, что термин чистота является относительным термином. Вследствие действия гликозилирования, дезамидирования или другой гетерогенности абсолютную чистоту биотехнологического/биологического продукта, как правило, следует оценивать с помощью более чем одного способа, а полученное значение чистоты зависит от способа. В целях испытания стабильности исследования в отношении чистоты должны фокусироваться на способах определения продуктов деградации.

Для оценки качества фармацевтической композиции, содержащей конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, можно проводить анализ, например, анализ содержания растворимых агрегатов в растворе (HMWS, оцениваемые с помощью эксклюзионной хроматографии). Предпочтительно, чтобы стабильность в течение по меньшей мере четырех недель при приблизительно -20°C характеризовалась содержанием менее 1,5% HMWS, предпочтительно менее 1% HMWS.

Другие примеры оценки стабильности конструкции на основе антитела по настоящему изобретению в форме фармацевтической композиции приведены в прилагающихся примерах 4-12. В этих примерах варианты осуществления конструкций на основе антител по настоящему изобретению исследуют в отношении разных стрессовых условий в разных фармацевтических готовых формах, а результаты сравнивают с другими удлинными временем полужизни (HLE) форматами конструкций на основе биспецифической антитела, рекрутирующей T-клетки, которые известны в данной области техники. В целом предусматривается, что конструкции на основе антител, обеспеченные специфической формой FC-

домена согласно настоящему изобретению обычно более стабильны в широком диапазоне стрессовых условий, таких как температурный и световой стресс, по сравнению с конструкциями на основе антител, предоставленными с различными форматами HLE и без какого-либо формата HLE них (например, "канонические" конструкции на основе антител). Указанная температурная стабильность может относиться как к пониженной (ниже комнатной температуры, включая замораживание), так и к повышенной (выше комнатной температуры, включая температуры до или выше температуры тела) температуре. Специалисту в данной области техники понятно, что такая улучшенная стабильность в отношении стресса, которого трудно избежать при практической реализации в клинических условиях, делает конструкцию на основе антитела более безопасной, так как при практической реализации в клинических условиях возникает меньше продуктов деградации. Соответственно, указанная повышенная стабильность означает повышенную безопасность.

Водородно-дейтериевый обмен (HDX) - это химическая реакция, в которой ковалентно связанный атом водорода заменяется атомом дейтерия или наоборот. Его легче всего применять в отношении заменяемых протонов и дейтронов, где такое превращение происходит в присутствии подходящего источника дейтерия без какого-либо катализатора. Способ дает информацию о доступности для растворителя различных частей молекулы и, следовательно, о третичной структуре белка.

Один вариант осуществления предусматривает конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению или конструкцию на основе антитела, полученную согласно способу по настоящему изобретению, для применения в профилактике, лечении или уменьшении тяжести пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, вирусного заболевания или нарушения иммунной системы.

Описанные в данном документе составы применимы в качестве фармацевтических композиций в лечении, уменьшении тяжести и/или предотвращении описанного в данном документе патологического состояния у нуждающегося в этом пациента. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Лечение включает применение или введение состава в организм, выделенную ткань или клетку пациента, у которого имеется заболевание/нарушение, симптом заболевания/нарушения или предрасположенность к заболеванию/нарушению, с целью лечения, излечения, смягчения, облегчения, изменения, исправления, уменьшения тяжести, улучшения или воздействия на заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Термин "уменьшение интенсивности", применяемый в данном документе, относится к улучшению болезненного состояния пациента, имеющего опухоль, или рак, или метастатический рак, как указано в данном документе ниже, путем введения конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту. Такое улучшение может также рассматриваться как замедление или остановка прогрессирования опухоли, или рака или метастатического рака у пациента. Термин "предусматривает", применяемый в данном документе, означает предотвращение возникновения или повторного возникновения у пациента, имеющего опухоль, или рак, или метастатический рак, как указано в данном документе ниже, путем введения конструкции на основе антитела согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом субъекту.

Термин "заболевание" относится к любому состоянию, для которого будет полезно лечение с помощью конструкции на основе антитела или фармацевтической композиции, описанных в данном документе. Он включает хронические и острые нарушения или заболевания, включая те патологические состояния, которые являются причиной предрасположенности млекопитающего к рассматриваемому заболеванию.

"Новообразование" представляет собой аномальный рост ткани, как правило, но не всегда, образующий опухолевую массу. Когда также образуется масса, ее обычно называют "опухолью". Новообразования или опухоли могут быть доброкачественными, потенциально злокачественными (предраковыми) или злокачественными. Злокачественные новообразования обычно называют раком. Они обычно инвазируют и разрушают окружающую ткань и могут образовывать метастазы, т.е. они распространяются в другие части, ткани или органы тела. Следовательно, термин "метастатический рак" охватывает метастазы в другие ткани или органы, отличные от происхождения опухоли. Лимфомы и лейкозы являются лимфоидными новообразованиями. Для целей настоящего изобретения они также охватываются терминами "опухоль" или "рак".

Термином "вирусное заболевание" описываются заболевания, которые являются результатом вирусной инфекции у субъекта.

Термином "иммунологическое нарушение", применяемым в данном документе, описываются в соответствии с общим определением этого термина иммунологические нарушения, такие как аутоиммунные заболевания, гиперчувствительность, иммунодефициты.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает способ лечения или уменьшения тяжести пролиферативного заболевания, опухолевого заболевания, вирусного заболевания или нарушения иммунной системы, предусматривающий стадию введения нуждающемуся в этом субъекту конструкции на основе антитела по настоящему изобретению или полученному согласно способу по настоящему изобретению.

Термины "нуждающийся в лечении субъект" или "нуждающийся в лечении" включает тех, у кого

уже есть нарушение, а также тех, у кого нарушение должно быть предотвращено. Нуждающийся субъект или "пациент" включает людей или других млекопитающих субъектов, которые получают профилактическое или терапевтическое лечение.

Конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, как правило, конструируют для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок и частоты введения, для конкретных вариантов лечения конкретных заболеваний, с определенными диапазонами биодоступности и способности сохранения в организме, помимо прочего. Материалы для композиции предпочтительно готовят в концентрациях, которые являются приемлемыми для данного участка введения.

Таким образом, готовые составы и композиции могут быть получены в соответствии с изобретением для доставки любым подходящим путем введения. В контексте настоящего изобретения пути введения предпочтительно представляют собой парентеральные пути (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, интрацеребральный, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставный, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, интравезикулярный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновиальный, внутрипросветный).

Фармацевтические композиции и конструкции на основе антител по настоящему изобретению в особенности применимы для парентерального введения, например подкожной или внутривенной доставки, например, путем инъекции, такой как болюсная инъекция, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия. Фармацевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

В частности, в данном изобретении предусмотрено непрерывное введение подходящей композиции. В качестве неограничивающего примера непрерывное или по сути непрерывное, т.е. продолжительное введение можно осуществлять с помощью небольшой насосной системы, носимой пациентом, для дозирования подачи терапевтического средства в организм пациента. Фармацевтическую композицию, содержащую конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, можно вводить, используя указанные насосные системы. В целом такие насосные системы известны в данной области техники, а их работа обычно основана на периодической замене картриджей, содержащих предназначенное для инфузии терапевтическое средство. Замена картриджа в такой насосной системе влечет за собой временное прерывание или какое-либо иное прерывание потока терапевтического средства в организм пациента. В таком случае фаза введения перед заменой кассеты и фаза введения после замены кассеты по-прежнему будут подпадать в определение фармацевтических средств и способов по настоящему изобретению, состоящих вместе одно "непрерывное введение" такого терапевтического средства.

Продолжительное или непрерывное введение конструкций на основе антитела по настоящему изобретению может быть внутривенным или подкожным и может осуществляться посредством устройства для доставки жидкости или небольшой насосной системы, включающей механизм подачи жидкости для подачи жидкости из резервуара и приводной механизм для приведения в действие механизма подачи. Насосные системы для подкожного введения могут включать иглу или канюлю для проникновения через кожу пациента и доставки подходящей композиции в организм пациента. Указанные насосные системы могут быть напрямую прикреплены или присоединены к коже пациента независимо от расположения вен, артерий и кровяных сосудов, за счет чего обеспечивается непосредственный контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть присоединена к коже пациента в течение от 24 ч до нескольких суток. Насосная система может иметь небольшой размер с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для введения подходящей фармацевтической композиции может составлять от 0,1 до 50 мл.

Продолжительное введение также может осуществляться трансдермальным путем посредством пластыря, носимого на коже и заменяемого через определенные интервалы времени. Специалисту в данной области техники известны подходящие для этой цели системы на основе пластырей для доставки лекарственного средства. Следует отметить, что трансдермальное введение особенно подходит для непрерывного введения, так как замену первого использованного пластыря можно преимущественно осуществлять одновременно с размещением нового второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно вблизи первого использованного пластыря и непосредственно перед удалением первого использованного пластыря. Проблем с прерыванием потока или прекращением действия питающей ячейки не возникает.

Если фармацевтическая композиция была лиофилизована, то лиофилизованный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лиофилизованный материал можно восстанавливать, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWFI), физиологическом солевом растворе, фосфатно-солевом буфере (PBS) или в том самом составе, в котором белок находился перед лиофилизацией.

Композиции по настоящему изобретению можно вводить субъекту в подходящей дозе, которую

можно определить, например, с помощью исследований с повышением дозы путем введения возрастающих доз описанной в данном документе конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, демонстрирующей межвидовую специфичность, отличным от шимпанзе приматам, например макакам. Как указано выше, описанную в данном документе конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, демонстрирующую межвидовую специфичность, преимущественно можно использовать в идентичной форме в доклинических исследованиях на отличных от шимпанзе приматах и в качестве лекарственного средства на людях. Режим дозирования определяется лечащим врачом и клиническими факторами. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, в том числе от размеров тела, площади поверхности тела, возраста пациента, конкретного соединения, подлежащего введению, пола, времени и пути введения, общего состояния здоровья и других лекарственных средств, вводимых совместно.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для излечения или по меньшей мере частичного прерывания заболевания и его осложнений у пациента, который уже страдает от заболевания. Количества или дозы, эффективные для этого применения, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению (показания), доставляемой конструкции на основе антитела, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтическое средство, путь введения, размеры (вес тела, поверхность тела или размер органа) и/или состояние (возраст и общее состояние здоровья) пациента и общее состояние собственной иммунной системы пациента. Надлежащую дозу можно корректировать в соответствии с решением лечащего врача так, чтобы ее можно было вводить пациенту за один раз или посредством серии введений и с целью получения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная дозировка может находиться в диапазоне от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 30 мг/кг или больше в зависимости от вышеупомянутых факторов. В конкретных вариантах реализации изобретения дозировка может находиться в диапазоне от 1,0 мкг/кг до приблизительно 20 мг/кг, оптимально от 10 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг.

Терапевтически эффективное количество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты или длительности бессимптомных периодов или предотвращению нарушений или недееспособности вследствие поражения заболеванием. Для лечения клеток-мишеней антиген-экспрессирующих опухолей терапевтически эффективное количество конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, например, конструкции на основе антитела к антигену клетки-мишени/против CD3, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли на по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80% или по меньшей мере приблизительно 90% относительно нелеченных пациентов. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить в модели на животных, прогностической в отношении эффективности.

Фармацевтическую композицию можно вводить в виде единственного терапевтического средства или в комбинации с дополнительными терапевтическими средствами, такими как противораковая терапия, в случае необходимости, например, другими белковыми и небелковыми лекарственными препаратами. Эти лекарственные препараты можно вводить одновременно с композицией, содержащей определенную в данном документе конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению, или отдельно, до или после введения указанной конструкции на основе антитела в определенные временные интервалы и в определенных дозах.

Термин "эффективная и нетоксичная доза", применяемый в данном документе, относится к переносимой дозе конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, достаточно высокой для того, чтобы вызвать элиминацию патологических клеток, устранение опухоли, уменьшение размеров опухоли или стабилизацию заболевания без или по сути без значительных токсических эффектов. Такие эффективные и нетоксичные дозы можно определить, например, с помощью исследований с повышением дозы, описанных в данной области техники, и они должны быть ниже дозы, индуцирующей серьезные нежелательные побочные явления (дозолимитирующая токсичность, DLT).

Термин "токсичность", применяемый в данном документе, относится к токсическим эффектам лекарственного средства, проявляющимся в виде нежелательных явлений или серьезных нежелательных явлений. Эти побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости лекарственного средства в целом и/или отсутствию локальной переносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенное или карциногенное действие, вызываемое лекарственным средством.

Термин "безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость", применяемый в данном документе, определяет введение лекарственного средства без индукции серьезных нежелательных явлений непосредственно после введения (местная переносимость) и в течение более длительного периода применения лекарственного средства. "Безопасность", "in vivo безопасность" или "переносимость" можно оценивать, например, через равные промежутки времени в ходе периода лечения и последующего на-

блюдения. Измерения включают клиническую оценку, например, проявления во внутренних органах, и исследование отклонений от нормальных лабораторных показателей. Можно проводить клиническую оценку и записывать/зашифровывать отклонения от нормальных результатов в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Проявления во внутренних органах могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и тому подобное, как описано, например, в общих терминологических критериях нежелательных явлений v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые можно исследовать, включают, например, гематологические показатели, клиническую химию, профиль коагуляции и анализ мочи, а также исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка крови, плазма крови, лимфатическая или спинномозговая жидкость, ликвор и им подобное. Таким образом, безопасность можно оценить, например, посредством физического осмотра, методик визуализации (т.е. ультразвукового исследования, рентгеновского исследования, КТ-сканирования, магнито-резонансной томографии (МРТ), других измерений с помощью технических устройств (т.е. электрокардиограммы), показателей жизнедеятельности, путем измерения лабораторных параметров и записи нежелательных явлений. Например, нежелательные явления у отличных от шимпанзе приматов в вариантах применения и способах по настоящему изобретению можно исследовать с помощью гистопатологических и/или гистохимических.

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

И наконец, в настоящем изобретении представлен набор, содержащий конструкцию на основе антитела по настоящему изобретению или полученную в соответствии со способом по настоящему изобретению, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению, полинуклеотид по настоящему изобретению, вектор по настоящему изобретению и/или клетку-хозяина по настоящему изобретению.

В контексте настоящего изобретения, термин "набор" означает два или более компонентов, один из которых соответствует конструкции на основе антитела, фармацевтической композиции, вектору или клетке-хозяину по настоящему изобретению, упакованных вместе в контейнере, реципиенте или иным образом. Следовательно набор может описан как набор продуктов и/или инструментов, достаточных для достижения определенной цели, которые могут продаваться как единое целое.

Набор может содержать одну или несколько емкостей (таких как флаконы, ампулы, контейнеры, шприцы, бутылки, пакеты) любых подходящих формы, размера и материала (предпочтительно, например, из водонепроницаемого пластика или стекла), содержащего конструкцию на основе антитела или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению в подходящей дозировке для введения (см. выше). Набор может дополнительно содержать инструкции по применению (например, в виде листовки или инструкции-брошюры), средства для введения конструкции на основе антитела по настоящему изобретению, такие как шприц, насос, инфузионная система и им подобные, средства для восстановления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению и/или средство для разбавления конструкции на основе антитела по настоящему изобретению.

В настоящем изобретении также представлены наборы с устройством для однократного введения. Набор по настоящему изобретению также может содержать первый контейнер, содержащий высушенную/лиофилизированную конструкцию на основе антитела, и второй контейнер, содержащий водную готовую форму. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предложены наборы, содержащие однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидким или лиофилизированным содержимым).

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению дополнительно содержит буфер, который может быть выбран из группы, состоящей из фосфата калия, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тартрата натрия, гистидина/гистидина HCl, глицина, трис, глутамата, ацетата и их смеси, в частности, из фосфата калия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты, гистидина, глутамата, ацетата и их комбинаций.

Подходящие концентрации буфера охватывают концентрации приблизительно 200 мМ или меньше, например приблизительно 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 или 5 мМ. Специалист в данной области техники легко сможет откорректировать концентрации буфера для обеспечения стабильности фармацевтической композиции, как описано в данном документе. Предусмотренные концентрации буфера в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, в частности находятся в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 200 мМ, предпочтительно от приблизительно 5 до приблизительно 100 мМ и более предпочтительно от приблизительно 10 до приблизительно 50 мМ.

Применяемый в данном документе термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, которая является подходящей для введения нуждающемуся в этом субъекту. Термины "субъект", или "индивидуум", или "животное", или "пациент" используются взаимозаменяемо в данном документе и относятся к любому субъекту, в частности субъекту-млекопитающему, для которого требуется введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению. Субъекты-млекопитающие включают людей, отличных от людей приматов, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей,

крупного рогатого скота, коров и им подобные, причем предпочтительными являются люди. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению является стабильной и фармацевтически приемлемой, т.е. способной вызывать требуемый терапевтический эффект, не вызывая каких-либо нежелательных местных или системных эффектов у субъекта, которому вводят фармацевтическую композицию. Фармацевтически приемлемые композиции по настоящему изобретению могут, в частности, быть стерильными и/или фармацевтически инертными. В частности, термин "фармацевтически приемлемый" может означать одобрение регулирующего органа или другой общепризнанной фармакопеи для применения у животных и более конкретно у людей.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит одну или множество описанных в данном документе конструкций на основе биспецифических одноцепочечных антител, предпочтительно в терапевтически эффективном количестве, β -циклодекстрин и буфер. Под "терапевтически эффективным количеством" подразумевается количество указанной конструкции, которая вызывает требуемый терапевтический эффект. Терапевтическая эффективность и токсичность могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, ED_{50} (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD_{50} (доза, летальная для 50% популяции). Соотношение доз между терапевтическим и токсическим эффектами является терапевтическим индексом и оно может быть выражено как соотношение ED_{50}/LD_{50} . Фармацевтические композиции, которые проявляют большие терапевтические индексы, обычно являются предпочтительными.

Композиция может содержать описанные выше β -циклодекстрин и буфер. Фармацевтическая композиция может необязательно содержать одно или несколько дополнительных вспомогательных веществ, если они не уменьшают или не устраняют ее полезные свойства, как описано в данном документе, и, в частности, ее стабильность.

