

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **023674**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2016.06.30**

(21) Номер заявки  
**201290568**

(22) Дата подачи заявки  
**2010.12.29**

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

(54) **ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **61/290,840; 61/365,266; 61/366,743**

(32) **2009.12.29; 2010.07.16; 2010.07.22**

(33) **US**

(43) **2013.02.28**

(86) **PCT/US2010/062436**

(87) **WO 2011/090762 2011.07.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭМЕРДЖЕНТ ПРОДАКТ  
ДИВЕЛОПМЕНТ СИЭТЛ, ЛЛС (US)**

(72) Изобретатель:  
**Блэнкеншип Джон В., Тэн Филип (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) **WO-A1-0202781  
US-B1-6809185  
US-A1-2007014794  
WO-A2-2009023386  
WO-A2-2007146968  
WO-A1-2009080251  
WO-A2-2007048037  
WO-A1-2009080254  
WO-A1-2005017148  
WO-A1-2010034441  
WO-A1-2010136172  
WO-A1-2010040508  
WO-A2-2010042904  
WO-A1-2010014629**

(57) Изобретение относится к полипептидным гетеродимерам, образованным из двух различных одноцепочечных полипептидов слияния в результате естественной гетеродимеризации участка СН1 иммуноглобулина и константного участка легкой цепи иммуноглобулина (CL). Полипептидный гетеродимер включает два или более доменов связывания, которые специфически связывают одну или более мишеней (например, рецептор). Кроме того, обе цепи гетеродимера дополнительно включают фрагмент участка Fc. Данное изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, векторам, клеткам-хозяевам и способам получения полипептидных гетеродимеров, а также способам применения таких полипептидных гетеродимеров, например, для обеспечения направленной активации Т-клеток, ингибирования роста солидной злокачественной опухоли и лечения аутоиммунных или воспалительных состояний.

**B1****023674****023674****B1**

### Перекрестная ссылка(-и) на родственную заявку(-и)

Данная заявка испрашивает приоритет согласно статье 35 Кодекса США § 119(e) временной заявки на патент США No. 61/290840 от 29 декабря 2009 г. и временной заявки на патент США No. 61/365266 от 16 июля 2010, каждая из которых включена в данный документ во всей своей полноте посредством ссылки.

### Заявление о перечне последовательностей

Перечень последовательностей, связанный с данной заявкой, представлен в текстовом формате в виде бумажной копии и включен в текст данной заявки в виде ссылки. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, следующее: 910180\_422PC\_SEQUENCE\_LISTING.txt. Текстовый файл имеет размер 839 кБ, был создан 29 декабря 2010 г. и предоставлен в электронном виде посредством EFS-Web, соответствуя тексту данной заявки.

### Уровень техники

Область техники.

Данное изобретение описывает полипептидные гетеродимеры, содержащие их композиции и способы получения и использования таких полипептидных гетеродимеров. Более конкретно, описанные здесь полипептидные гетеродимеры образованы, частично, путем естественной гетеродимеризации между участком иммуноглобулина СН1 и константным участком легкой цепи иммуноглобулина (CL). Кроме того, описанные здесь полипептидные гетеродимеры включают два или более связывающих домена, которые связываются специфическим образом с одним или несколькими мишенями. Более того, одноцепочечные полипептиды полипептидных гетеродимеров, описанных в тексте данной заявки, включают часть участка Fc (например, домены СН2 и СН3 иммуноглобулина).

Описание аналогов.

Процесс передачи сигнала часто включает белки-рецепторы, которые имеют внеклеточные домены, трансмембранные домены и внутриклеточные домены. Во время связывания лиганда молекулы рецептора клеточной поверхности часто олигомеризуются или мультимеризуются (также указывается как образование "перекрестной связи") для эффективной передачи сигнала внутриклеточному компартменту клетки. Стимуляция или блокада такого взаимодействия между рецептором и лигандом или последующая олигомеризация или мультимеризация рецептора имеет важное терапевтическое влияние на целый ряд заболеваний.

Типичные молекулы, используемые в модуляции взаимодействия рецептора и лиганда, включают антитела или молекулы, полученные из антител. Например, антитело или его производное может функционировать в качестве антагониста рецептора, который связывается с рецептором клеточной поверхности и инактивирует его путем блокирования сайта связывания активирующего лиганда или предотвращения димеризации или мультимеризации рецептора, необходимых для активации. В других определенных случаях антитело или его производное может функционировать в качестве агониста путем связывания и образования перекрестных связей с множеством мембранных рецепторов, имитируя функцию естественного лиганда. Другой пример представлен производным биспецифического антитела, которое может использоваться для направления цитотоксических агентов или иммунных эффекторных клеток к сайтам мишеней, таких как опухоли.