В настоящем изобретении могут применяться вспомогательные вещества для широкого спектра целей, таких как регулирование физических, химических или биологических свойств составов, таких как регулирование вязкости, и/или способы по настоящему изобретению, предназначенные для дополнительного повышения эффективности и/или дополнительной стабилизации таких составов, и способы, направленные против деградации и ухудшения качества, например, по причине стрессов, возникающих в ходе изготовления, доставки, хранения, подготовки перед использованием, введения и после него. Термин "вспомогательное вещество" в целом включает наполнители, связующие вещества, дезинтегранты, покрытия, сорбенты, антиадгезивы, способствующие скольжению вещества, консерванты, антиоксиданты, ароматизаторы, красители, подсластители, растворители, сорастворители, буферные средства, хелатирующие средства, вещества, придающие вязкость, поверхностно-активные вещества, разбавители, увлажнители, носители, разбавители, консерванты, эмульгаторы, стабилизаторы и модификаторы тоничности.

Специалистам в данной области техники очевидно, что различные вспомогательные вещества в фармацевтической композиции (например, перечисленные выше) могут оказывать, например, разные эффекты, и при этом аминокислота может действовать в качестве буфера, стабилизатора и/или антиоксиданта; маннит может действовать в качестве объемобразующего средства и/или средства, повышающего тоничность; хлорид натрия может действовать в качестве средства для доставки и/или средства, повышающего тоничность; и т.п.

Полиоли являются применимыми стабилизирующими средствами как в жидких, так и в лиофилизированных составах, предназначенные для защиты белков от процессов физической и химической деградации, а также применимы для регуляции тоничности составов. Полиоли включают сахара, например, маннит, сахарозу и сорбит, и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, и для целей обсуждения в данном документе полиэтиленгликоль (PEG) и родственные ему вещества. Маннитол обычно применим для обеспечения структурной стабильности массы в лиофилизированных составах. Это обеспечивает структурную стабильность массы. Обычно его применяют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбит и сахароза являются традиционно используемыми средствами регулирования тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов, обусловленных заморозанием-оттаиванием, в ходе транспортировки или получения сыпучих материалов в процессе производства. PEG применим для стабилизации белков и в качестве криопротектора.

Поверхностно-активные вещества обычно применяются для предотвращения, минимизации или уменьшения поверхностной адсорбции. Молекулы белка могут быть подвержены адсорбции на поверхностях и денатурации и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость. Эти эффекты обычно обратно пропорциональны концентрации белка. Как правило, эти вредные взаимодействия обратно пропорциональны концентрации белка и обычно усугубляются физическим перемешиванием, например, возникающим при транспортировке и манипуляции с продуктом. Широко используемые поверхностно-активные вещества включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот и сорбитанполиэтоксилатов и полоксамер 188. Поверхностно-активные вещества также обычно применяются для контроля конформационной стабильности белка. Применение поверхностно-активных веществ в этом отношении является специфичным для

белка, поскольку любое указанное поверхностно-активное вещество обычно стабилизирует одни белки и дестабилизирует другие.

Полисорбаты чувствительны к окислительной деградации и зачастую при поставке содержат достаточное количество пероксидов, чтобы вызвать окисление боковых цепей белковых остатков, особенно метионина. Следовательно, полисорбаты следует применять осторожно, и при их применении следует их использовать в наименьшей эффективной концентрации.

В некоторой степени антиоксиданты могут предотвращать вредное окисление белков в фармацевтических составах путем поддержания надлежащих уровней кислорода и температуры окружающей среды и путем избегания воздействия света. Антиоксидантные вспомогательные вещества также могут применяться для предотвращения окислительной деградации белков. К числу применимых антиоксидантов в этом отношении относятся восстанавливающие средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства. Антиоксиданты для применения в терапевтических белковых составах являются предпочтительно водорастворимыми и сохраняют свою активность в течение всего срока годности продукта. EDTA является применимым примером.

Ионы металлов могут действовать как белковые кофакторы и обеспечивать образование белковых координационных комплексов. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Однако ионы металлов также катализируют физические и химические процессы, которые разрушают белки. Ионы магния (10-120 мМ) могут быть использованы для ингибирования изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты. Ионы Ca^{+2} (до 100 мМ) могут повышать стабильность дезоксирибонуклеазы человека. Однако Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} могут дестабилизировать rhDNase. Аналогичным образом, Ca^{+2} и Sr^{+2} могут стабилизировать фактор VIII, при этом он может быть дестабилизирован ионами Mg^{+2} , Mn^{+2} и Zn^{+2} , Cu^{+2} и Fe^{+2} , и его агрегация может быть увеличена за счет ионов Al^{+3} .

Соли могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, например, для регулирования ионной силы и/или изотоничности фармацевтического состава и/или для дополнительного улучшения растворимости и/или физической стабильности конструкции на основе антитела или другого ингредиента. Хорошо известно, что ионы могут стабилизировать нативное состояние белков путем связывания с заряженными остатками на поверхности белка и путем экранирования заряженных и полярных групп в белке и снижения силы их электростатических взаимодействий, притягивающих и отталкивающих взаимодействий. Ионы также могут стабилизировать денатурированное состояние белка путем связывания, в частности, денатурированных пептидных связей (-CONH) белка. Кроме того, ионное взаимодействие с заряженными и полярными группами в белке также может уменьшить межмолекулярные электростатические взаимодействия и за счет этого предотвращать или уменьшать агрегацию и нерастворимость белка. Ионные соединения различаются по своему воздействию на белки. Был разработан ряд категориальных градаций ионов и их влияний на белки, которые можно применять в составлении фармацевтических композиций в соответствии с настоящим изобретением. Одним из примеров является ряд Хофмейстера, который ранжирует ионные и полярные неионные растворенные вещества по их влиянию на конформационную стабильность белков в растворе. Стабилизирующие растворенные вещества называются "космотропными". Дестабилизирующие растворенные вещества называются "хаотропными". Космотропы обычно используются в высоких концентрациях (например, >1 молярный сульфат аммония) для осаждения белков из раствора ("высаливание"). Хаотропы обычно используются для протезирования зубов и/или для солюбилизации белков ("всаливания"). Относительная эффективность ионов к "всаливанию" и "высаливанию" определяет их положение в ряде Хофмейстера.

Свободные аминокислоты могут быть применимы в фармацевтической композиции в качестве объемобразующих средств, стабилизаторов и антиоксидантов, а также других стандартных применений. Лизин, пролин, серин и аланин могут быть использованы для стабилизации белков в составе. Глицин применим в лиофилизации для обеспечения правильной структуры и свойств лиофилизованной массы. Аргинин может быть применим для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизованных составах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта.

В частности, применимые вспомогательные вещества для составления фармацевтической композиции включают сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, аргинин, лизин, полисорбат 20, полисорбат 80, полксамер 188, плуроник и их комбинации. Указанные вспомогательные вещества могут присутствовать в фармацевтической композиции в разных концентрациях, поскольку композиция проявляет требуемые свойства, приведенные в качестве примера в настоящем документе, и, в частности, способствует стабилизации содержащихся конструкций на основе биспецифичных одноцепочечных антител. Например, сахароза может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации от 2 до 12% вес./об., т.е. в концентрации 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2% вес./об. Предпочтительный диапазон концентраций сахарозы составляет от 4 до 10% вес./об. и более предпочтительно от 6 до 10% вес./об. Полисорбат 80 может присутствовать в фармацевтической композиции в концентрации от 0,001 до 0,5% вес./об., т.е. в концентрации 0,5, 0,2, 0,1, 0,08, 0,05, 0,02, 0,01, 0,008, 0,005, 0,002 или 0,001% вес./об. Предпочтительный диапазон концентраций полисорбата 80 составляет от 0,002% вес./об. до 0,5% вес./об. и предпочтительно от 0,005 до 0,02% вес./об.

Однако также допускается, что фармацевтическая композиция не содержит каких-либо консервантов. В частности, в настоящем изобретении, среди прочего, предусматривается фармацевтическая композиция, содержащая один или несколько консервантов, содержащая конструкцию на основе биспецифического антитела, которая предпочтительно является одноцепочечной, в концентрации от приблизительно 0,5 мг/мл до 50 мг/мл, и буфер, в котором конструкция на основе антитела стабильна, фосфат калия в концентрации приблизительно 10 мМ, и дополнительно сахарозу в концентрации приблизительно 8% вес./об. и полисорбат 80 в концентрации приблизительно 0,01% вес./об. при рН приблизительно 6,0.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены в различных формах, например в твердой, жидкой, замороженной, газообразной или лиофилизированной формах, и могут быть, в частности, в форме мази, крема, трансдермальных пластырей, геля, порошка, таблеток, раствора, аэрозоля, гранул, пилюль, суспензий, эмульсий, капсул, сиропов, жидкостей, эликсиров, экстрактов, настоек или жидких экстрактов.

Обычно для фармацевтической композиции по настоящему изобретению возможны различные формы хранения и/или лекарственные формы в зависимости, в частности, от предполагаемого пути введения, формата доставки и требуемой дозировки (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed., (2012)). Специалисту в данной области техники будет известно, что такой выбор конкретной лекарственной формы может, например, влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* конструкции на основе антитела по настоящему изобретению.

Например, основная среда-носитель или основной носитель в фармацевтической композиции может быть либо водным, либо неводным по своей природе. Подходящей средой-носителем или носителем может быть вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, дополненная другими материалами, традиционно используемыми в композициях для парентерального введения. Нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином, являются дополнительными примером сред-носителей.

Если предполагается парентеральное введение, то терапевтические композиции по настоящему изобретению могут быть представлены в виде апиrogenного приемлемого для парентерального введения водного раствора, содержащего требуемую конструкцию на основе антитела в фармацевтически приемлемом носителе. Особенно подходящей средой-носителем для парентерального введения является стерильная дистиллированная вода, в которой конструкция на основе антитела получена в виде стерильного изотонического раствора, стабилизированного надлежащим образом. Получение может включать составление требуемой молекулы с таким средством, как инъецируемые микросферы, биоразлагаемые частицы, полимерные соединения (такие как полимолочная кислота или полигликолевая кислота), гранулы или липосомы, которые могут обеспечивать контролируемое или замедленное высвобождение продукта, который может быть доставлен посредством инъекции вещества замедленного всасывания. Также может быть использована гиалуроновая кислота, обладающая эффектом обеспечения пролонгированного действия в системном кровотоке. Имплантируемые устройства для доставки лекарственных средств могут быть использованы для введения требуемой конструкции на основе антитела.

Составы с длительными или контролируемым доставкой/высвобождением также предусмотрены в данном документе. Также специалистам в данной области техники известны способы составления ряда других средств с замедленной или контролируемой доставкой, таких как липосомные носители, биоразлагаемые микрочастицы или пористые гранулы, а также инъекционные вещества замедленного всасывания. Смотрите, например, международную патентную заявку № PCT/US93/00829, в которой описано контролируемое высвобождение пористых полимерных микрочастиц для доставки фармацевтических композиций. Препараты с замедленным высвобождением могут включать полупроницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Матрицы с замедленным высвобождением могут включать сложные полиэфиры, гидрогели, полилактиды (как описано в патенте США № 3773919 и публикации европейской заявки на патент № EP 058481), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата (Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556), поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (Langer et al., 1981, J. Biomed.Mater. Res. 15:167-277 и Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105), этиленвинилацетат (Langer et al., 1981, см. выше) или поли-D(-)-3-гидроксималяную кислоту (публикация заявки на европейский патент EP № 133988). Композиции с замедленным высвобождением могут также включать липосомы, которые могут быть получены посредством любого из нескольких способов, известных в данной области техники. См., например, Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692; публикации заявок на европейский патент № EP 036676; EP 088046 и EP 143949. Конструкцию на основе антитела также заключать в микрокапсулы, получаемые, например, с помощью методик коацервации или с помощью полимеризации на границе раздела фаз (например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из полиметилметакрилата, соответственно), в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и наночапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики раскрыты в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd edition, Oslo, A., Ed. (2012).

Фармацевтические композиции, применяемые для введения *in vivo*, как правило, представлены в

виде стерильных препаратов. Стерилизация может быть достигнута посредством фильтрации с помощью стерильных фильтрационных мембран. Если композиция лиофилизирована, то стерилизация с помощью данного способа может быть выполнена либо до лиофилизации и восстановления, либо после них. Композиции для парентерального введения можно хранить в лиофилизированной форме или в растворе. Как правило, парентеральные композиции помещают в контейнер, имеющий стерильное входное отверстие, например, пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций.

Описанные в данном документе конструкции на основе антител также можно составить в виде иммунолипосом. "Липосома" представляет собой небольшую везикулу, состоящую из различных типов липидов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которая применима для доставки лекарственного средства млекопитающему. Компоненты липосомы обычно имеют бислойную структуру, аналогичную липидной структуре биологических мембран. Липосомы, содержащие конструкцию на основе антитела, получают с помощью способов, известных в данной области техники, таких как описанные в Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); в патентах США № 4485045 и 4544545; и WO 97/38731. Липосомы с увеличенным временем циркуляции в кровотоке раскрыты в патенте США № 5013556. С помощью способа обращенно-фазового выпаривания можно получить особенно применимые липосомы, в липидном составе которых содержатся фосфатидилхолин, холестерин и PEG-дериватизированный фосфатидилэтанолламин (PEG-PE). Липосомы экструдируют через фильтры с определенным размером пор с получением липосом желаемого диаметра. Fab'-фрагменты конструкции на основе антитела по настоящему изобретению можно конъюгировать с липосомами, как описано в Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), посредством реакции дисульфидного обмена. В липосоме необязательно содержится химиотерапевтическое средство, см. Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989).

Предусматривается, что композиция по настоящему изобретению может в дополнение к конструкции на основе биспецифического одноцепочечного антитела по настоящему изобретению, определенному в данном документе, содержать дополнительные биологически активные средства в зависимости от предполагаемого применения композиции. Такими средствами могут быть, в частности, лекарственные средства, действующие на опухоли и/или злокачественные клетки, но возможны и другие активные средства в зависимости от предполагаемого применения фармацевтической композиции, включая средства, воздействующие на желудочно-кишечный тракт, лекарственные средства, ингибирующие иммунные реакции (например, кортикостероиды), лекарственные средства, модулирующие воспалительный ответ, лекарственные средства, действующие на систему кровообращения, и/или средства, такие как цитокины, известные в данной области техники. Также предусматривается, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению применяется в качестве комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другим противораковым лекарственным препаратом.

После того как фармацевтическая композиция была составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества, кристалла либо в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к применению форме, либо в форме (например, лиофилизированной), которую восстанавливают перед введением. К примеру, лиофилизированные композиции можно разбавлять, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWI), физиологическом растворе, фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) или в том же самом составе, в котором белок находился до лиофилизации.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению, как правило, может быть составлена для доставки любым подходящим путем введения. В контексте настоящего изобретения пути введения включают без ограничения топические пути введения (такие как накожный, ингаляционный, назальный, офтальмический, аурикулярный/ушной, вагинальный, мукозальный), энтеральные пути (такие как пероральный, гастроинтестинальный, сублингвальный, сублабиальный, буккальный, ректальный); и парентеральные пути (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставной, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, интравезикальный, интравитреальный, трансдермальный, интраназальный, трансмукозальный, интрасиновиальный, интралюминальный).

Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, в частности, применимы для парентерального введения, например, подкожной или внутривенной доставки, например, с помощью инъекции, такой как болюсная инъекция, или с помощью инфузии, такой как непрерывная инфузия. Фармацевтические композиции могут быть введены с помощью медицинских устройств. Примеры устройств медицинского назначения для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению также может вводиться непрерывно. В качестве неограничивающего примера непрерывное или практически непрерывное, т.е. продолжительное введение можно осуществлять с помощью небольшой насосной системы, носимой пациентом, для дози-

рования подачи конструкции на основе антитела в организм пациента. Фармацевтическая композиция может быть введена с применением указанных насосных систем. В целом такие насосные системы известны в данной области техники, а их работа обычно основана на периодической замене картриджей, содержащих предназначенное для инфузии терапевтическое средство. Замена картриджа в такой насосной системе влечет за собой временное прерывание или какое-либо иное прерывание потока терапевтического средства в организм пациента. В таком случае фаза введения перед заменой кассеты и фаза введения после замены кассеты по-прежнему будут подпадать в определение фармацевтических средств и способов по настоящему изобретению, составляющих вместе одно "непрерывное введение" такого терапевтического средства.

Продолжительное или непрерывное введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть внутривенным или подкожным, и осуществляться посредством устройства для доставки жидкости или небольшой насосной системы, включающей механизм подачи жидкости для подачи жидкости из резервуара и приводной механизм для приведения в действие механизма подачи. Насосные системы для подкожного введения могут включать иглу или канюлю для проникновения через кожу пациента и доставки подходящей композиции в организм пациента. Указанные насосные системы могут быть напрямую прикреплены или присоединены к коже пациента независимо от расположения вен, артерий и кровяных сосудов, за счет чего обеспечивается непосредственный контакт между насосной системой и кожей пациента. Насосная система может быть присоединена к коже пациента в течение от 24 ч до нескольких суток. Насосная система может иметь небольшой размер с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для введения подходящей фармацевтической композиции может составлять от 0,1 до 50 мл.

Специалист в данной области техники легко поймет, что фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может в целом содержать любое из вышеупомянутых вспомогательных веществ или дополнительных активных средств или может быть предоставлена в любой подходящей форме, если она стабильна и предпочтительно проявляет те же полезные свойства, что и фармацевтические композиции, содержащие β -циклодекстрины, которые были оценены в прилагаемых примерах. Специалист в данной области техники сможет легко корректировать разные компоненты с целью обеспечения фармацевтической композиции, которая является стабильной, т.е. предпочтительно по сути не содержит агрегатов и/или конформеров фрагментов биспецифического одноцепочечного антитела, содержащихся в ней.

Следует отметить, что применяемые в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "реагент" включает один или несколько таких различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные стадии и способы, известные специалисту в данной области техники, которые можно модифицировать или использовать вместо способов, описанных в данном документе.

Если не указано иное, то термин "по меньшей мере", предшествующий последовательностям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалисты в данной области техники примут во внимание или будут способны определить путем проведения только обычных экспериментов многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных в данном документе. Подразумевается, что такие эквиваленты включены в настоящее изобретение.

Выражение "и/или", применяемое в любой части в данном документе, включает значения "и", "или" и "все элементы или любую другую их комбинацию, объединенные указанным выражением".

В контексте данного документа термин "приблизительно" или "примерно" означает в пределах 20%, предпочтительно в пределах 10% и более предпочтительно в пределах 5% заданной величины или диапазона. При этом он включает также конкретное число, например, приблизительно 20 включает 20.

Термин "менее чем" или "более чем" включает конкретное число. Например, менее чем 20 означает меньше или равно. Аналогично более чем или больше чем означает более или равно или больше или равно соответственно.

Во всем данном описании и следующей за ним формуле изобретения, если по контексту не требуется иное, слово "содержать" и его варианты, такие как "содержит" и "содержащий", будут понимать как подразумевающие включение указанного целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий, но не исключение какого-либо другого целого числа или стадии, или группы целых чисел или стадий. Термин "предусматривающий", при использовании в данном документе, можно заменить терминами "содержащий" или "включающий в себя", или иногда при использовании в данном документе термином "имеющий".

Применяемый в данном документе "состоящий из" исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не определенный в элементе пункта формулы изобретения. В контексте данного документа выражение "состоящий по сути из" не исключает материалы или стадии, которые не оказывают материального влияния на основные и новые характеристики заявляемого предмета.

В каждом случае любой из терминов "содержащий", "состоящий по сути из" и "состоящий из" можно заменить любым из оставшихся двух терминов.

Следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными методологиями, протоколами, материалами, реагентами и веществами и т.д., описанными в данном документе, и, следовательно-

но, может варьироваться. Употребляемая в данном документе терминология используется только в целях описания конкретных вариантов реализации, и не подразумевает ограничения настоящего изобретения, которое определяется исключительно формулой изобретения.

Все публикации и патенты, упоминаемые по всему тексту настоящего описания (включая все патенты, заявки на патенты, научные публикации, технические характеристики и инструкции от производителя и т.п.) выше или ниже, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте. Все изложенное в данном документе не следует воспринимать как признание того, что данное изобретение не имеет права противопоставлять такое описание на основании более раннего изобретения. В тех случаях, когда включенный посредством ссылки материал противоречит или не согласуется с данным описанием, это описание имеет приоритет относительно любого такого материала.

Лучшее понимание данного изобретения и его преимуществ обеспечат следующие примеры, приведенные исключительно в иллюстративных целях. Подразумевается, что примеры не ограничивают объем данного изобретения каким-либо образом.

Примеры

Пример 1. Для того чтобы исследовать совместимость известных консервантов с иллюстративной конструкцией на основе биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением, конструкцию на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 составляли в присутствии соответствующих известных консервантов с параметрами, указанными в табл. 4.

Таблица 4. Параметры состава для тестирования совместимости консервантов с конструкцией на основе биспецифического антитела к CD19×CD3

Название состава	pH	Белок (мг/мл)	Буфер (мМ)	Сахароза (%)	Консерванты (вес/объем)	Полисорбат 80 (%)
G4SuT	4,0	0,8	10 мМ глутамата	9	отсутствуют	0,01
G4SuT_CH	4,0	0,8	10 мМ глутамата	9	0,3% хлорбутанола	0,01
G4SuT_ME	4,0	0,8	10 мМ глутамата	9	0,2% метилпарабена	0,01
G4SuT_PH	4,0	0,8	10 мМ глутамата	9	0,5% фенола	0,01
G4SuT_TH	4,0	0,8	10 мМ глутамата	9	0,01% тиомерсала	0,01

Ранее было обнаружено, что используемые параметры состава эффективно стабилизируют конструкции на основе биспецифических антител. Следовательно, любая разница по сравнению с отрицательным контролем без консерванта (G4SuT) должна стать еще более очевидной. Выбранные концентрации консерванта отражают стандартные концентрации, используемые в данной области. Соответствующие составы хранили при 25°C в течение 14 дней и исследовали в день 0, 1, 3, 7 и 14 с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC-HPLC). Как видно на фиг. 1, некоторые протестированные составы, в том числе контрольные, содержащие 0% консерванта, показали уменьшение процента высокомолекулярных (НМВ) частиц с течением времени при 25°C. Это относится к хлорбутанолу и метилпарабену, указывая на то, что эти консерванты не дестабилизируют белковое лекарственное средство и не вызывают агрегацию или даже уменьшают агрегацию. После добавления фенола значения НМВ в целом остаются постоянными, что также указывает на совместимость фенола с тестируемой конструкцией на основе биспецифического антитела в данных экспериментальных условиях. Тиомерсал оказался менее подходящим из-за наблюдаемого небольшого увеличения НМВ с течением времени. Переход от НМВ до основного пика в ходе повторного уравнивания может частично происходить из-за разбавления от концентрации лекарственного продукта до концентрации в пакете для внутривенного введения. В целом можно сделать вывод, что при низком pH в диапазоне от 4,0 до 6,5, например 4,0, конструкция на основе биспецифического антитела по настоящему изобретению остается стабильной или стабилизируется консервантом, таким как, например, хлорбутанол или метилпарабен, или также бензиловым спиртом. Низкое значение pH дополнительно способствует стабилизации конструкции на основе биспецифического антитела, поэтому фармацевтическая композиция, содержащая более высокие концентрации, такие как по меньшей мере 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 мкг/мл, является стабильной, т.е. демонстрирует низкое процентное значение концентрации НМВ.

Пример 2. В качестве еще одного известного консерванта тестировали бензиловый спирт в отношении совместимости с иллюстративной конструкцией на основе биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением, представляющей собой конструкцию на основе биспецифического антитела к CD19×CD3. Чтобы лучше имитировать ситуацию клинического применения, в качестве стимулирующей среды выбрали физиологическое значение pH 7, так как иллюстративные конструкции на основе биспецифических антител, как описано в настоящем документе, менее защищены от агрегации в среде с pH 7 по сравнению со средой с pH 4. Ожидали проявления общей тенденции к агрегации. В частности,

получали ряд разведений конструкции на основе антитела к CD19×CD3 от 4,5 до 800 мкг/мл, отражающий типичные концентрации при клиническом применении и таковые, которые могут превышать их. Концентрацию бензилового спирта, составляющую 0,9%, выбрали в соответствии с коммерческим и нормативно утвержденным 0,9% хлоридом натрия класса USP (содержащим 0,9% бензилового спирта). Совместимость исследовали путем определения процентного содержания нежелательных НМВ-частиц с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC-HPLC) через 0, 1 и 2 дня при 25°C, представляющую собой температуру окружающей среды, также преобладающую в клинических условиях. Как можно видеть на фиг. 1, скорость агрегации, выраженная в процентном содержании нежелательных НМВ-частиц, зависит от концентрации конструкции на основе биспецифического антитела, в данном случае конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3. Удивительно, что концентрации ниже 50 мкг/мл не показали увеличения количества НМВ-частиц. Как видно из значений процентного содержания НМВ при концентрации 4,5 мкг/мл, НМВ-частицы даже демонстрируют обратный переход в форму мономера. Таким образом, было замечено, что ниже порогового значения приблизительно 50 мкг/мл иллюстративная конструкция на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 не показывает почти никаких НМВ-частиц при контакте с консервантом, таким как бензиловый спирт, и что процентное содержание НМВ остается ниже 2% даже после 2 дней хранения. Также при концентрации ниже 200 мкг/мл начальная концентрация НМВ является очень низкой (ниже 1%) и остается значительно ниже 5% даже после 2 дней хранения. Поскольку конструкция на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 в соответствии с настоящим изобретением является более чувствительной конструкцией на основе биспецифического антитела с точки зрения стабильности, другие конструкции демонстрируют даже более низкое процентное содержание НМВ при соответствующей концентрации конструкции на основе биспецифического антитела и являются стабильными в присутствии иллюстративного консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, даже в отсутствие любых дополнительных комплементарных стабилизаторов и при физиологическом значении pH 7 и температуре 25°C, соответствующим условиям клинического применения.

Пример 3. Обратный переход НМВ-частиц в форму мономера дополнительно исследовали в течение 14 дней с помощью SEC-HPLC для типичной конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 в присутствии иллюстративного консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, и при физиологическом значении pH 7 при температуре, составляющей как 4, так и 25°C, охватывая температурные условия хранения при низких температурах и введения в клинических условиях. Концентрация указанной конструкции соответственно составляла 4 мкг/мл. Концентрация бензилового спирта составляла 0,25, 0,5 и 0,9% соответственно. Как видно на фиг. 3А, при 4°C процентное содержание НМВ падает в период от дня 0 до дня 7, но затем значительно не изменяется в период от дня 7 до дня 14. Значения НМВ для составов, содержащих бензиловый спирт несколько ниже, чем значения для таковых без него, указывая на стабилизирующий эффект. Этот эффект еще более выражен при 25°C (см. фиг. 3В). Чем выше концентрация бензилового спирта и чем дольше время наблюдения, тем ниже процентное содержание НМВ. Этот результат подтверждает, что НМВ-частицы даже демонстрируют обратный переход в форму мономера в присутствии иллюстративного консерванта, представляющего собой бензиловый спирт, предпочтительно в более высокой, но нормативно приемлемой концентрации (0,9%).

В тех же экспериментальных условиях подобным образом исследовали потенциальное влияние материала инфузионного пакета. Пакеты для внутривенного введения содержали 1900 нг/мл Blincyto для исследования роста микроорганизмов, что является ожидаемой концентрацией для пакета для внутривенного введения при введении в течение 7 дней. Пакеты для внутривенного введения, подготовленные для исследования стабильности, охватывали концентрацию, используемую при введении, и содержали Blincyto при 4500 или 1900 нг/мл. Более высокая концентрация должна была быть выше LOQ для анализов определения стабильности посредством SE-HPLC и CE-HPLC.

В обоих исследованиях использовали пакеты для внутривенного введения объемом 250 мл. Исследование роста микроорганизмов оценивали при использовании пустых пакетов для внутривенного введения только из EVA. Эти пакеты подготавливали в стерильной среде и подготавливали для инокуляции микроорганизмов и тестирования роста в течение 14 дней инкубации при комнатной температуре. В исследовании стабильности оценивали пакеты для внутривенного введения как из EVA, так и из полиолефина. Полиолефиновые пакеты для внутривенного введения, заполненные физиологическим раствором, сливали перед применением. После получения инфузионных растворов, содержащих Blincyto, оба типа пакетов для внутривенного введения выдерживали при 4°C в течение 10 дней, чтобы имитировать максимальное время хранения в клинических условиях, после чего следовали 14 дней инкубации при 25°C и 37°C. Соответственно, материалы для инфузионного пакета этилвинилацетат (EVA) и полиолефин сравнивали на предмет различий в стабильности ViTE® в пересчете на процент НМВ-частиц.

Соответствующие составы, содержащие 4 мкг/мл конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 и бензиловый спирт в концентрации 0, 0,5, 0,6 или 0,74%, выдерживали в течение 0, 4, 7, 9, 11 или 14 дней при 25°C с одним образцом при 4°C в течение 10 дней в качестве статического контроля. Как видно на фиг. 3С, составы, содержащие бензиловый спирт, показали общую улучшенную ста-

бильность и даже снижение значений MW , что указывает на обратный переход в форму мономера, в частности в зависимости от концентрации консерванта. Эта тенденция наблюдалась несколько более систематически для EVA, чем для полиолефина. Соответственно, процентное значение основного пика в качестве индикатора для мономера, т.е. не подвергнутой агрегации и активной конструкции на основе биспецифического антитела, увеличивается с более высокой концентрацией консерванта и в течение исследуемого времени (см. фиг. 3D). Как правило, присутствие бензилового спирта увеличивает скорость повторного уравнивания, особенно во время инкубации при 25°C. В целом, не было значимых различий между двумя типами протестированных материалов для пакетов для внутривенного введения.

Пример 4. Улучшенную стабильность иллюстративной конструкции на основе биспецифического антитела по настоящему изобретению, обеспечиваемую консервантом, таким как бензиловый спирт, дополнительно исследовали с помощью анализа денатурации с использованием флуоресценции в качестве средства обнаружения. Экспериментальные условия включали гуанидингидрохлорид в качестве денатурирующего вещества, концентрацию которого наносили на ось x (см. фиг. 4). Время инкубирования составляло 2,5 ч при 25°C при почти физиологическом pH 7. Возбуждение флуоресценции устанавливали при 280 нм, а сканирование излучения проводили в диапазоне от 300 до 400 нм. Процент денатурированной фракции рассчитывали из анализа флуоресценции как стандарта в данной области. Результат можно увидеть на фиг. 4. Серая кривая представляет состав, содержащий бензиловый спирт, а черная кривая - состав без консерванта. Серая кривая демонстрирует сдвиг вправо в нижней части кривой. Это означает, что для развертывания данной области, т.е. домена CD3, требуется больше денатурирующего вещества, что выражается в повышенной стабильности, обеспечиваемой консервантом.

Пример 5. Этот пример представлял собой исследование микробного заражения для обоснования использования лекарственного продукта (DP) на основе конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, вводимого с помощью пакета для внутривенного (IV) введения. Исследование проводили для оценки способности бензилового спирта (BeOH) в различных концентрациях (0,5-0,74%) уменьшать или устранять рост микроорганизмов в пакетах для внутривенного введения, содержащих инфузионный раствор блинатумомаба, содержащий бензиловый спирт, DP на основе конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 и стабилизатор раствора для внутривенного введения (IVSS), хранящихся при 20-25°C в течение не более 14 дней.

Результаты, полученные в данном исследовании, показывают, что бензиловый спирт в оцененной концентрации способен ингибировать рост шести оцениваемых микроорганизмов. Противомикробная эффективность в отношении грамотрицательных бактерий, оцененных в исследовании (*E.coli*, *P.aeruginosa* и *E.cloacae*), является очевидной. Эти микроорганизмы были способны расти, достигая ~106 КОЕ/мл, в инфузионном растворе блинатумомаба без BeOH, но рост полностью подавлялся при всех трех оцененных концентрациях. Эффект в отношении грамположительных бактерий (*S.aureus* и *M.luteus*) и дрожжей (*C.albicans*), оцененный в исследовании, не столь очевиден, как в отношении грамотрицательных бактерий, главным образом из-за того, что инфузионный раствор блинатумомаба не поддерживает рост грамположительных бактерий и дрожжей. Наблюдали постепенное снижение титров этих микроорганизмов для положительных контролей с 0,0% BeOH со снижением титра от низкого до не поддающегося определению к концу оцениваемого периода. Тем не менее, противомикробную эффективность бензилового спирта в отношении этих микроорганизмов можно продемонстрировать при помощи разницы в периодах времени, необходимых для осуществления полной инактивации или подавления зараженного инокулята в образцах, обработанных BeOH.

Исследование проводили для оценки роста шести различных микроорганизмов в пакетах для внутривенного введения, заполненных 109 мл инфузионного раствора конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3, содержащего бензиловый спирт (BeOH в конечной концентрации 0,0, 0,5, 0,6 или 0,74%), DP на основе конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 и IVSS. Подготовленные пакеты для внутривенного введения выдерживали при 20-25°C в течение не более 14 дней.

Бактерии и дрожжи, отобранные для исследования, являлись характерными для известных патогенных микроорганизмов человека, обычно выделяемых при внутрибольничных инфекциях. Эти микроорганизмы включают *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) и *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Состав DP на основе блинатумомаба содержит 1,91 мкг/мл блинатумомаба в 25 мМ моногидрата лимонной кислоты, 200 мМ L-лизин-моногидрохлорида, 15% вес./об. дигидрата трегалозы, 0,1% вес./об. полисорбата 80 при pH 7,0. Состав для IVSS представляет собой 25 мМ моногидрата лимонной кислоты, 1,25 М L-лизин-моногидрохлорида, 0,1% вес./об. полисорбата 80 при pH 7,0.

Тестируемые изделия. Тестируемые изделия, оцениваемые в данном исследовании, представляли собой инфузионный раствор блинатумомаба, заполняющий пакеты для внутривенного введения, содержащие конц. блинатумомаба 1,91 мкг/мл в общем объеме 109 мл/пакет. Раствор получали путем добавления 2,2 мл IVSS, 16,8 мл объединенного восстановленного DP на основе блинатумомаба (210 мкг) и 90

мл комбинированного общего объема физиологического раствора и физиологического раствора с 0,9% бензилового спирта (басалина). Четырех различных уровней ВеОН (0,0, 0,5, 0,6 и 0,74%), оцениваемых в исследовании, достигали путем добавления различных количеств физиологического раствора и басалина. Например, пакет с 0,0% ВеОН (положительный контроль) получали путем добавления 90 мл физиологического раствора, в то время как пакет с 0,6% ВеОН получали путем добавления 18 мл физиологического раствора и 72 мл 0,9% басалина к 2,2 мл IVSS и 16,8 мл DP на основе блинатумомаба. См. приложение А для более подробной информации. Следует обратить внимание, что на иллюстрации для положительного контроля с 0,0% ВеОН на фиг. 1 (схема подготовки пакета для внутривенного введения) в приложении А к настоящему отчету и на такой же иллюстрации на фиг. 4 в приложении D непреднамеренно указано, что конечная концентрация ВеОН составляет 0,5% вместо 0,0%. Это является типографской ошибкой, и она не влияет на результат исследования.

Для оценки эффекта четырех уровней концентрации бензилового спирта в отношении вышеупомянутых шести различных микроорганизмов оценивали в общей сложности 24 пакета для внутривенного введения, заполненных инфузионным раствором конструкции на основе биспецифического антитела к CD19×CD3 (6×4=24). Приблизительно 1 мл инокулята, содержащего 1×10^4 КОЕ микроорганизмов, инокулировали через отверстие для инъекций в каждый пакет, что обеспечивало начальную микробную нагрузку, составляющую ~ 1×10^2 КОЕ/мл. После инокуляции отверстие для отбора проб на пакете очищали стерильным IPA и пакет непродолжительное время перемешивали, а затем инкубировали при 20-25°C.