Биспецифические антитела представлены молекулами на основе антитела, которые могут одновременно связываться с двумя отдельными и различными антигенами (или разными антигенными детерминантами одного и того же антигена). Один из способов применения биспецифических антител состоял в перенаправлении цитотоксических иммунных эффекторных клеток для повышения гибели опухолевых клеток путем антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). В этом контексте одна часть биспецифического антитела связывается с антигеном на опухолевой клетке, и другая часть связывается с детерминантой, экспрессируемой на эффекторных клетках. Путем образования перекрестной связи с опухолевыми и эффекторными связями биспецифическое антитело не только образует непосредственную близость между эффекторными клетками и опухолевыми клетками, но также одновременно запускает их активацию, приводя к эффективной гибели опухолевых клеток. Биспецифические антитела также использовали для обогащения химио- или радиотерапевтических агентов в опухолевых тканях для сведения к минимуму губительных эффектов в здоровой ткани. В данном случае один участок биспецифического антитела связывается с антигеном, экспрессируемым на клетке-мишени, намеченной для разрушения, и другая часть несет химиотерапевтический препарат, радиоизотоп или токсин.

Основное препятствие в общей разработке биспецифических антител состояло в трудности получения материалов достаточного качества и количества для доклинических и клинических исследований. Изначально основной путь получения биспецифических антител состоял в коэкспрессии обеих легких цепей и обеих тяжелых цепей двух исходных антител с различной специфичностью в одной клетке. Однако требуемые биспецифические антитела с необходимой специфичностью связывания получают в небольшом количестве, и очистка от других продуктов очень затруднена. Другой традиционный способ получения биспецифического антитела представлен химической конъюгацией двух антител или их фрагментов, имеющих различную специфичность. Однако этот способ также осложнен, и процесс химической модификации может инактивировать антитело или способствовать агрегации. Принимая во внимание, что очистка от нежелательных продуктов остается затруднительной, получаемый низкий выход и

плохое качество биспецифического антитела делают данный процесс неподходящим для широкомаштабного производства, необходимого для клинической разработки.

До недавнего времени для улучшения производства биспецифических антител использовали различные способы гетеродимеризации. Однако слияние простых доменов гетеродимеризации, таких как биспиральных Jun/Fos с доменами scFv, приводит к образованию смеси гомо- и гетеродимеров и требует раскручивания (de Kruif and Logtenberg, J. Biol. Chem. 271: 7630-4, 1996). Слияние фрагментов scFv с целыми антителами также использовали в качестве способа димеризации (Coloma and Morrison, Nat. Biotechnol. 15:159-63, 1997). Однако такое слияние приводило к образованию большой молекулы с плохими способностями проникновения в солидную ткань. Слияние двух фрагментов scFv использовали для получения биспецифических белков (например, антитела BITE®, полученные Micromet Inc., Bethesda, MD, патент США No. 7635472). Однако такие белки не содержат участки Fc, и, следовательно, невозможно манипулировать их активностью посредством участков Fc. Кроме того, такие белки небольшие (~55 кДа) и имеют относительно короткое время полужизни в сыворотке.

На сегодняшний день способ слияния иммуноглобулинов не предоставил коммерчески подходящих гетеродимерных белков или способов для их получения. Таким образом, в науке сохраняется потребность в альтернативных мультиспецифических гетеродимерных белках, а также эффективных способах их получения.

### Сущность изобретения

Данное изобретение описывает полипептидные гетеродимеры, образованные между двумя различными одноцепочечными полипептидами посредством естественной гетеродимеризации участка CH1 иммуноглобулина и константного участка легкой цепи иммуноглобулина (CL). Данное изобретение также описывает нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы получения полипептидных гетеродимеров, а также способы использования таких полипептидных гетеродимеров, таких как направленная активация Т-клеток, ингибирование роста солидной злокачественной опухоли, лечение аутоиммунных или воспалительных состояний или лечение нарушений или заболеваний, ассоциированных с В-клетками.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к полипептидному гетеродимеру, включающему (а) первый одноцепочечный полипептид (SCP-I), включающий от одного до четырех связывающих доменов, которые специфически связывают от одной до четырех мишеней, шарнирный участок (H-I), домен гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-I) и фрагмент участка Fc (FRP-I); и (б) первый одноцепочечный полипептид (SCP-II), включающий от нуля до четырех связывающих доменов, которые специфически связывают от нуля до четырех мишеней, шарнирный участок (H-II), домен гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-II) и фрагмент участка Fc (FRP-II); при этом (i) иммуноглобулин HD-I и иммуноглобулин HD-II преимущественно связываются друг с другом для образования полипептидного гетеродимера, включающего SCP-I и SCP-II, и (1) домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок иммуноглобулина CH1, и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок CL иммуноглобулина, или (2) домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок CL иммуноглобулина, и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок иммуноглобулина CH1; и (ii) фрагмент участка Fc SCP-I и фрагмент участка Fc SCP-II включают домены CH2 и CH3 иммуноглобулинов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, или любую их комбинацию; один или два домена CH3 иммуноглобулинов IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM или любую их комбинацию; или домены CH3 и CH4 иммуноглобулинов IgE, IgM, или любую их комбинацию, при условии, что полипептидный гетеродимер включает по меньшей мере два связывающих домена, которые специфически связываются с мишенью, например по меньшей мере двумя различными мишенями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающие домены полипептидных гетеродимеров представлены одноцепочечными полипептидами Fv (scFv).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает два связывающих домена (BD1 и BD2). В одном варианте осуществления изобретения два связывающих домена (BD1 и BD2) находятся на первом одноцепочечном полипептиде (SCP-I), при этом HD-I и FRP-I расположены между BD1 и BD2. В другом варианте осуществления изобретения первый связывающий домен (BD1) расположен на первом одноцепочечном полипептиде (SCP-I), и второй связывающий домен (BD2) представлен на втором одноцепочечном полипептиде (SCP-II). Например, первый связывающий домен (BD1) может быть расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc первого одноцепочечного полипептида (FRP-I), и второй связывающий домен (BD2) может быть расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II). В альтернативном варианте первый связывающий домен (BD1) может быть расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc первого одноцепочечного полипептида (FRP-I), и второй связывающий домен (BD2) может быть расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II). Еще с другой стороны, первый связывающий домен (BD1) может быть расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc первого од-

ноцепочечного полипептида (FRP-I), и второй связывающий домен (BD2) может быть расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает три связывающих домена (BD1, BD2 и BD3). В одном варианте осуществления изобретения HD-I и FRP-I расположены между BD1 и BD2, и третий связывающий домен (BD3) расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II). В альтернативном варианте осуществления изобретения HD-I и FRP-I расположены между BD1 и BD2, и третий связывающий домен (BD3) расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает четыре связывающих домена (BD1, BD2, BD3 и BD4). Например, HD-I и FRP-I могут быть расположены между BD1 и BD2, и HD-II и FRP-II могут быть расположены между BD3 и BD4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает от пяти до восьми связывающих доменов (например, 5, 6, 7 или 8 связывающих доменов).

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один связывающий домен полипептидных гетеродимеров, описанных в тексте данной заявки, специфически связывает или является антагонистом TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD28, CD79b, гиперИЛ-6, моноИЛ-10, CD86, CD20, PSMA, CD19, HLA-DR, Ron, c-Met, CEACAM-6, LIGHT, GITRL, CD40, PDL1, PDL2, HVEM, LTBR, EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, IGF1R, EphA2, PDGFR, VEGFR1-4, ангиопоэтина 2, CD64, CD32A, CD16, CD71, TNFR1, TNFR2, TWEAKR, TACI, BAFF-R, BCMA, FAS, CD32B, CD21, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD70, ФНО $\alpha$ , ИЛ-6, гиперИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-1, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-17A/C, IP-10, ИФН $\gamma$ , ИФН $\alpha$ , RANKL, FASL, ТФр $\beta$ , ИЛ-10, ИЛ-17A/F, CSF2, IGF1, IGF2, BLyS/APRIL, ГЦФР, MSP, ЭФР (включая эпирегулин, херпегулин,  $\beta$ -регулин, нейррегулин), HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, ФНО $\alpha$ , Wnt, sHH, ТФр $\beta$ , PDGF, TWEAK, EpCAM, CEA, PCTA-1, STEAP-1, PSCA, ALCAM (CD166), EphA2, CD151, CA-125, MUC-1, MAGE-1, TROP2, CCR5, HER-3, HER-4, EGFR, CEA, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5<sub>AC</sub>, MUC5<sub>b</sub>, MUC7,  $\beta$ ХГч, Lewis-Y, ганглиозид GD3, 9-O-Acetyl-GD3, GM2, Globo H, фукозил GM1, поли SA, GD2, карбоангидразы IX (MN/CAIX), CD44v6, Sonic Hedgehog (Shh), Wue-1, плазмочеточного антигена, (связанный с мембраной) IgE, протеогликана хондроитинсульфата меланомы (MCSP), CCR8, предшественника ФНО-альфа, STEAP, мезотелина, антигена A33, антигена стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6; десмоглеина 4, неопитопа Е-кадхерина, рецептора ацетилхолина плода, CD25, маркера CA19-9, маркера CA-125 и рецептора мюллерова ингибирующего вещества (MIS) тип II, sTn (сиалированный антиген Tn; TAG-72), FAP (антиген активации фибробластов), эндосиалина, EGFRvIII, LG, SAS, CD63, IGF1R, CD151, TGFR2, GHRHR, GHR, ИЛ-6R, gp130, TNFR2, OSMR $\beta$ , Patched-1, Frizzled, Robo1, CD80, CD81, CD86, OX40, CD40, CD137, LIFR, TLR7 или TLR9.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один связывающий домен полипептидных гетеродимеров представлен агонистом ИЛ-10, HLA-G, ГЦФР, ИЛ-35, PD-1, BTLA, TNFR1, TNFR2, DR4, DR5, TWEAKR или FAS.