Отрицательные контроли. Три пакета для внутривенного введения, содержащие инфузионные растворы блинатумомаба при трех уровнях концентрации ВеОН (0,5, 0,6 и 0,74%), которые не были подвергнуты заражению микроорганизмами, инкубировали в качестве отрицательного контроля совместно с зараженными тестируемыми изделиями. В ходе исследования проводили оценку дополнительных отрицательных контролей для анализа, в том числе 0,1% пептонную воду (PEPW) и фосфатно-солевой буфер (PHSS). Эти отрицательные контроли должны быть отрицательными в отношении роста во все моменты времени. См. приложение А для более подробной информации.

Процедуры отбора проб и титрования. В каждый момент времени, представляющий собой 0 ч, 4, 8, 10, 12 и 14 дней, из каждого оцениваемого пакета отбирали аликвоту объемом 3 мл и титровали.

Титрование образца проводили путем мембранной фильтрации с использованием аликвот по 1 мл в двух повторностях для каждого образца, отобранного в заданное время. Дополнительные разведения выполняли для получения количественных результатов (<math>< 300</math> КОЕ/планшет).

Влияние ВеОН на микроорганизмы после заражения графически отображено на фиг. 1-6. В целом, грамотрицательные (G-) бактерии, оцениваемые в исследовании (*E.coli*, *P.aeruginosa* и *E.cloacae*), росли и поддерживали жизнеспособность в инфузионном растворе блинатумомаба (без ВеОН) намного лучше, чем грамположительные (G+) бактерии (*S.aureus* и *M.luteus*) и дрожжи (*C.albicans*). В положительном контроле с 0,0% ВеОН все три оцениваемые бактерии G- росли с достижением ~106 КОЕ/мл в день 8 и поддерживали рост на этом уровне до конца исследования (14 дней), что отображено на фиг. 5A, 5B и 5C. В отличие от этого, рост инокулированных бактерий G- (~ 100 КОЕ/мл) подавлялся (или инактивировался) в присутствии ВеОН. В день 4 и далее поддающаяся определению *P.aeruginosa* отсутствовала (фиг. 5B), а в день 10 и далее отсутствовали поддающиеся определению *E.coli* или *E.cloacae* при всех трех концентрациях ВеОН (фиг. 5A и 5C соответственно).

В отличие от бактерий G- рост бактерий G+ (*S.aureus* и *M.luteus*) или *C.albicans* не поддерживался инфузионным раствором блинатумомаба (с ВеОН или без него), что отображено на фиг. 5D, 5E и 5F соответственно. Наблюдалось постепенное снижение титров бактерий G+ и *C.albicans* в отобранных в заданное время образцах положительного контроля с 0,0% ВеОН со снижением титра от низкого до не поддающегося определению к концу оцениваемого периода. В то же время, противомикробная эффективность ВеОН в отношении этих микроорганизмов, хотя и все еще и является заметной, не так очевидна, как это наблюдалось для бактерий G-. Эффект можно продемонстрировать за счет того, что микроорганизмы после заражения полностью инактивируются или подавляются в образцах, обработанных ВеОН, быстрее, чем в контроле с 0,0% ВеОН. Для *S. aureus* зараженный инокулят становился не поддающимся определению в день 4 и далее при 0,74% ВеОН, в день 8 при 0,5% или 0,6% ВеОН по сравнению с днем 10 для положительного контроля (фиг. 5D). Аналогичным образом, *M.luteus* после заражения становилась не поддающейся определению в день 8 при 0,74% ВеОН, в день 14 при 0,5 или 0,6% ВеОН, а положительный контроль все еще характеризовался низким уровнем обнаруживаемых микроорганизмов в день 14 (фиг. 5E); и *C.albicans* после заражения становилась не поддающимся определению в день 8 при всех трех уровнях ВеОН и в день 10 для положительного контроля (фиг. 5F). Таким образом, может быть продемонстрирована сильная противомикробная активность в тестируемых составах.

Пример 6. Целью этого эксперимента было доказать дополнительные стабилизирующие эффекты буферов и/или вспомогательных веществ, используемых в составе, содержащем конструкцию на основе биспецифического антитела по настоящему изобретению и консервант. Исследовали модельные домены, связывающий FAPα, выделенный домен, связывающий CD3 (I2C, который обычно используется во всех

примерах конструкций на основе биспецифических антител), конструкцию на основе биспецифического антитела к CD33×CD3 и конструкцию на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3. Для FAPα, домена, связывающего CD3, и конструкции на основе биспецифического антитела к CD33×CD3 экспериментальная процедура была одинаковой. Во-первых, образцы белка подвергали диализу в трис-фосфатный буфер (35 мМ триса, 17,5 мМ фосфата, pH 6,0) и (35 мМ триса, 17,5 мМ фосфата, 50 мМ цитрата, pH 6,0) соответственно. Концентрацию белка после диализа доводили до 0,3 мг/мл. Во-вторых, реакцию водород-дейтериевого обмена (HDX) инициировали при помощи 1-5 разведений образцов белка в соответствующем буфере D2O с точно таким же составом. В-третьих, реакцию HDX гасили через 10 с, 1, 10 мин, 1, 4 и 12 ч, и затем образцы белка после гашения реакции анализировали с помощью масс-спектрометрии. Для FAPα реакцию HDX проводили при 4, 25 и 37°C. Реакцию HDX проводили при 37°C для конструкции на основе биспецифического антитела к CD33×CD3 AMG330 и домена, связывающего CD3. Для того, чтобы оценить стабильности конструкции на основе антитела в присутствии бензилового спирта, бензиловый спирт непосредственно добавляли к образцу белка в концентрации 0,9%. Для конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 образцы белка подвергали диализу в (а) 10 мМ КН₂РО₄, 2% сахарозы, 4% маннита при pH 6 и (б) 10 мМ КН₂РО₄, 2% сахарозы, 4% маннита, 50 мМ цитрата при pH 6 соответственно. Концентрацию белка после диализа доводили до 1 мг/мл. Во-вторых, реакцию HDX инициировали при помощи 1-5 разведений образцов белка в соответствующем буфере D2O с точно таким же составом. В-третьих, реакцию HDX гасили через 10 с, 10 мин, 2, 8 и 16 ч, 24 ч, и затем образцы белка после гашения реакции анализировали с помощью масс-спектрометрии. Эксперимент проводили при 25°C.

На фиг. показаны стабилизационные эффекты цитрата, где это применимо в присутствии бензилового спирта, в отношении FAPα (фиг. 6A), домена, связывающего CD3, где пептид 108-112 в домене, связывающем CD3 (YISYW), соответствует пептиду 367-370 в FAPα (фиг. 6B), конструкции на основе биспецифического антитела к CD33×CD3, где пептид 364-368 в конструкции на основе биспецифического антитела к CD33×CD3 (YISYW) соответствует пептиду 366-370 в FAPα (фиг. 6C), и конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3, где пептид 365-369 в конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII (YISYW) соответствует пептиду 366-370 в FAPα (фиг. 6D). Соответственно, можно наблюдать стабилизационные эффекты цитрата в отношении участка CDR-H3 (YISYW) домена, связывающего CD3, для различных молекул на основе BiTE. Для FAPα, домена, связывающего CD3, и конструкции на основе биспецифического антитела к CD33×CD3 условия эксперимента являлись идентичными, а стабилизационные эффекты эквивалентными. Для конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 эксперимент проводили в несколько иных условиях, как изложено выше, но стабилизационный эффект проявляется подобным образом. Следовательно, показано, что цитрат способен стабилизировать конструкции на основе биспецифических антител в присутствии консерванта, где это необходимо.

Кроме того, тестировали эффекты цитрата и бензилового спирта в отношении FAPα, AMG 330, AMG 596 и выделенного связывающего CD3 домена. Результаты для каждой исследованной конструкции показывают аналогичные эффекты. В данном документе показано, что цитрат и бензиловый спирт могут оказывать противодействующие эффекты в отношении области остатков 366-370 (YISYW). На фиг. 6E и 6F показаны индивидуальные эффекты цитрата и бензилового спирта. Например, добавление цитрата (квадраты на слайде) к составу на основе трис-фосфата (кружки на слайде) уменьшает конформационную динамику этой области. Для сравнения, добавление бензилового спирта (треугольники на слайде) к составу на основе трис-фосфата способствует увеличению конформационной динамики этой области. На фиг. 6G и 6H показаны противодействующие эффекты цитрата и бензилового спирта. При добавлении как цитрата, так и бензилового спирта (пустые ромбы), конформационная динамика была восстановлена обратно к динамике в составе на основе трис-фосфата (сплошные кружки), указывая на то, что цитрат и бензиловый спирт противодействуют друг другу. Соответственно, цитрат может служить в качестве комплементарного стабилизирующего средства для противодействия дестабилизирующему действию консерванта в случае, если характеристики конструкции на основе биспецифического антитела превосходят те, которые может уравновесить стабилизирующий эффект (антидимеризационный эффект) консерванта, такого как бензиловый спирт.

Пример 7. Этот пример направлен на улучшение извлечения находящейся в низкой концентрации конструкции на основе биспецифического антитела, как например BiTE®, из пакетов для внутривенной инфузии. Низкая концентрация BiTE® обычно необходима вследствие высокой активности конструкций на основе антитела BiTE®. Во время исследований совместимости пакетов для внутривенного введения конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 разводили до очень низких концентраций в 0,9% об./об. физиологическом растворе для введения путем непрерывной внутривенной инфузии. Самая низкая категория дозирования для клинических исследований, впервые проводимых с участием людей (F1H), требует, чтобы концентрация белка была около 80 нг/мл. Анализ извлечения конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 при этой чрезвычайно низкой концентрации

потребовал некоторой изобретательности и адаптации довольно стандартного способа хроматографии с обращенной фазой для увеличения до максимума сигнала белка.

Раннее исследование, посвященное изучению извлечения конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 с добавлением или без добавления внутривенного стабилизирующего раствора IVSS, содержащего 25 мМ цитрата, 1,25М лизина и 0,1% полисорбата при pH 7, привело к наблюдению, что при тех же протоколах получения сигнал белка, который был разведен в физиологическом растворе в присутствии IVSS, был значительно выше, чем сигнал белка, который был разведен в физиологическом растворе в отсутствие IVSS. Для этого исследования использовали одну концентрацию IVSS, составляющую 4% об./об.

Чтобы попытаться понять расхождение в сигнале, разрабатывали небольшое исследование для сравнения площади пика белка, зарегистрированного при элюировании из колонки C8 с использованием поглощения при 215 нм в качестве регистрируемого сигнала. Следующий протокол кратко описывает проведенный эксперимент. Исходный раствор конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 с концентрацией 2 мг/мл серийно разбавляли в 2000 раз до 1 мкг/мл в пробирках Eppendorf, используя 0,9% физиологический раствор с 0, 1, 2, 4, 6, 8 или 10% об./об. IVSS в качестве разбавителя. Разведения выполняли с использованием одной и той же аликвоты исходного раствора конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3, используя следующую схему разведения: 1:10→1:10→1:10→1:2. 50 мкл каждого образца конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 с номинальными концентрациями 1 мкг/мл загружали в колонку C8 и элюировали с использованием хроматографии с обращенной фазой. Хроматограммы регистрировали с использованием поглощения при 215 нм. Высоту и площадь пика регистрировали для каждого образца для сравнения. Полученные первичные данные представлены ниже на фиг. 7А. Площадь пика для каждого образца конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 представлена в зависимости от% IVSS, включенного в раствор для разведения, что показано ниже на фиг. 2.

Из фиг. 7В видно, что добавление 1% об./об. IVSS к разбавителю, представляющему собой физиологический раствор, оказывает значительное влияние на извлечение конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3, увеличивая извлечение конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 примерно на 250%. При добавлении от 4% до 10% об./об. IVSS к разбавителю, представляющему собой физиологический раствор, извлечение конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 является постоянным, что оценивали по высоте и площади пика элюирования, указывая на достижение полного извлечения молекулы при 4% об./об. IVSS.

Поскольку все образцы конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 получали и анализировали в идентичных условиях с% IVSS в разбавителе, представляющем собой физиологический раствор, являющимся единственной переменной для образцов, то логично заключить, что количество белка, загруженного в колонку, варьировало в образцах с 0% IVSS, 1-2% IVSS и 4-10% IVSS в результате потери белка; причем это происходило, по-видимому, из-за адсорбции на поверхностях, с которыми молекула контактировала во время обработки. И наоборот, повышенное извлечение конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 в присутствии раствора IVSS, по-видимому, является результатом блокирования адсорбции конструкции на основе биспецифического антитела к EGFRvIII×CD3 к поверхности во время обработки. Это понимание может быть использовано на различных этапах введения лекарственного средства для обеспечения точной доставки активного лекарственного продукта.

Таблица 5. Таблица последовательностей

1	CDR1 VL CD19	искусственная	aa	KASQSVDYDGDGDSYLN
2	CDR2 VL CD19	искусственная	aa	DASNLVS
3	CDR3 VL CD19	искусственная	aa	QQSTEDPWT
4	CDR1 VH CD19	искусственная	aa	SYWMN
5	CDR2 VH CD19	искусственная	aa	QIWPGDGDNTNYNGKFKG
6	CDR3 VH CD19	искусственная	aa	RETTTVGRYYYAMDY

7	VL CD19	искусственная	aa	DIQLTQSPASLAVSLGQRATIS CKASQSVVDYDGDSYLNWYQ QIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP PRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKV DAATYHCQQSTEDPWFSGGG TKLEIK
8	VH CD19	искусственная	aa	QVQLQQSGAELVRPGSSVKIS CKASGYAFSSYWMNWVKQR PGQGLEWIGQIWPGDGDTNY NGKFKGKATLTADESSSTAY MQLSSLASEDSAVYFCARRET TTVGRYYYAMDYWGQGTTV TVSS
9	CDR1 VH CD3	искусственная	aa	RYTMH
10	CDR2 VH CD3	искусственная	aa	YINPSRGYTNYNQKFKD
11	CDR3 VH CD3	искусственная	aa	YYDDHYCLDY
12	CDR1 VL CD3	искусственная	aa	RASSSVSYMN
13	CDR2 VL CD3	искусственная	aa	DTSKVAS
14	CDR3 VL CD3	искусственная	aa	QQWSSNPLT
15	VH CD3	искусственная	aa	DIKLQQSGAELARPGASVKM SCKTSGYTFTRYTMHWVKQR PGQGLEWIGYINPSRGYTNYN QKFKDKATLTTDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYCYARYD DHYCLDYWGQGTTLTVSS
16	VL CD3	искусственная	aa	VDDIQLTQSPAIMSASPGEKV TMTCRASSSVSYMNWYQQKS GTSPKRWIYDTSKVASGVPIR FSGSGSGTSYSLTISSEAEADA ATYYCQQWSSNPLTFGAGTK LELK
17	BLINCYTO scFv к CD19xCD3, включая линкер и his-метку	искусственная	aa	DIQLTQSPASLAVSLGQRATIS CKASQSVVDYDGDSYLNWYQ QIPGQPPKLLIYDASNLVSGIP PRFSGSGSGTDFTLNIHPVEKV DAATYHCQQSTEDPWFSGGG TKLEIKGGGGSGGGSGGGG SQVQLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKQ RPGQGLEWIGQIWPGDGDTN YNGKFKGKATLTADESSSTA YMQLSSLASEDSAVYFCARR ETTTVGRYYYAMDYWGQGT TVTSSGGGGSDIKLQQSGAE LARPGASVKMSCKTSGYTFT RYTMHWVKQRPGQGLEWIG

				YINPSRGYTNYNQKFKDKAT LTTDKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARYYDDHYCLDYW GQGTLLTVSSVEGGSGGSGGS GGSGGVDDIQLTQSPAIMSAS PGEKVTMTCRASSVSVMNW YQQKSGTSPKRWIYDTSKVA SGVPYRFSGSGSGTSYSLTISS MEAEDAATYYCQQWSSNPLT FGAGTKLELKHSHHHH
18	CDR-L1 I2C	искусственная	aa	GSSTGAVTSGNYPN
19	CDR-L2 I2C	искусственная	aa	GTKFLAP
20	CDR-L3 I2C	искусственная	aa	VLWYSNRWW
21	CDR-H1 I2C	искусственная	aa	KYAMN
22	CDR-H2 I2C	искусственная	aa	RIRSKYNNYATYYADSVKD
23	CDR-H3 I2C	искусственная	aa	HGNFGNSYISYWAY
24	VH I2C	искусственная	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVSS
25	VL I2C	искусственная	aa	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVL
26	VH-VL I2C	искусственная	aa	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNKYAMNWVRQA PGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNNLKTEDTAVYYCVR HGNFGNSYISYWAYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGGS QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQQK PGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFSGSLGGKAALTLSGVQPE DEAEYYCVLWYSNRWVFGG GTKLTVL
27	E11 ccVH CD33	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQCLEWMGWINTYTGEPT YADKFQGRVTMTTDTSTSTA

				YMEIRNLGGDDTAVYYCAR WSWSDGYVYFDYWGGTS VTVSS
28	E11 VH CD33	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQGLEWMGWINTYTGEPT YADKFQGRVTMTTDTSTSTA YMEIRNLGGDDTAVYYCAR WSWSDGYVYFDYWGGTS VTVSS
29	E11 HCDR1 CD33	искусственная	aa	NYGMN
30	E11 HCDR2 CD33	искусственная	aa	WINTYTGEPTYADKFQG
31	E11 HCDR3 CD33	искусственная	aa	WSWSDGYVYFDY
32	E11 CC VL CD33	искусственная	aa	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTIN CKSSQSVLDSSTNKNSLAWY QQKPGQPPKLLLSWASTRESG IPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQP EDSATYYCQSAHFPITFGCG TRLEIK
33	E11 VL CD33	искусственная	aa	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTIN CKSSQSVLDSSTNKNSLAWY QQKPGQPPKLLLSWASTRESG IPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQP EDSATYYCQSAHFPITFGQG TRLEIK
34	E11 LCDR1 CD33	искусственная	aa	KSSQSVLDSSTNKNSLA
35	E11 LCDR2 CD33	искусственная	aa	WASTRES
36	E11 LCDR3 CD33	искусственная	aa	QSAHFPIT
37	E11 CC HL CD33	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQCLEWMGWINTYTGEPT YADKFQGRVTMTTDTSTSTA YMEIRNLGGDDTAVYYCAR WSWSDGYVYFDYWGGTS VTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTIN CKSSQSVLDSSTNKNSLAWY QQKPGQPPKLLLSWASTRESG

				IPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQP EDSATYYCQQAHPITFGCG TRLEIK
38	E11 HL CD33	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQGLEWMGWINTYTGEPT YADKFQGRVTMTTDTSTSTA YMEIRNLGGDDTAVYYCAR WSWSDGYVYFDYWGGGTS VTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTIN CKSSQSVLDSSTNKNSLAWY QQKPGQPPKLLSWASTRESG IPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQP EDSATYYCQQAHPITFGCG TRLEIK
39	Биспецифическа я молекула E11 HL CC CD33 x I2C HL	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQCLEWMGWINTYTGEPT YADKFQGRVTMTTDTSTSTA YMEIRNLGGDDTAVYYCAR WSWSDGYVYFDYWGGGTS VTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTIN CKSSQSVLDSSTNKNSLAWY QQKPGQPPKLLSWASTRESG IPDRFSGSGSGTDFTLTIDSPQP EDSATYYCQQAHPITFGCG TRLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL
40	E11 HL x I2C HL CD33	искусственная	aa	MGWSCILFLVATATGVHSQV QLVQSGAEVKKPGESVKVSC KASGYTFTNYGMNWVKQAP GQGLEWMGWINTYTGEPTYA DKFQGRVTMTTDTSTSTAYM EIRNLGGDDTAVYYCARWSW SDGYVYFDYWGGGTSVTVS SGGGGSGGGSGGGGSDIVM

				<p>TQSPDSLTVSLGERTTINCKSS QSVLDSSTNKNSLAWYQQKP GQPPKLLLSWASTRESGIPDR FSGSGSGTDFLTIDSPQPEDS ATYYCQQSAHFPITFGQGTRL EIKSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQT VVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLHHHHHH</p>
41	<p>Биспецифическа я молекула с HLE CC CD33 х I2C-scFc</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVQSGAEVKKPGESVKV SCKASGYTFTNYGMNWVKQ APGQCLEWMGWINTYTGEPT YADKFQGRVTMTTDTSTSTA YMEIRNLGGDDTAVYYCAR WSWSDGYVYFDYWGQGTS VTVSSGGGGSGGGSGGGGS DIVMTQSPDSLTVSLGERTTIN CKSSQSVLDSSTNKNSLAWY QQKPGQPPKLLLSWASTRESG IPDRFSGSGSGTDFLTIDSPQP EDSATYYCQQSAHFPITFGCG TRLEIKSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGLVTVSSGGG GSGGGSGGGGSQT VVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK</p>

				GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGGSGGGSGGGGSDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
42	CDR1 VH EGFRvIIIxCD3- scFc	искусственная	aa	NYGMH
43	CDR2 VH EGFRvIIIxCD3- scFc	искусственная	aa	VIWYDGSDKYYADSVRG
44	CDR3 VH EGFRvIIIxCD3- scFc	искусственная	aa	DGYDILTGNPRDFDY
45	CDR1 VL EGFRvIIIxCD3- scFc	искусственная	aa	RSSQSLVHSDGNTYLS
46	CDR2 VL EGFRvIIIxCD3- scFc	искусственная	aa	RISRRFS
47	CDR3 VL EGFRvIIIxCD3- scFc	искусственная	aa	MQSTHVPRT
48	VH EGFRvIII_CCxC D3-scFc	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRL SCAASGFTFRNYGMHWVRQ APGKCLEWVAVIWYDGSDK YYADSVRGRFTISRDNKNTL YMQMNSLRAEDTAVYYCARD

				GVDILTGNPRDFDYWGQGT LTVSS
49	VL EGFRvIII_CCxC D3-scFc	искусственная	aa	DTVMTQTPLSSHVTLGQPASI SCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQ QRPQPPRLLIYRISRRFSGVP DRFSGSGAGTDFTLLEISRVEA EDVGVYYCMQSTHVPRTFGC GTKVEIK
50	EGFRvIII_CCxC D3-scFc scFv	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRL SCAASGFTFRNYGMHWVRQ APGKCLEWVAVIWYDGSDK YYADSVRGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARD GVDILTGNPRDFDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGGS DTVMTQTPLSSHVTLGQPASI SCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQ QRPQPPRLLIYRISRRFSGVP DRFSGSGAGTDFTLLEISRVEA EDVGVYYCMQSTHVPRTFGC GTKVEIK
51	Биспецифическа я молекула EGFRvIII_CCxC D3-scFc	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRL SCAASGFTFRNYGMHWVRQ APGKCLEWVAVIWYDGSDK YYADSVRGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARD GVDILTGNPRDFDYWGQGT LTVSSGGGGSGGGSGGGGS DTVMTQTPLSSHVTLGQPASI SCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQ QRPQPPRLLIYRISRRFSGVP DRFSGSGAGTDFTLLEISRVEA EDVGVYYCMQSTHVPRTFGC GTKVEIKSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNS YISYWAYWGQGLTVTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL
52	Биспецифическа я молекула с	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQSGRSLRL SCAASGFTFRNYGMHWVRQ APGKCLEWVAVIWYDGSDK

	HLE EGFRvIII_CCxC D3-scFc			YYADSVRGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARD GYDILTGNPRDFDYWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGGS DTVMTQTPLSSHVTLGQPASI SCRSSQSLVHSDGNTYLSWLQ QRPQQPPRLLIYRIRRFSGVP DRFSGSGAGTDFLEISRVEA EDVGVYYCMQSTHVPRTFGC GTKVEIKSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSAASGFTF NKYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSNTAYLQMN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNS YISYWAYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGSGGGGSQTVVTQE PSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQKPGQAPRG LIGGTKFLAPGTPARFSGSLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGDKTHCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGSGGGSGGGGSDKTHC PCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
53	CDR1 VH MSLN_5	искусственная	aa	DYYMT

54	CDR2 MSLN_5	VH	искусственная	aa	YISSSGSTIYYADSVKG
55	CDR3 MSLN_5	VH	искусственная	aa	DRNSHFDY
56	CDR1 MSLN_5	VL	искусственная	aa	RASQGINTWLA
57	CDR2 MSLN_5	VL	искусственная	aa	GASGLQS
58	CDR3 MSLN_5	VL	искусственная	aa	QQAQSFPR
59	VH MSLN_5		искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSDYYMTWIRQAP GKGLEWLSYISSSGSTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLFLQM NSLRAEDTAVYYCARDRNSH FDYWGQGLTVSS
60	VL MSLN_5		искусственная	aa	DIQMTQSPSSVSASVGDRTI TCRASQGINTWLAWYQKPG KAPKLLIYGASGLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA TYYCQQAQSFPRFTFGQGTKV EIK
61	scFv MSLN_5		искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSDYYMTWIRQAP GKGLEWLSYISSSGSTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLFLQM NSLRAEDTAVYYCARDRNSH FDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSVS ASVGDRTITCRASQGINTWL AWYQKPGKAPKLLIYGASG LQSGVPSRFSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQAQSFPR FTFGQGTKVEIK
62	Биспецифическа я MSLN_5xI2C0 HLE		искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSDYYMTWIRQAP GKGLEWLSYISSSGSTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLFLQM NSLRAEDTAVYYCARDRNSH FDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIQMTQSPSSVS ASVGDRTITCRASQGINTWL AWYQKPGKAPKLLIYGASG LQSGVPSRFSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQAQSFPR

				<p>TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLKLSAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSQTVVT QEPLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVL</p>
63	<p>Биспецифическа я молекула с HLE MSLN_5xCD3- scFc</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSDDYMTWIRQAP GKGLEWLSYISSGSTIYYAD SVKGRFTISRDNKNSLFLQM NSLRAEDTAVYYCARDNRSH FDYWGQGLTVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSDIQMTQSPSSVS ASVGDRVTITCRASQGINWL AWYQKPKGKAPKLLIYGASG LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQAKSFPR TFGQGTKVEIKSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLKLSAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSQTVVT QEPLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLGGGGDKTHCPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ</p>

				<p>KSLSLSPGKGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSD KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFPYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
64	<p>Биспецифическа я молекула с HLE MSLN_5_CCxC D3-scFc</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGLVKPGGSLRL SCAASGFTFSDHYMSWIRQAP GKCLEWFSYISSGGIYYADS VKGRFTISRDNKNSLYLQM NSLRAEDTAVYYCARDVGS FDYWGQGLTVTVSSGGGSG GGGSGGGSDIQMTQSPSSVS ASVDRVTITCRASQDISRWL AWYQQKPGKAPKLLISAASR LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFAIYYCQQAQSFPR TFGCGTKVEIKSGGGGSEVQL VESGGGLVQPGGSLKLSCAAS GFTFNKYAMNWVRQAPGKG LEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYISYWAYWGQGLTVTVSS GGGSGGGGSGGGGSGQTVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSST GAVTSGNYPNWVQKPGQA PRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS LLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKL TVLGGGGDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVL DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGKGGGSGGGGSG</p>

				GGGSGGGGSGGGGSGGGGSD KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	CDR-H1 CDH19 65254.007	искусственная	aa	SYGMH
66	CDR-H2 CDH19 65254.007	искусственная	aa	FIWYEGSNKYAESVKD
67	CDR-H3 CDH19 65254.007	искусственная	aa	RAGIIGTIGYYYGMDV
68	CDR-L1 CDH19 65254.007	искусственная	aa	SGDRLGEKYTS
69	CDR-L2 CDH19 65254.007	искусственная	aa	QDTRPS
70	CDR-L3 CDH19 65254.007	искусственная	aa	QAWESSTVV
71	VH CDH19 65254.007	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQPGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIWYEGSNKY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT TVSS
72	VL CDH19 65254.007	искусственная	aa	SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIYQDTRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGGGTKLT VLS
73	VH-VL CDH19 65254.007	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQPGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIWYEGSNKY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT TVSSGGGGSGGGGSGGGGS

				SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIYQDTKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGGGTKLT VLS
74	CDH19 65254.007 x I2C	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIWYEGSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT TVSSGGGGSGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIYQDTKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGGGTKLT VLSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGLTVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLHHHHHH
75	Биспецифическая молекула с HLE CDH19 65254.007 x I2C-scFc	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIWYEGSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT TVSSGGGGSGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIYQDTKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGGGTKLT VLSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWA

				<p>YWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLGGGGDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVVS NKALPAIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKGG GGSGGGSGGGGGSGGGSGG GGSGGGSDKHTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVL DSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>
76	<p>Биспецифическа я молекула с HLE CDH19 65254.007 x I2C- scFc_delGK</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKGLEWVAFIWEYSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIYQDTRKPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFVGGGKLT VLSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWA</p>

				<p>YWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLGGGGDK THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
77	CDH19 65254.007_CC x VH I2C-scFc	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAFIWYEGSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYGMDVWGQGT VTVSS</p>
78	CDH19 65254.007_CC x VL I2C-scFc	искусственная	aa	<p>SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIYQDTRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFSGGKTLT VL</p>
79	CDH19 65254.007_CC x I2C-scFc scFv	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAFIWYEGSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA</p>

				<p>GIIGTIGYYYGMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIIYQDTRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGCGTKLT VL</p>
80	<p>Биспецифическа я молекула CDH19 65254.007_CC х I2C-scFc</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAFIWEYEGSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIIYQDTRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGCGTKLT VLSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS RDDSKNATYLMNNTKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVL</p>
81	<p>Биспецифическа я молекула с HLE CDH19 65254.007_CC х I2C-scFc</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAFIWEYEGSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIIYQDTRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFGCGTKLT VLSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS</p>

				RDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFGNSYISYWA YWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNY NWVQQKPGQAPRGLIGGTFK LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLGGGGDK THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
82	Биспецифическая молекула с HLE CDH19 65254.007_CC x I2C-scFc_delGK	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAFIWEYSNKYY AESVKDRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCARRA GIIGTIGYYYGMDVWGQGT VTVSSGGGGSGGGSGGGGS SYELTQPPSVSVSPGQTASITC SGDRLGEKYTSWYQQRPGQS PLLVIIYQDTKRPSGIPERFSGS NSGNTATLTISGTQAMDEAD YYCQAWESSTVVFSGGKLT VLSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIR SKYNNYATYYADSVKDRFTIS

				RDDSKNTAYLQMNNLKTEDT AVYYCVRHGNFNGNSYISYWA YWGQGLVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQKPGQAPRGLIGGTKF LAPGTPARFSGSLLGGKAALT LSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVLGGGGDK THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV NKALPAIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGGG GGGGSDKTHTCPPCPAPPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
83	CDR1 VH FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	NARMGVS
84	CDR2 VH FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	HIFSNDEKSYSTSLKN
85	CDR3 VH FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	IVGYGSGWYGFFDY
86	CDR1 VL FLT3_7	искусственная	aa	RASQGIRNDLG

	A8xCD3-scFc			
87	CDR2 VL FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	AASTLQS
88	CDR3 VL FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	LQHNSYPLT
89	VH FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLT CTLSGFSLNARMGVSWIRQP PGKCLEWLAHIFSNDEKSYST SLKNRLTISKDSSKTQVVLTM TNVDPVDTATYYCARIVGYG SGWYGFFDYWGQGLTVTVSS
90	VL FLT3_ A8- scFc	искусственная	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CRASQGIRNDLGWYQQKPGK APKRLIYAASTLQSGVPSRFS GSGSGTEFTLTISLQPEDFAT YYCLQHNSYPLTFGCGTKVEI K
91	FLT3_7 A8xCD3-scFv	искусственная	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLT CTLSGFSLNARMGVSWIRQP PGKCLEWLAHIFSNDEKSYST SLKNRLTISKDSSKTQVVLTM TNVDPVDTATYYCARIVGYG SGWYGFFDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRL IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCLQH NSYPLTFGCGTKVEIK
92	Биспецифическа я молекула FLT3_7 A8xCD3	искусственная	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLT CTLSGFSLNARMGVSWIRQP PGKCLEWLAHIFSNDEKSYST SLKNRLTISKDSSKTQVVLTM TNVDPVDTATYYCARIVGYG SGWYGFFDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRL IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCLQH NSYPLTFGCGTKVEIKSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYA

				TYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVL
93	Биспецифическа я молекула с HLE FLT3_7 A8xCD3-scFc	искусственная	aa	QVTLKESGPTLVKPTETLTLT CTLSGFSLNARMGVSWIRQP PGKCLEWLAHIFSNDEKSYST SLKNRLTISKDSSKTQVVLTM TNVDPVDTATYYCARIVGYG SGWYGFFDYWGQGTLTVVSS GGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASQ GIRNDLGWYQQKPGKAPKRL IYAASTLQSGVPSRFSGSGSGT EFTLTISLQPEDFATYYCLQH NSYPLTFGCGTKVEIKSGGGG SEVQLVESGGGLVQPGGSLKL SCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYA TYYADSVKDRFTISRDDSKNT AYLQMNLLKTEDTAVYYCV RHGNFGNSYISYWAYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTL TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTP ARFSGSLLGGKAALTLSGVQP EDEAEYYCVLWYSNRWVFG GGTKLTVLGGGGDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTK PCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGKGGGGSGG GSGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSDDKHTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT

				CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFPYSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
94	CDR1 VH DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	SYYS
95	CDR2 VH DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	YVYYSGTTNYPNPSLKS
96	CDR3 VH DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	IAVTGFYFDY
97	CDR1 VL DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	RASQRVNNNYLA
98	CDR2 VL DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	GASSRAT
99	CDR3 VL DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	QQYDRSPLT
100	VH DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KCLEWIGYVYYSGTTNYPNPS LKSRTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCASIAVTGFY FDYWGQGLTVVSS
101	VL DLL3_1_CC_del GK	искусственная	aa	EIVLTQSPGTLSPGERVTLS CRASQRVNNNYLAWYQQR GQAPRLLIYGASSRATGIPDRF SGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYDRSPLTFGCGTKL EIK
102	DLL3_1_CC_del	искусственная	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT

	GK			CTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KCLEWIGYVYYSGTTNYPNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCASIAVTGFY FDYWGQGTTLVTVSSGGGGSG GGSGGGGSEIVLTQSPGTL LSPGERVTLSCRASQRVNNNY LAWYQQRPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYDRSP LTFGCGTKLEIK
103	Биспецифическая молекула DLL3_1_CCxCD 3_delGK	искусственная	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KCLEWIGYVYYSGTTNYPNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCASIAVTGFY FDYWGQGTTLVTVSSGGGGSG GGSGGGGSEIVLTQSPGTL LSPGERVTLSCRASQRVNNNY LAWYQQRPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYDRSP LTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCA ASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGTTLV VSSGGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTFKFLAPGTPARF SGSLLGGKAALTLSGVQPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVL
104	Биспецифическая молекула с HLE DLL3_1_CCxCD 3-scFc_delGK	искусственная	aa	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLT CTVSGGSISSYYWSWIRQPPG KCLEWIGYVYYSGTTNYPNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCASIAVTGFY FDYWGQGTTLVTVSSGGGGSG GGSGGGGSEIVLTQSPGTL LSPGERVTLSCRASQRVNNNY LAWYQQRPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQYDRSP LTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLKLSCA

				ASGFTFNKYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYL QMNNLKTEDTAVYYCVRHG NFGNSYISYWAYWGQGLVT VSSGGGSGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLTCG SSTGAVTSGNYPNWVQQKPG QAPRGLIGGTKFLAPGTPARF SGSLGGAALTLGVPPEDE AEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVLGGGGDKTHCPCPCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPCEE QYGSTYRCVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGGGSGGGGSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDKT HTCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
105	CDR1 VH CD19 97-G1RE-C2	искусственная	aa	SYGMH
106	CDR2 VH CD19 97-G1RE-C2	искусственная	aa	VISYEGSNKYAESVKG
107	CDR3 VH CD19 97-G1RE-C2	искусственная	aa	DRGTIFGNYLEV
108	VH CD19 97- G1RE-C2 CC	искусственная	aa	QVQLVESGGGVVQPGRSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQA PGKCLEWVAVISYEGSNKYY AESVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRDEDTAVYYCARDR

				GTIFGNYGLEVWGQGTTVTVSS
109	CDR1 VL CD19 97-G1RE-C2	искусственная	aa	RSSQSLLHKNAFNLYD
110	CDR2 VL CD19 97-G1RE-C2	искусственная	aa	LGSNRAS
111	CDR3 VL CD19 97-G1RE-C2	искусственная	aa	MQALQTPFT
112	VL CD19 97- G1RE-C2 CC	искусственная	aa	DIVMTQSPLSLPVISGEPASISC RSSQSLLHKNAFNLYDWYLQ KPGQSPQLLIYLGSNRASGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAE DVGVYYCMQALQTPFTFGCG TKVDIK
113	CD19 97-G1RE- C2 CC x I2C0	искусственная	aa	MDMRVPAQLLGLLLWLRG ARCDIVMTQSPLSLPVISGEP SISCRSSQSLLHKNAFNLYDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQALQTPFT FGCGTKVDIKGGGGSGGGGS GGGGSQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKCLEWVAVISYEG SNKYAESVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARDRGTIFGNYGLEVWGQGT TVTVSSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL
114	CD19 97-G1RE- C2 CC x I2C0- scFc	искусственная	aa	MDMRVPAQLLGLLLWLRG ARCDIVMTQSPLSLPVISGEP SISCRSSQSLLHKNAFNLYDW YLQKPGQSPQLLIYLGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCMQALQTPFT

				<p> FGCGTKVDIKGGGGSGGGGS GGGGSQVQLVESGGGVVQPG RSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKCLEWVAVISYEG SNKYAESVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRDEDTAVYYC ARDRGTIFGNYGLEVWGQGT TVTSSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGTTLTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGGDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGSGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDKTHC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK </p>
115	CDR1 VH CDH3 G8A 6-B12	искусственная	aa	SYPIN
116	CDR2 VH CDH3	искусственная	aa	VIWTGGGTNYASSVKG

	G8A 6-B12			
117	CDR3 VH CDH3 G8A 6-B12	искусственная	aa	SRGVYDFDGRGAMDY
118	CDR1 VL CDH3 G8A 6-B12	искусственная	aa	KSSQSLLYSSNQKNYFA
119	CDR2 VL CDH3 G8A 6-B12	искусственная	aa	WASTRES
120	CDR3 VL CDH3 G8A 6-B12	искусственная	aa	QQYYSYPYT
121	CDH3 VH G8A 6-B12	искусственная	aa	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSSYPINWVRQAPG KGLEWVGVIWTGGGTNYASS VKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAKSRGVY DFDGRGAMDYWGQGLTVTV SS
122	CDH3 VL G8A 6-B12	искусственная	aa	DIVMTQSPDSLAVSLGERATI NCKSSQSLLYSSNQKNYFAW YQQKPGQPPKLLIWASTRES GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQYYSYPYTF GQGTKLEIK
123	CDH3 G8A 6- B12 scFv	искусственная	aa	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSSYPINWVRQAPG KGLEWVGVIWTGGGTNYASS VKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAKSRGVY DFDGRGAMDYWGQGLTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLYSSNQKNYFAWYQQ KPGQPPKLLIWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSYPYTFGQG TKLEIK
124	Биспецифическа я молекула CDH3 G8A 6- B12 x I2C0	искусственная	aa	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSFSSYPINWVRQAPG KGLEWVGVIWTGGGTNYASS VKGRFTISRDN SKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAKSRGVY DFDGRGAMDYWGQGLTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSDIV MTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLYSSNQKNYFAWYQQ KPGQPPKLLIWASTRESGVP

				DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSYPYTFGQG TKLEIKSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGLVTVSSGGG GSGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL
125	Биспецифическа я молекула с HLE CDH3 G8A 6-B12 x I2C0	искусственная	aa	EVQLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFSSYPINWVRQAPG KLEWVGVWITGGGTNYASS VKGRFTISRDNKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCAKSRGVY DFDGRGAMDYWGQGLVTV SSGGGGSGGGSGGGSDIV MTQSPDSLAVSLGERATINCK SSQSLLYSSNQKNYFAWYQQ KPGQPPKLLIYWASTRESGVP DRFSGSGSGTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSYPYTFGQG TKLEIKSGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFN KYAMNWVRQAPGKLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKD RFTISRDDSKNTAYLQMNNL KTEDTAVYYCVRHGNFGNSY ISYWAYWGQGLVTVSSGGG GSGGGSGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQKPGQAPRGL IGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYC VLWYSNRWVFGGGTKLTVL GGGDKTHTCPPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGS

				FFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGKGGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSDKTHTC PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPCEEQYGSTYRCVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYV LPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTV KSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
126	CDR1 VH BCMA A7 27- C4-G7	искусственная	aa	NHHH
127	CDR2 VH BCMA A7 27- C4-G7	искусственная	aa	YINPYPGYHAYNEKFQG
128	CDR3 VH BCMA A7 27- C4-G7	искусственная	aa	DGYRDTDVLDY
129	CDR1 VL BCMA A7 27-C4-G7	искусственная	aa	QASQDISNYLN
130	CDR2 VL BCMA A7 27-C4-G7	искусственная	aa	YTSRLHT
131	CDR3 VL BCMA A7 27-C4-G7	искусственная	aa	QQGNTLPWT
132	VH BCMA A7 27-C4-G7 CC (44/100)	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNHHHWVRQAP GQCLEWMGYINPYPGYHAYN EKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSEDVAVYYCARDGY YRDTDVLDYWGQGLVTVSS
133	VL BCMA A7 27-C4-G7 CC (44/100)	искусственная	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CQASQDISNYLNWYQKPGK APKLLIYYTSRLHTGVPSRFSG SGSGTDFTFISSLEPEDIATY YCQQGNTLPWTFGCGTKLEI K

134	BCMA A7 27- C4-G7 CC (44/100) scFv	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNHHWVRQAP GQCLEWMGYINPYPGYHAYN EKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYCARDGY YRDTDVLДYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSG TDFTFISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKLEIK
135	Биспецифическа я молекула BCMA A7 27- C4-G7 CC (44/100) x I2C0	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNHHWVRQAP GQCLEWMGYINPYPGYHAYN EKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYCARDGY YRDTDVLДYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSG TDFTFISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKLEIKSGGG GSEVQLVESGGGLVQPGGSL KLSCAASGFTFNKYAMNWVR QAPGKLEWVARIRSKYNNY ATYYADSVKDRFTISRDDSKN TAYLQMNNLKTEDТАVYYC VRHGNFGNSYISYWAYWGQ GTLTVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQTVVTQEPSLTVSPGGTV TLTCGSSTGAVTSGNYPNWV QQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG TPARFSGSLLGGKAALTLGSV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVF GGGTKLTVL
136	Биспецифическа я молекула с HLE BCMA A7 27-C4-G7 CC (44/100) x I2C0- scFc	искусственная	aa	QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNHHWVRQAP GQCLEWMGYINPYPGYHAYN EKFQGRATMTSDTSTSTVYM ELSSLRSEDТАVYYCARDGY YRDTDVLДYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCQAS QDISNYLNWYQQKPGKAPKL LIYYTSRLHTGVPSRFSGSGSG TDFTFISSLEPEDIATYYCQQ GNTLPWTFGCGTKVEIKSGG

				GGSEVQLVESGGGLVQPGGG LKLSCAASGFTFNKYAMNWV RQAPGKGLEWVARIRSKYNN YATYYADSVKDRFTISRDDSK NTAYLQMNNLKTEDTAVYY CVRHGNFGNSYISYWAYWG QGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPLTVSPGGT VLTCSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSDKHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
137	CDR1 VH PM 76-B10.17 CC	искусственная	aa	DYYMY
138	CDR2 VH PM 76-B10.17 CC	искусственная	aa	IISDAGYYTYYSDIKGG
139	CDR3 VH PM 76-B10.17 CC	искусственная	aa	GFPLLRHGAMDY
140	CDR1 VL PM 76-B10.17 CC	искусственная	aa	KASQNV DANVA

141	CDR2 VL PM 76-B10.17 CC	искусственная	aa	SASYVYW
142	CDR3 VL PM 76-B10.17 CC	искусственная	aa	QQYDQLIT
143	VH PM 76- B10.17 CC	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS
144	VL PM 76- B10.17 CC	искусственная	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CKASQNV DANVAWYQQKPG QAPKSLIYSASYVYWDVPSRF SGSASGTDFTLTISSVQSEDF ATYYCQQYDQLITFGCGTKLE IK
145	PM 76-B10.17 CC scFv	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQLITFGCGTKLEIK
146	Биспецифическа я молекула PM 76-B10.17 CC х I2C0	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGS

				GGGGSQTVVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
147	Биспецифическа я РМ 76–В10.17 СС х I2C0–scFc молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGSGGGSGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFSGSA SGTDFLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGSGGGGS GGGGSQTVVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGG GSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGSDKTHTCPPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI

				SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
148	Биспецифическа я РМ 76–В10.17 СС х I2C0– scFc_delGK молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSYYMYWVRQAP GKCLEWVAISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNLIKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTFKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGG GGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA

				KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
149	Биспецифическая молекула PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGQTVVTQEPSLTVSPGGT VLTCSSTGAVTSGNYPNW VQKPGQCPRLIGGKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL
150	Биспецифическая PM 76-B10.17 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG

				<p> QGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQCPRGLIGGKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGSSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGS GGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK </p>
151	<p> Биспецифическа я РМ 76–В10.17 СС x I2C0 СС (103/43)– scFc_delGK молекула HLE </p>	искусственная	aa	<p> QVQLVESGGGLVKPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDAGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLVTVSS GGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNV DANVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG </p>

				QGTLVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQKPGQCPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSPGGGGSGG GSGGGGGSGGGGGSGGGGGSGG GGS DKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKLSL SPGK
152	CDR1 VH PM 76-B10.11 CC	искусственная	aa	DYYMY
153	CDR2 VH PM 76-B10.11 CC	искусственная	aa	IISDGGYYTYYSDIKKG
154	CDR3 VH PM 76-B10.11 CC	искусственная	aa	GFPLLRHGAMDY
155	CDR1 VL PM 76-B10.11 CC	искусственная	aa	KASQNVDTNVA
156	CDR2 VL PM 76-B10.11 CC	искусственная	aa	SASYVYW
157	CDR3 VL PM 76-B10.11 CC	искусственная	aa	QQYDQQLIT

158	VH PM 76- B10.11 CC	искусственная	aa	QVQLVESGGGLV ^K PGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGT ^L TVVSS
159	VL PM 76- B10.11 CC	искусственная	aa	DIQMTQSPSSLSASV ^G DRVTIT CKASQNVDTNVAWYQQKPG QAPKSLIYSASYVYWDVPSRF SGSASGTDFTLT ^I SSVQSEDFAT TYYCQQYDQQLIT ^F GGG ^T KL EIK
160	PM 76-B10.11 CC scFv	искусственная	aa	QVQLVESGGGLV ^K PGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGT ^L TVVSS GGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASV ^G DRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSR ^F SGSA SGTDFTLT ^I SSVQSEDFATYYC QQYDQQLIT ^F GGG ^T KL ^E IK
161	Биспецифическа я молекула PM 76-B10.11 CC х I2C0	искусственная	aa	QVQLVESGGGLV ^K PGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGT ^L TVVSS GGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASV ^G DRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSR ^F SGSA SGTDFTLT ^I SSVQSEDFATYYC QQYDQQLIT ^F GGG ^T KL ^E IKSG GGGSEVQLVESGGGLV ^Q PGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGT ^L TVVSSGGGGSGGGG GGGGSQTVVTQEP ^S LTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGG ^T KFL APGTPARFSGSLLGGKAAL ^T L SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGG ^T KL ^T VL

162	Биспецифическая РМ 76–В10.11 СС х I2C0–scFc молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVКPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFSGSA SGTDFLTITSSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGGGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGG GSGGGSGGGSGGGSGGG GSGGGGSDKTHCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
-----	--	---------------	----	---

163	<p>Биспецифическая РМ 76–В10.11 СС x I2C0–scFc_delGK молекула HLE</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGLVКPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLVTVSS GGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFSGSA SGTDFLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGGGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGS GGGSGGGSGGGSGGGGS GGGGSDKTHTPCPCPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK</p>
-----	---	---------------	----	---

164	Биспецифическая молекула PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc	искусственная	aa	<p> QVQLVESGGGLVVKPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFLTITSSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGGGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGTLTVSSGGGGSGGGSG GGGQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQKPGQCPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL </p>
165	Биспецифическая PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc молекула HLE	искусственная	aa	<p> QVQLVESGGGLVVKPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSI.SASVGDRVTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFLTITSSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGGGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGTLTVSSGGGGSGGGSG GGGQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQKPGQCPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW </p>

				<p>VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGG GGGGSGGGGSGGGGSGGGG GGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCSCVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK</p>
166	<p>Биспецифическа я РМ 76–В10.11 СС х I2C0 СС (103/43)– scFc_delGK молекула HLE</p>	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKGLEWVAISDGGYYTYYS DIKGRFTISRDNANKSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGGGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVTVQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQCPRLIGGKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW</p>

				VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGGGGGGGG GGSDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCEEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FCSCVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
167	CDR1 VH PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	DYYMY
168	CDR2 VH PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	IISDGGYYTYYSDIKG
169	CDR3 VH PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	GFPLLRHGAMDY
170	CDR1 VL PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	KASQNVDTNVA
171	CDR2 VL PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	SASYVYW
172	CDR3 VL PM 76-B10.11 CC x	искусственная	aa	QQYDQQLIT

	I2C0-scFc			
173	VH PM 76- B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS
174	VL PM 76- B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITF CKASQNVDTNVAWYQQKPG QAPKSLIYSASYVYWDVPSRF SGSASGTDFTLTISVQSEDF ATYYCQQYDQQLITFGCGTKLE IK
175	PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc scFv	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIK
176	Биспецифическа я молекула PM 76-B10.11 CC x I2C0-scFc	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVVKPGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVITITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFL APGTPARFSGSLLGGKAALTL

				SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
177	Биспецифическая РМ 76–В10.11 СС х I2C0–scFc молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKGESLRLS CAASGFTFSDYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTFKL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGG GSGGGSGGGSGGGSGGGG GSGGGGSDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPCEEQ YGSTYRCVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

				QGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
178	Биспецифическая РМ 76–В10.11 СC х I2C0–scFc_delGK молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVКPGESLRLS CAASGFTFSДYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYW GQGLTVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVVTQEPSTLVSPGG TVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTFKL APGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVLGGGGDKT HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV

				FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
179	Биспецифическая молекула PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGLV KPGESLR LSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDGGYYTYYS</p> <p>DIKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLTVTVSS</p> <p>GGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPK</p> <p>SLIYSASYVYWDVPSRFSGSA SGTDFLTITSSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIKSG</p> <p>GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYN</p> <p>NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY</p> <p>YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGTLTVTVSSGGGSGGGGSG</p> <p>GGGQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW</p> <p>VQKPGQCPRLIGGKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG</p> <p>VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVL</p>
180	Биспецифическая PM 76-B10.11 CC x I2C0 CC (103/43)-scFc молекула HLE	искусственная	aa	<p>QVQLVESGGGLV KPGESLR LSCAASGFTFSDYYMYWVRQAPGKCLEWVAIISDGGYYTYYS</p> <p>DIKGRFTISRDN AKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPLLRHGAMDYWGQGLTVTVSS</p> <p>GGGSGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGQAPK</p> <p>SLIYSASYVYWDVPSRFSGSA SGTDFLTITSSVQSEDFATYYCQQYDQQLITFGCGTKLEIKSG</p> <p>GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYN</p> <p>NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY</p> <p>YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGTLTVTVSSGGGSGGGGSG</p> <p>GGGQTVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW</p> <p>VQKPGQCPRLIGGKFLAP</p>

				GTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCEEQYGSTYRCVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGKGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
181	Биспецифическа я РМ 76–В10.11 СС х I2C0 СС (103/43)– scFc_delGK молекула HLE	искусственная	aa	QVQLVESGGGLVKPGESLRLS CAASGFTFSYYMYWVRQAP GKCLEWVAIISDGGYYTYYS DIIKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLKAEDTAVYYCARGFPL LRHGAMDYWGQGLTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRTITCKAS QNVDTNVAWYQQKPGQAPK SLIYSASYVYWDVPSRFSGSA SGTDFTLTISSVQSEDFATYYC QQYDQQLITFGCGTKLEIKSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLKLSCAASGFTFNKYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYCG QGTLTVTVSSGGGGSGGGGSG GGGSQTVVVTQEPSLTVSPGGT VTLTCGSSTGAVTSGNYPNW VQQKPGQCPRLIGGKFLAP

				GTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCVLWYSNRW VFGGGTKLTVLGGGGDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPCFEQYGSTYRCVSVI.TV LHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGSGG GGSGGGGGSGGGGGGGSGG GGSDKTHTCPPCPAPPELLGPP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPCFEQYGST YRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
--	--	--	--	---

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая:

i) конструкцию на основе биспецифического одноцепочечного антитела, связывающуюся с поверхностным антигеном клетки-мишени посредством первого связывающего домена и с Т-клеточным поверхностным антигеном CD3 посредством второго связывающего домена, где конструкция на основе биспецифического антитела присутствует в концентрации в диапазоне от 50 мкг/мл до 20 мг/мл;

ii) по меньшей мере один консервант, выбранный из бензилового спирта, в концентрации, эффективной для подавления роста микроорганизмов, где по меньшей мере один консервант присутствует в концентрации от 0,11 до 0,9% вес./об., и

iii) разбавитель, где разбавитель представляет собой буфер, содержащий соль, выбранную из группы, состоящей из фосфата, ацетата, цитрата, сукцината и тартрата, и/или при этом буфер содержит гистидин, глицин, трис-глицин, трис или их смеси, в котором конструкция на основе биспецифического антитела демонстрирует уменьшение или предотвращение образования белковых агрегатов (виды с высокой молекулярной массой (HMW)) и где процентная концентрация HMW составляет менее 5%, и

при этом указанная композиция готова к использованию без необходимости добавления дополнительных вспомогательных веществ, выбранных из консервантов, стабилизаторов или поверхностно-активных веществ.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где конструкция на основе биспецифического антитела присутствует в концентрации в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из:

(a) от 50 до 200 мкг/мл при pH от 6,5 до 7,5, или

(b) от 50 до 1000 мкг/мл при pH от 4,0 до 6,0, или

(c) от 50 мкг/мл до 2 мг/мл в присутствии средства, стабилизирующего CD3-связывающий домен цитрата, при pH от 4,0 до 7,5, или

(d) от 50 мкг/мл до 10 мг/мл, при pH от 4,0 до 7,5, где биспецифическое антитело содержит третий связывающий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнирный участок, домен CH2 и CH3, при этом указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом с помощью пептидного линкера, и при этом указанный третий связывающий домен содержит в порядке от amino- к карбоксильному концу:

шарнирный участок-CH2-CH3-линкер-шарнирный участок-CH2-CH3.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где разбавитель представляет собой буфер, выбранный из группы, состоящей из фосфата калия, уксусной кислоты/ацетата натрия, лимонной кислоты/цитрата натрия, янтарной кислоты/сукцината натрия, винной кислоты/тартрата натрия и гистидина/гистидина-HCl или их смесей.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где разбавитель представляет собой буфер, присутствующий в концентрации в диапазоне от 0,1 до 150 мМ.