В некоторых описанных здесь полипептидных гетеродимерах по меньшей мере один связывающий домен специфически связывается с комплексом TCR или его компонентом, и по меньшей мере другой связывающий домен специфически связывается с PSMA, CD79b, CD19, HLA-DR, CD20, RON, c-Met или CEACAM-6.

В других некоторых описанных здесь полипептидных гетеродимерах по меньшей мере один связывающий домен специфически связывается с CD28, и по меньшей мере другой связывающий домен специфически связывается с или является антагонистом CD79b, гиперИЛ-6, PDL2, моноИЛ-10, CD86, LIGHT, GITRL, CD40, PDL1, HVEM или LTBR.

В других некоторых описанных здесь полипептидных гетеродимерах по меньшей мере один связывающий домен специфически связывается с CD28, и по меньшей мере другой связывающий домен является агонистом ИЛ-10, HLA-G, ГЦФР, ИЛ-35, PD-1 или BTLA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок иммуноглобулина CH1, и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок CL иммуноглобулина. В одном варианте осуществления изобретения первый участок CH1 расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc первого одноцепочечного полипептида, и первый участок CL расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида. В другом варианте осуществления изобретения первый участок CH1 расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc первого одноцепочечного полипептида, и первый участок CL расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок иммуноглобулина



липептида, и первый участок СН1 расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида В еще одном варианте осуществления изобретения первый одноцепочечный полипептид дополнительно включает второй участок CL и второй одноцепочечный полипептид дополнительно включает второй участок СН1, и второй участок CL первого одноцепочечного полипептида и второй участок СН1 второго одноцепочечного полипептида связаны друг с другом в полипептидном гетеродимере. Например, фрагмент участка Fc первого одноцепочечного полипептида может быть расположен между первым и вторым участками CL, и второй фрагмент участка Fc второго одноцепочечного полипептида может быть расположен между первым и вторым участками СН1. В альтернативном варианте оба, первый и второй участки CL, могут быть расположены ближе к амино-концу относительно фрагмента участка Fc первого одноцепочечного полипептида, и первый и второй участки СН1 могут быть расположены ближе к амино-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида. Еще с другой стороны, оба, первый и второй участки CL, могут быть расположены ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc первого одноцепочечного полипептида, и первый и второй участки СН1 могут быть расположены ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc второго одноцепочечного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый участок CL представлен участком Ск. В других вариантах осуществления изобретения первый участок CL представлен участком Сл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения второй участок CL представлен участком Ск. В других вариантах осуществления изобретения второй участок CL представлен участком Сл.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Ск представлен участком Ск иммуноглобулина человека дикого типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Ск представлен измененным участком Ск иммуноглобулина человека с одной или более заменами аминокислот в участке Ск человека дикого типа в положениях N29, N30, Q52, V55, T56, T56, S68 или T70. Например, замена одной или более аминокислот могут быть выбраны из Ала (А), Арг (R), Трп (W), Тир (Y), Глу (E), Глн (Q), Лиз (K), Асп (D), Мет (M), Сер (S) и Фен (F).

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок СН1 представлен измененным участком СН1 иммуноглобулина человека, включающим замену аминокислот, в результате которой Вал (V) в положении 68 заменен на Лиз (K), Арг (R) или Гис (H), и при этом участок Ск представлен измененным участком Ск иммуноглобулина человека, включающим аминокислотную замену, в результате которой Лей (L) в положении 27 заменен Асп (D) или Глу (E). В других некоторых вариантах осуществления изобретения участок СН1 представлен измененным участком СН1 иммуноглобулина человека, включающего аминокислотную замену, в результате которой Вал (V) в положении 68 заменен на Асп (D) или Глу (E), и при этом участок Ск представлен измененным участком Ск иммуноглобулина человека, включающим аминокислотную замену, в результате которой Лей (L) в положении 27 заменен Лиз (K), Арг (R) или Гис (H).

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Сл представлен участком Сл иммуноглобулина человека дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый участок СН1 или второй участок СН1, если присутствует, представлен участком СН1 иммуноглобулина человека дикого типа, таким как участок СН1 IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый участок СН1 или второй участок СН1, если присутствует, такой как измененный участок СН1 IgG1 человека, в котором цистеин участка СН1 иммуноглобулина человека дикого типа, который участвует в образовании дисульфидной связи с участком CL иммуноглобулина дикого типа удален или заменен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Ск представлен измененным участком Ск иммуноглобулина человека, таким как участок Ск иммуноглобулина человека дикого типа, в котором остаток цистеина, который участвует в образовании дисульфидной связи участком СН1 иммуноглобулина человека дикого типа, удален или заменен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Сл представлен измененным участком Сл иммуноглобулина человека, таким как участок Сл иммуноглобулина человека дикого типа, в котором остаток цистеина, который участвует в образовании дисульфидной связи с участком СН1 иммуноглобулина человека дикого типа, удален или заменен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый участок СН1 и второй участок СН1, если присутствует, представлен полипептидом, включающим SEQ ID NO:114, 844 или 845.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Ск, если присутствует, выбран из любого из полипептидов, включающих SEQ ID NO:141-178, 202 и 838-843.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Сл, если присутствует, представляет собой полипептид, включающий SEQ ID NO: 140.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc первого одноцепочечного полипептида (FRP-I) и фрагмент участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II) каждый

включает домен CH2 иммуноглобулина, такой как домен CH2 IgG1, или домен CH2 IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc первого одноцепочечного полипептида (FRP-I) и фрагмент участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II) каждый включает домен CH3 иммуноглобулина, такой как домен CH3 IgG1, или домен CH2 IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc первого одноцепочечного полипептида (FRP-I) и фрагмент участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II) каждый включает домен CH2 иммуноглобулина и домен CH3 иммуноглобулина, такие как домены CH2 и CH3 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc включает домен CH3 иммуноглобулина, который расположен в направлении amino-конца непосредственно за доменом гетеродимеризации иммуноглобулина (например, доменом CH1 или доменом Ск), домен CH3 иммуноглобулина связан с доменом CH1, непосредственно в направлении карбокси-конца относительно CH3 иммуноглобулина в один одноцепочечный полипептид посредством пептида, включающего SEQ ID NO:846, 847, 848 или 849; и домен CH3 иммуноглобулина связан с доменом Ск непосредственно в направлении карбокси-конца относительно домена CH3 иммуноглобулина в другом одноцепочечном полипептиде посредством пептида, включающего SEQ ID NO:846, 850, 951 или 852.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc первого одноцепочечного полипептида (FRP-I) и фрагмент участка Fc второго одноцепочечного полипептида (FRP-II) включают домены CH3 и CH4 IgM или IgE.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых фрагмент участка Fc включает домен иммуноглобулина CH2, домен CH2 может быть представлен измененным доменом CH2 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. Типичный измененный домен CH2 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека включает домены, которые включают (а) замену аминокислоты в положении 297 и по меньшей мере одну дополнительную замену или делецию в положениях 234-238; (б) мутации одной или более аминокислот в положениях 234-238 и по меньшей мере одну замену в положении 253, 310, 318, 320, 322 или 331; или (в) замену аминокислоты аспарагин в положении 297, одну или более замен или делеций в положениях 234-238, и по меньшей мере одну или несколько замен в положениях 253, 310, 318, 320, 322 или 331. Другой типичный домен CH2 представлен измененным доменом CH2 IgG1 человека, который включает замены аминокислот в положениях L234, L235, G237, E318, K320 и K322.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 первого одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает T366W, и домен CH3 второго одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену Y407A. В других некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 первого одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366Y, и домен CH3 второго одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену Y407T. В других некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 первого одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366W, и домен CH3 второго одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366S, L368A и Y407V. В других некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 первого одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену Y407A, и домен CH3 второго одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366W. В других некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 первого одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену Y407T, и домен CH3 второго одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366Y. В других некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 первого одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366S, L368A и Y407W, и домен CH3 второго одноцепочечного полипептида представлен измененным доменом CH3 IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека, который включает замену T366W.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирные участки и первого, и второго одноцепочечных полипептидов представлены шарнирным участком иммуноглобулина, таким как шарнирный участок IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD или IgE. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок иммуноглобулина представлен шарнирным участком иммуноглобулина дикого типа В других некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок иммуноглобулина представлен измененным шарнирным участком иммуноглобулина, выбранным из SEQ ID NO:232, 234, 240, 664-673, 675 и 676.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок (а) находится ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc, (б) располагается между связывающим доменом и доменом гетеродимеризации иммуноглобулина, (в) расположен между доменом гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагментом участка Fc, (г) располагается на аминоконце первого или второго одноцепочечного полипептида, (д) располагается между фрагментом участка Fc и связывающим доменом, или (е) располагается на карбоксильном конце первого или второго одноцепочечного полипептида.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один шарнирный участок первого и второго одноцепочечного полипептида представлен шарнирным участком лектина С-типа, таким как пептид NKg2A или NKg2D, или его производным.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирные участки первого и второго одноцепочечных полипептидов идентичны. В других некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирные участки первого и второго одноцепочечных полипептидов различаются.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый одноцепочечный полипептид включает связывающий домен, который специфически связывает комплекс TCR или его компонент, и второй одноцепочечный полипептид включает связывающий домен, который специфически связывается с CD19, CD79b, HLA-DR или CD20.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый одноцепочечный полипептид включает связывающий домен, который специфически связывает CD28, и второй одноцепочечный полипептид включает связывающий домен, который (а) специфически связывается с CD79b, гиперИЛ-6 или CD86, или (б) включает эктодомен PDL или моноИЛ-10.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый одноцепочечный полипептид включает связывающий домен, который специфически связывает с-Met, и второй одноцепочечный полипептид включает связывающий домен, который специфически связывается с RON.