5. Фармацевтическая композиция по п.1, где разбавитель представляет собой буфер, содержащий цитрат в концентрации в диапазоне от 0,25 до 50 мМ.

6. Фармацевтическая композиция по п.1, где рН композиции присутствует в диапазоне от 4,0 до 8,0.

7. Фармацевтическая композиция по п.1, где рН композиции присутствует в диапазоне рН от 4,0 до 5,0 или от 6,0 до 7,5.

8. Фармацевтическая композиция по п.1, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит одно или несколько вспомогательных веществ, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, трегалозы, маннита, сорбита, аргинина, лизина, полисорбата 20, полисорбата 80, полоксамера 188, плуроника и их комбинаций.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, дополнительно содержащая полисорбат и/или лизин-HCL или где композиция не содержит полисорбат и/или лизин-HCL, если концентрация конструкции на основе биспецифического антитела составляет по меньшей мере 10, 15 или 20 мкг/мл.

10. Фармацевтическая композиция по п.1, где первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела связывается по меньшей мере с одним поверхностным антигеном клетки-мишени, выбранным из группы, состоящей из CD19, CD33, EGFRvIII, MSLN, CDH19, FLT3, DLL3, CDH3, BCMA и PSMA.

11. Фармацевтическая композиция по п.1, где первый связывающий домен содержит VH-участок, содержащий CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, и VL-участок, содержащий CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, выбранные из группы, состоящей из:

(a) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 1, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 2, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 3, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 4, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 6,

(b) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 29, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 30, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 31, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 34, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 35, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 36,

(c) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 42, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 43, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 44, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 45, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 46, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 47,

(d) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 53, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 54, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 55, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 56, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 57, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 58,

(e) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 65, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 66, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 67, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 68, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 70,

(f) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 83, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 84, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 85, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 86, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 87, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 88,

(g) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 94, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 95, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 96, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 97, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 98, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 99,

(h) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 105, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 106, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 107, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 109, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 110, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 111,

(i) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 115, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 116, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 117, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 118, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 119, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 120,

(j) CDR-H1, приведенного под SEQ ID NO: 126, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 127, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 128, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 129, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 130, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 131,

(k) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 137, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 138, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 139, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 140, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 141, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 142,

(l) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 152, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 153, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 154, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 155, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 156 и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 157, и

(m) CDR-H1, приведенной в SEQ ID NO: 167, CDR-H2, приведенной в SEQ ID NO: 168, CDR-H3, приведенной в SEQ ID NO: 169, CDR-L1, приведенной в SEQ ID NO: 170, CDR-L2, приведенной в SEQ ID NO: 171, и CDR-L3, приведенной в SEQ ID NO: 172;

12. Фармацевтическая композиция по п.1, где фармацевтическая композиция представляет собой жидкость.

13. Фармацевтическая композиция по п.1, где композиция содержит <5% мультимеров конструкции на основе биспецифического антитела.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, где мультимеры представляют собой димеры.

15. Фармацевтическая композиция по п.1, где фармацевтическая композиция содержит полисорбат 80.

16. Фармацевтическая композиция по п.13, где фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 0,25 мМ цитрата, по меньшей мере 0,0125 мМ лизина и/или по меньшей мере 0,001% полисорбата 80 при рН от 6,5 до 7,5.

17. Фармацевтическая композиция по п.16, где композиция содержит биспецифическое антитело, содержащее третий связывающий домен, который содержит два полипептидных мономера, каждый из которых содержит шарнирный участок, домен СН2 и СН3, при этом указанные два полипептидных мономера слиты друг с другом с помощью пептидного линкера, и при этом указанный третий связывающий домен содержит в порядке от аминок- к карбоксильному концу:

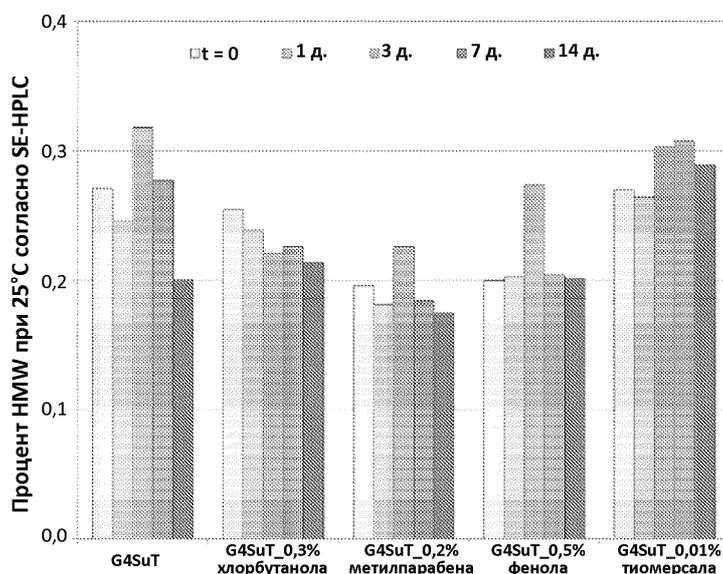
шарнирный участок-СН2-СН3-линкер-шарнирный участок-СН2-СН3.

18. Фармацевтическая композиция по п.1, где композиция предоставлена в виде лиофилизата для хранения.

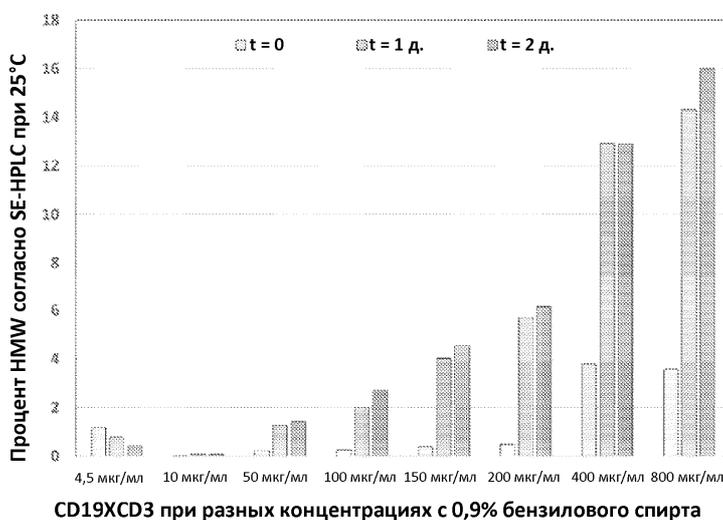
19. Применение фармацевтической композиции по п.1 для лечения злокачественного заболевания.

20. Применение фармацевтической композиции по п.19, которая вводится внутривенно непрерывно в течение 1-24 ч.

21. Применение фармацевтической композиции по п.19, которая вводится внутривенно непрерывно в течение 2-14 дней.

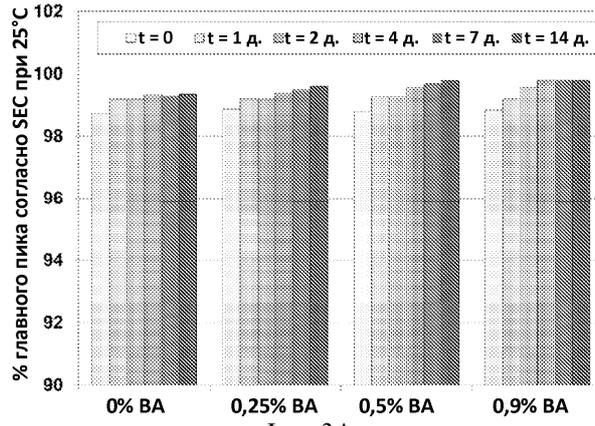


Фиг. 1

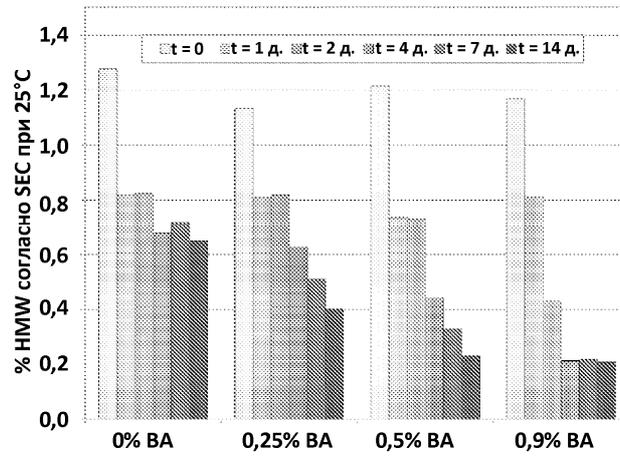


CD19XCD3 при разных концентрациях с 0,9% бензилового спирта

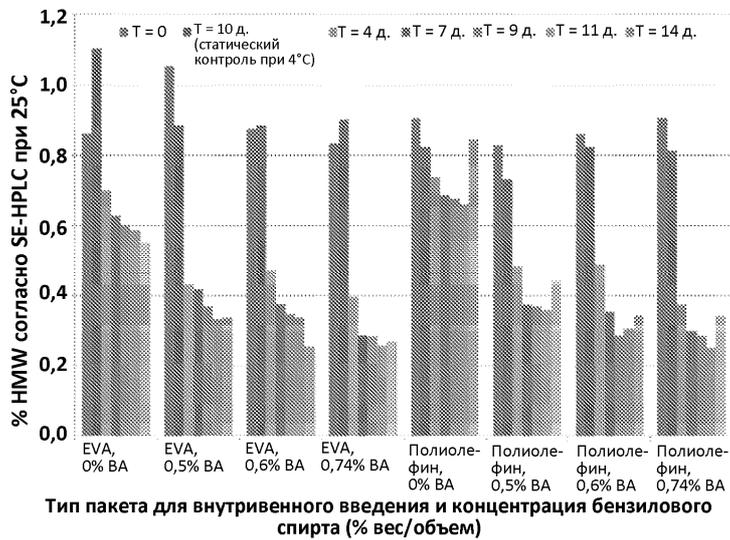
Фиг. 2



Фиг. 3А

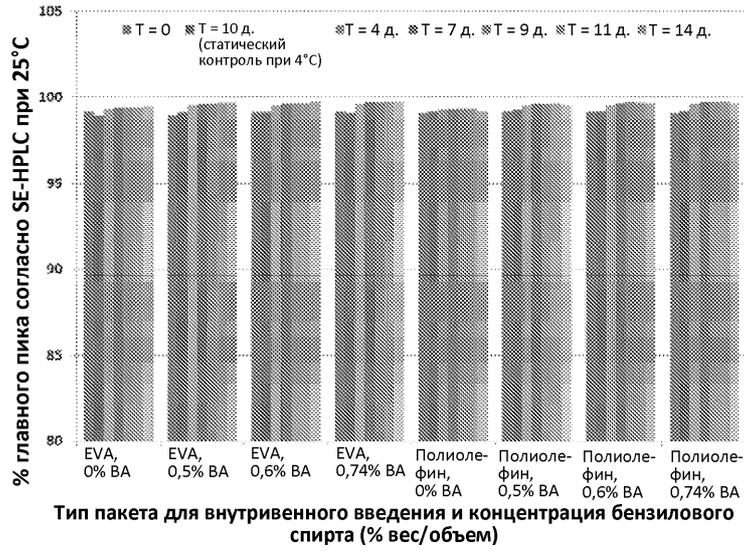


Фиг. 3В

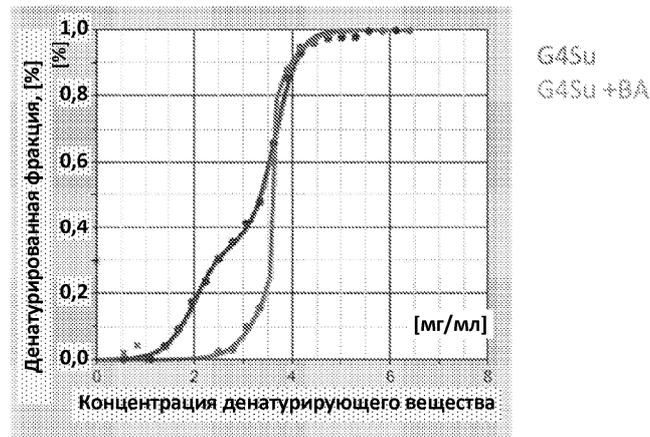


Тип пакета для внутривенного введения и концентрация бензилового спирта (% вес/объем)

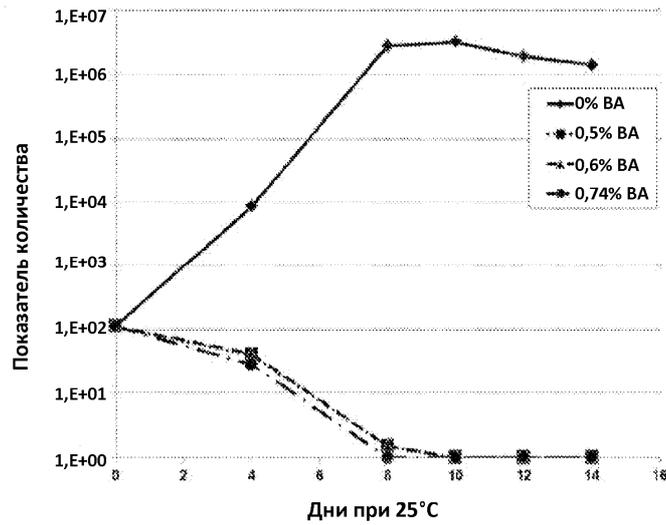
Фиг. 3С



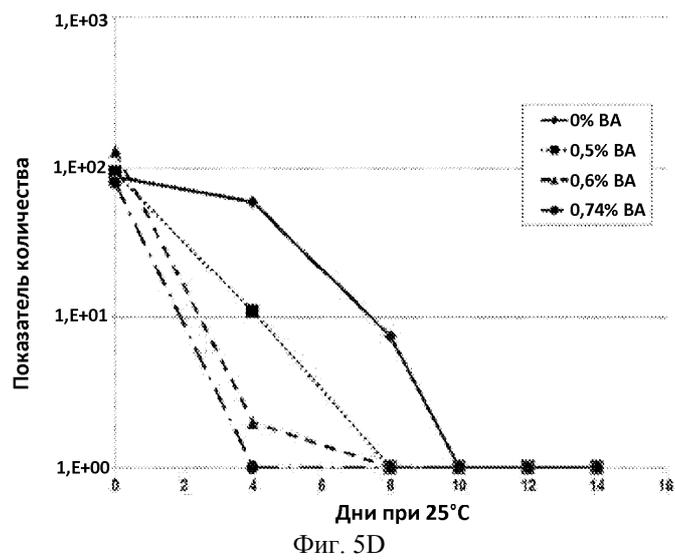
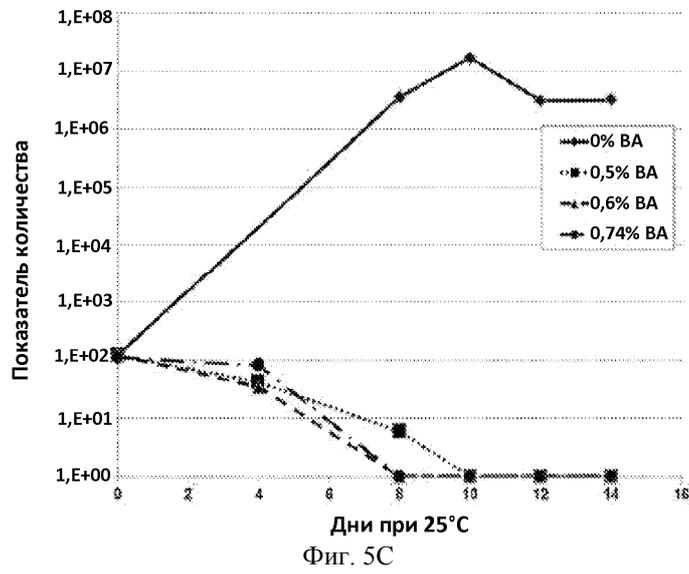
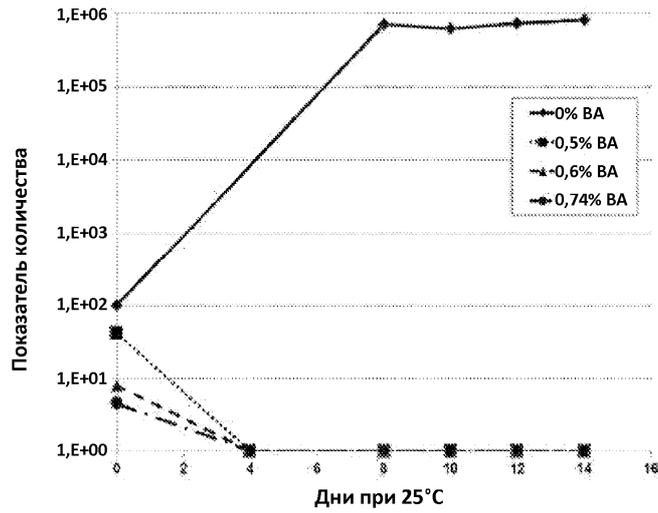
Фиг. 3D