В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй одноцепочечный полипептиды включают SEQ ID NO: 2 и 4, SEQ ID NO: 6 и 8, SEQ ID NO: 10 и 12, SEQ ID NO: 14 и 16, SEQ ID NO: 18 и 20, SEQ ID NO: 20 и 22, SEQ ID NO: 20 и 24, SEQ ID NO: 30 и 32, SEQ ID NO: 29 и 31, SEQ ID NO: 29 и 32, SEQ ID NO: 30 и 72, SEQ ID NO: 53 и 72, SEQ ID NO: 54 и 72, SEQ ID NO: 55 и 72, SEQ ID NO: 70 и 72, SEQ ID NO: 71 и 72, SEQ ID NO: 63 и 56, SEQ ID NO: 64 и 57, SEQ ID NO: 65 и 60, SEQ ID NO: 66 и 58, SEQ ID NO: 67 и 59, SEQ ID NO: 68 и 61, SEQ ID NO: 69 и 62, SEQ ID NO: 54 и 811, SEQ ID NO: 54 и 812, SEQ ID NO: 54 и 813, SEQ ID NO: 814 и 818, SEQ ID NO: 815 и 818, SEQ ID NO: 816 и 818, SEQ ID NO: 817 и 818, SEQ ID NO: 814 и 820, SEQ ID NO: 814 и 821, SEQ ID NO: 54 и 819, SEQ ID NO: 814 и 826, SEQ ID NO: 814 и 822, SEQ ID NO: 814 и 823, SEQ ID NO: 814 и 824, SEQ ID NO: 859 и 862, SEQ ID NO: 860 и 863, SEQ ID NO: 861 и 864, SEQ ID NO: 874 и 825, SEQ ID NO: 875 и 879, SEQ ID NO: 876 и 880, SEQ ID NO: 877 и 881 или SEQ ID NO: 878 и 882.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, включающую описанный здесь полипептидный гетеродимер и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В другом аспекте данное изобретение относится к вектору экспрессии, способному экспрессировать описанный здесь полипептидный гетеродимер, включающий первый полинуклеотид, кодирующий первый одноцепочечный полипептид, и второй полинуклеотид, кодирующий второй одноцепочечный полипептид.

В другом аспекте данное изобретение относится к клетке-хозяину, включающую указанный выше вектор экспрессии.

В другом аспекте данное изобретение описывает клетку-хозяина, включающую первый и второй векторы экспрессии, способные экспрессировать первый и второй одноцепочечные полипептиды, соответственно, описанного здесь полипептидного гетеродимера.

В другом аспекте данное изобретение описывает способ получения полипептидного гетеродимера, включающий (а) культивирование описанной здесь клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии первого и второго одноцепочечных полипептидов, и (б) в некоторых случаях, выделение или очистку гетеродимеров, образованных из первого и второго одноцепочечного полипептида из культуры.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу направленной активации Т-клеток, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера, который включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или их комбинацию, и второй связывающий домен, который специфически связывает другие мишени, например опухолеспецифический антиген или другой выбранный антиген, указанном сайте или клетке, в которых необходимо произвести активацию Т-клеток.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования роста, метастазов или метастатического роста злокачественной опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера, который включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , с-Met, RON или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ дополнительно включает введение нуждающемуся пациенту химиотерапевтического агента или ионизирующего облучения.



В другом аспекте данное изобретение описывает способ лечения аутоиммунного или воспалительного состояния, включающий введение нуждающемуся пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера, который включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или CD28.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения ассоциированного с В-клетками нарушения или заболевания, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера, который включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  или CD3 $\epsilon$ , и второй связывающий домен, который специфически связывает CD19, CD20, CD79b или HLA-DR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь способы применения полипептидных гетеродимеров могут дополнительно включать введение нуждающемуся в этом пациенту второго активного агента, такого как второй полипептидный гетеродимер, моноклональное антитело или белок слияния, полученный из иммуноглобулина.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 представлена схема двухвалентного анти-CD28 полипептидного гетеродимера X0172 (слева) и анализа SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) X0172 (справа); "NR" обозначает "невосстановленный", и "Red" обозначает "восстановленный";

на фиг. 2 показано, что одновалентное (X0124) и двухвалентное (X0172) анти-CD28 полипептиды действуют синергистически с субоптимальной концентрацией PMA в стимуляции очищенных Т-клеток человека при сравнении с scFv антителом к CD28 (2E12 scFv), но в меньшей степени, чем двухвалентный анти-CD28 белок SMIP (2E12 SMIP);

на фиг. 3 показано, что двухвалентный полипептидный гетеродимер X0172 связывается с CD4<sup>+</sup> Т-клетками лучше, чем 2E12 scFv и одновалентный полипептидный гетеродимер X0124;

на фиг. 4 представлена катионообменная хроматография полипептидных гетеродимеров X0251, X0252 и X0253 (слева) и анализ SDS-PAGE этих же полипептидных гетеродимеров в невосстанавливающих (NR) и восстанавливающих (Red) условиях (справа);

на фиг. 5 представлены масс-спектры полипептидного гетеродимера X0252, который указывает на доминирование гетеродимера;

на фиг. 6 представлен электрофоретический анализ SDS-PAGE полипептидных гетеродимеров X0283 и X0284 в невосстанавливающих (NR) и восстанавливающих (Red) условиях (слева) и катионообменный хроматографический анализ полипептидного гетеродимера X0283;

на фиг. 7 представлено прямое связывание с CD86 полипептидного гетеродимера X0283, как это определено путем анализа BIACORE®, с единицами ответа (Ru), нанесенными относительно времени (слева), и схематическое представление X0283;

на фиг. 8A и 8B представлено связывание биспецифических конструкций к RON и CD3 (полипептидный гетеродимер S0268 и белок скорпиона S0266) к клеткам MDA-MB-453 (A) и изолированным Т-клеткам (B);

на фиг. 9A и 9B представлена специфичность связывания с (A) клетками Rec1 (CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>) или (B) клетками Jurkat (CD3<sup>+</sup>) для биспецифических гетеродимеров, включающих домены связывания с CD19 и CD3 (TSC020) или домены связывания с CD20 и CD3 (TSC021);

на фиг. 10A-10D показана пролиферация CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в ответ на биспецифические полипептидные гетеродимеры TSC054, TSC078, TSC079, и bsc19 $\times$ 3 (TSC036) с (A и B) клетки Дауди (CD19<sup>+</sup>) или (C и D) клетки MDA-MB-453 (CD19<sup>+</sup>);