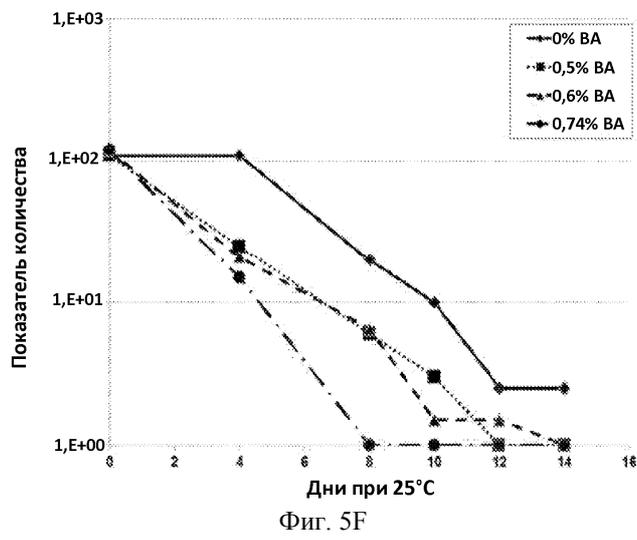
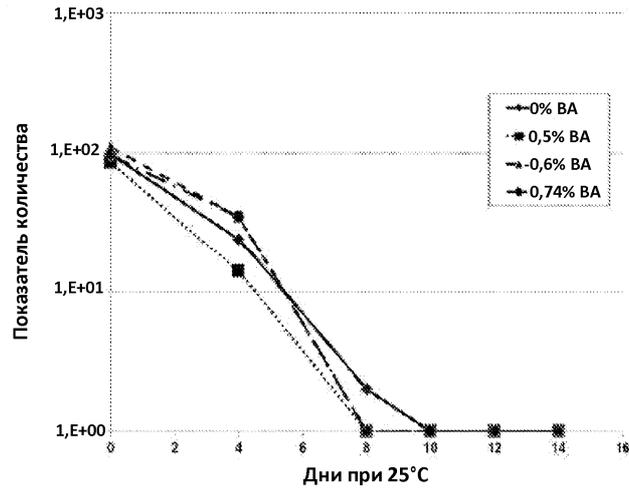


Фиг. 4

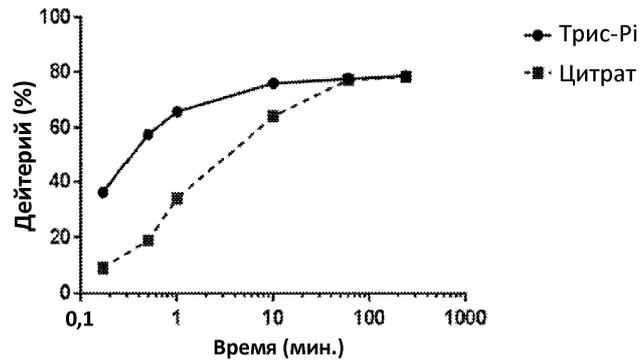


Фиг. 5A

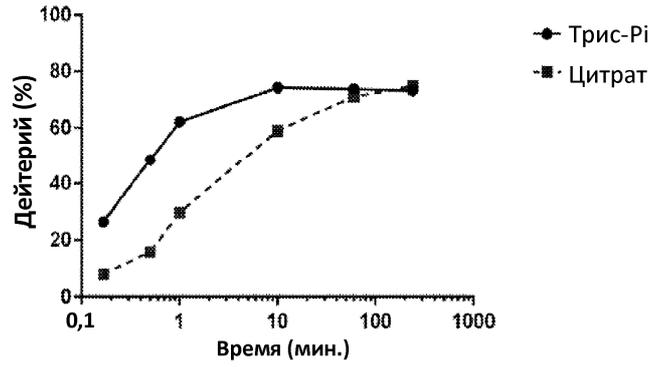




366-370

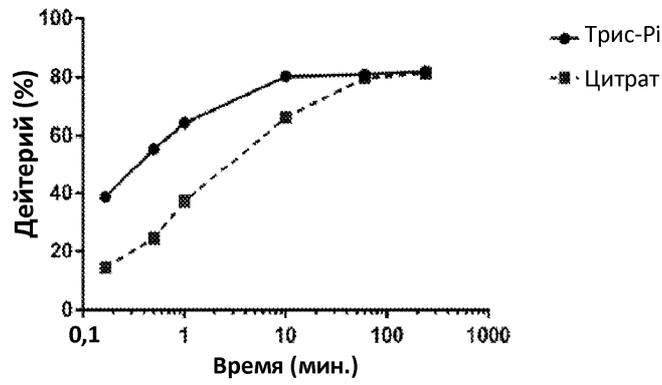


108-112



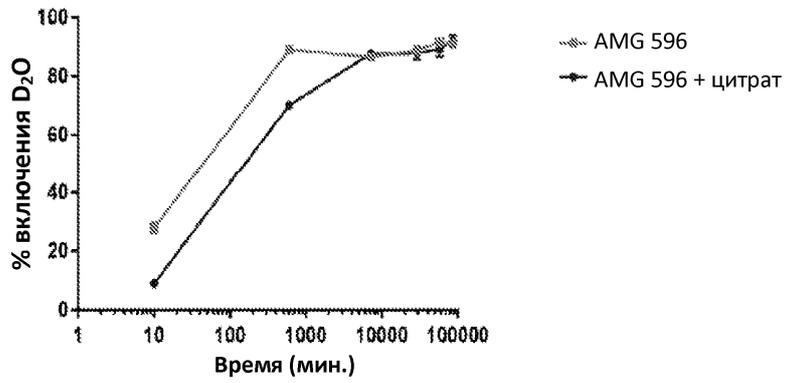
Фиг. 6B

364-368



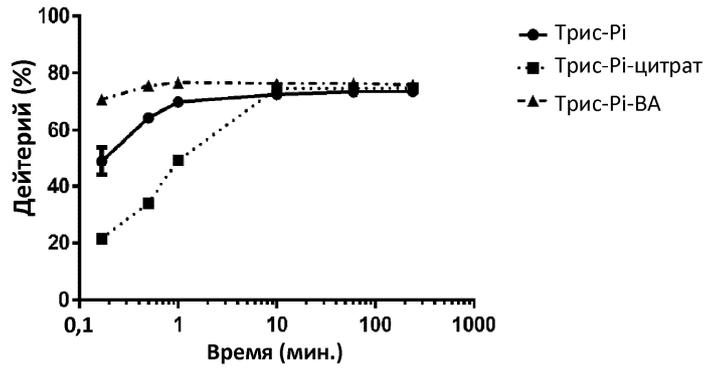
Фиг. 6C

365-369 (+1)



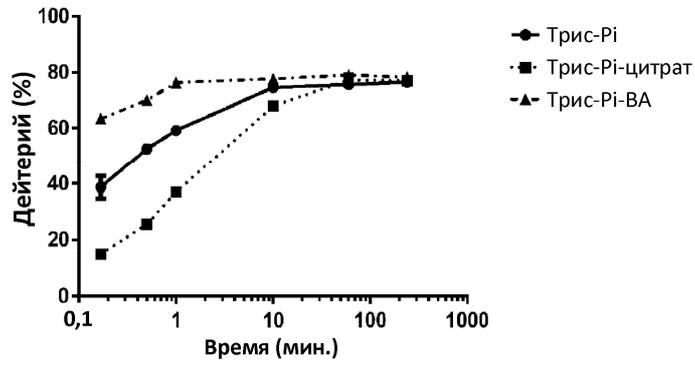
Фиг. 6D

366-369



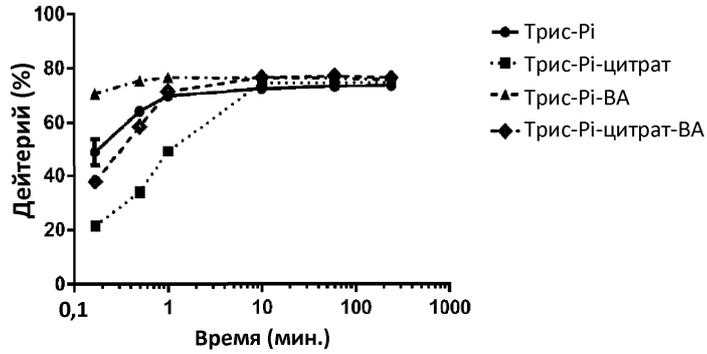
Фиг. 6Е

366-370



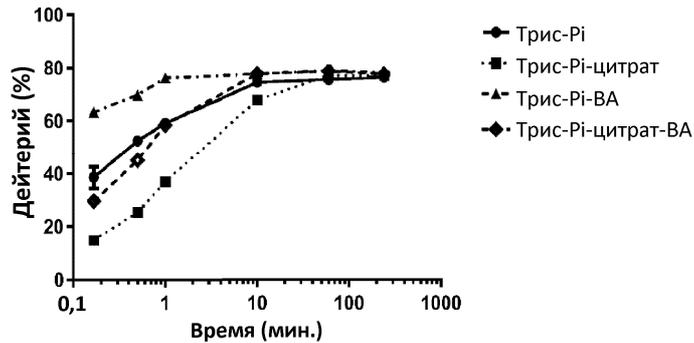
Фиг. 6F

366-369

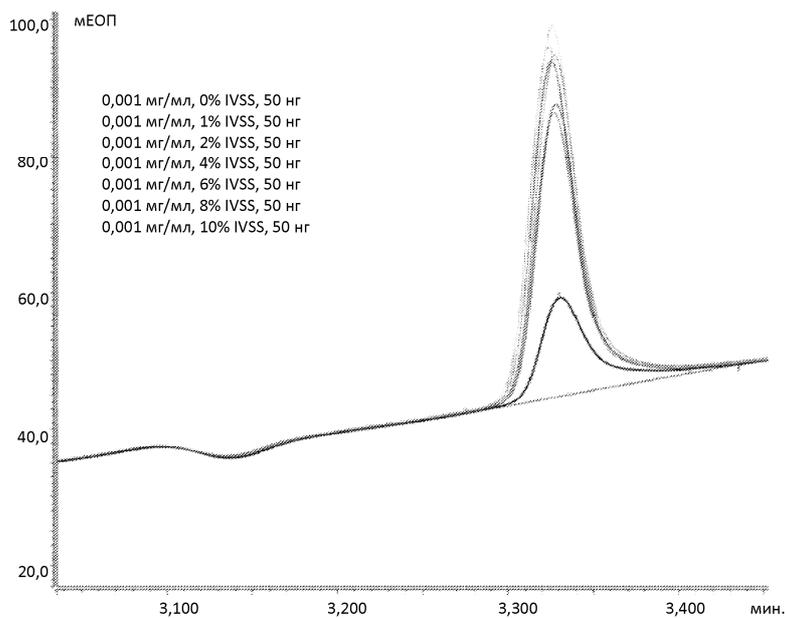


Фиг. 6G

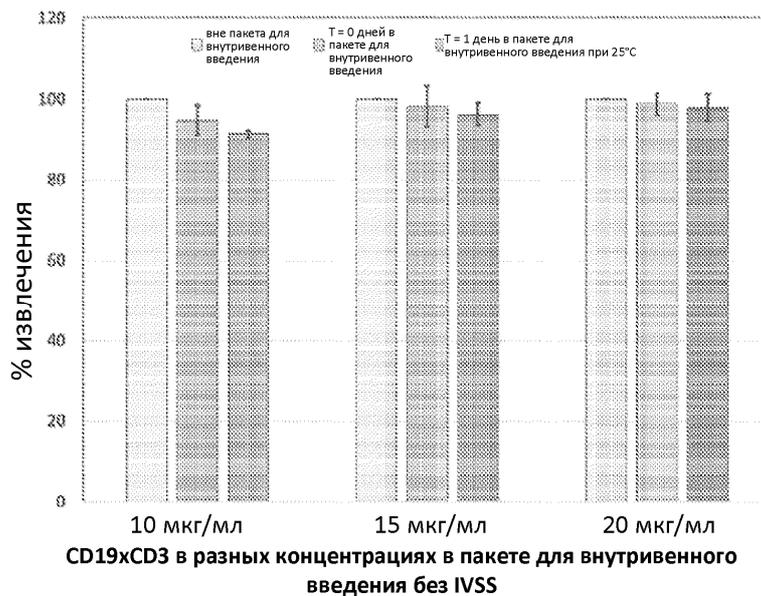
366-370



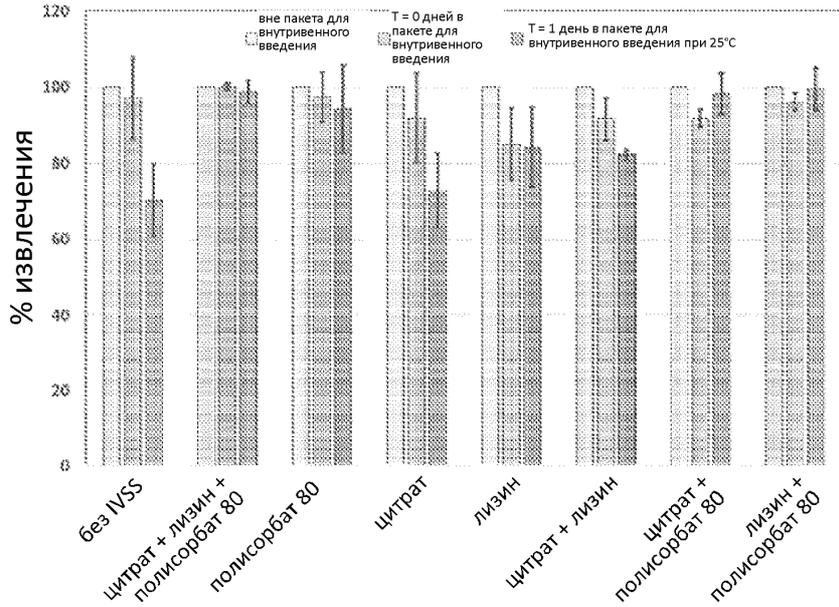
Фиг. 6H



Фиг. 7

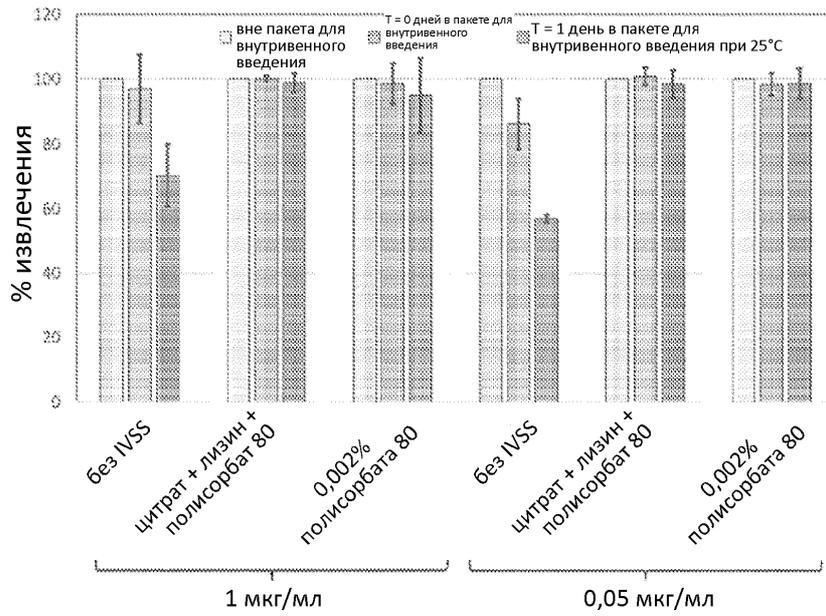


Фиг. 8А



1 мкг/мл CD19xCD3 в разных концентрациях с индивидуальными или комбинированными вспомогательными веществами IVSS

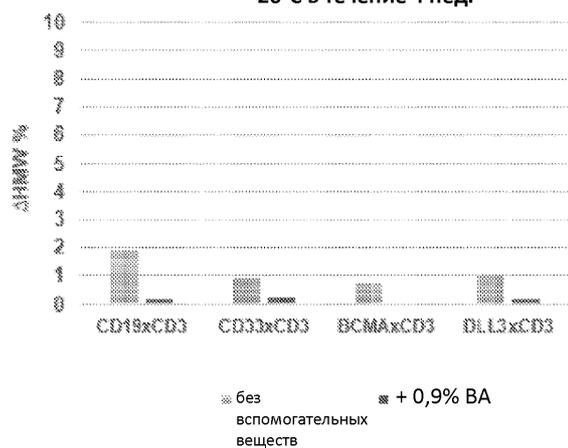
Фиг. 8B



CD19xCD3 в двух разных концентрациях с IVSS и без него

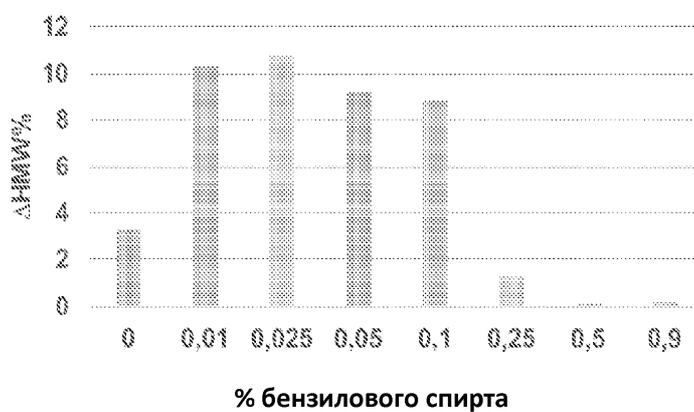
Фиг. 8C

Стабильность при концентрации 1 мг/мл в составе G42SuT при
-20°C в течение 4 нед.



Фиг. 9

5 мг/мл DLL3xCD3 в составе G42SuT, -20°C, 4 нед.



Фиг. 10