на фиг. 11A и 11B представлена направленная цитотоксичность Т-клеток, индуцируемая биспецифическими полипептидными гетеродимерами TSC054, TSC078, TSC079 и S0268 в ходе анализа высвобождения хрома (<sup>51</sup>Cr) с использованием (A) клеток Дауди (RON<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>) или (B) клеток BxPC-3 (RON<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>);

на фиг. 12 представлена мишень-зависимая пролиферация Т-клеток, индуцируемая CO19<sup>+</sup>линией клеток (Дауди) с использованием биспецифических полипептидных гетеродимеров TSC165, TSC166, TSC167, TSC168 и TSC100 в концентрациях от 0,1 до 10000 пМ;

на фиг. 13 представлена мишень-зависимая пролиферация Т-клеток, индуцируемая CD19<sup>+</sup>линией клеток (Дауди) с использованием биспецифических полипептидных гетеродимеров TSC127 и TS165 bsc19 $\times$ 3 BiTE в качестве контроля в концентрациях от 0,001 до 1000 пМ;

на фиг. 14 представлена мишень-зависимая перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность на линию клеток CD19<sup>+</sup> (Дауди) с использованием биспецифических полипептидных гетеродимеров TSC100, TSC165, TSC166, TSC167 и TSC168.

#### **Подробное описание изобретения**

Данное изобретение относится к полипептидным гетеродимерам, образованным из двух различных одноцепочечных полипептидов в результате естественной гетеродимеризации участка CH1 иммуноглобулина и константного участка легкой цепи иммуноглобулина (CL). Полипептидный гетеродимер имеет два или более доменов связывания, которые специфически связывают одну или более мишеней (например, ан-

тиген, рецептор или лиганд). Кроме того, обе цепи гетеродимера дополнительно включают фрагмент участка Fc (например, домены CH2 и/или CH3 иммуноглобулина). Данное изобретение описывает также нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы получения полипептидных гетеродимеров.

Описанный здесь способ гетеродимеризации имеет одно или более из следующих преимуществ: (1) возможность минимальной иммуногенности полипептидных гетеродимеров по причине того, что димеры образуются посредством природной гетеродимеризации участка CH1 иммуноглобулина и участка CL иммуноглобулина; (2) эффективная выработка и очистка полипептидных гетеродимеров по данному изобретению возможна путем ко-экспрессии двух различных одноцепочечных полипептидов, как это представлено в примерах; (3) способность опосредовать эффекторные функции Fc (например, КЗЦ, АЗКЦ, АЗКФ), которые могут быть модулированы в обе стороны мутагенезом, и более долгий период полужизни в сыворотке по причине того, что каждая цепь полипептидного гетеродимера по данному изобретению имеет фрагмент участка Fc (например, домены CH2 и CH3 иммуноглобулина); и (4) полипептидные гетеродимеры по данному изобретению имеют размер, который, как правило, меньше, чем молекула антитела, что обеспечивает лучшее проникновение в ткани, такие как ткани злокачественной опухоли.

Описанные здесь полипептидные гетеродимеры используют для направления терапевтических агентов или иммунных эффекторных клеток к клеткам-мишеням. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры могут включать связывающий домен, который специфически связывается с комплексом TCR или его компонентом (например, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$ ), и второй связывающий домен, который специфически связывается со второй мишенью, такой как онкологическая мишень (например, c-Met, RON, CEACAM-6 и PSMA) или мишень В-клетки (например, CD19, CD79b, HLA-DR и CD20). Связывающий домен, специфичный для второй мишени, может иметь большую аффинность относительно своей мишени, чем аффинность связывающего домена для комплекса TCR или его компонента, такого как CD3. Такие полипептидные гетеродимеры будут преимущественно связываться вначале с онкологической мишенью или мишенью В-клеткой, и впоследствии привлекать Т-клетки к опухоли или раковым клеткам, экспрессирующим онкологическую мишень или мишень В-клетку, и используют при ингибировании роста, метастазов или метастатического роста злокачественного новообразования (включая В-клеточные виды рака). Дополнительное применение описанных здесь полипептидных гетеродимеров включает направленную активацию Т-клеток и лечение аутоиммунных или воспалительных состояний.

Названия глав в тексте данной заявки представлены только в организационных целях и не должны рассматриваться в качестве ограничивающих объект изобретения. Все документы или части документов, процитированные в тексте данной заявки, включая, но не ограничиваясь, патенты, патентные заявки, статьи, книги и научные труды, включены в данный документ во всей своей полноте для любых целей посредством ссылки. В случае, если один или более включенных документов или частей документов определяют термин, который идет вразрез с определением термином, указанным в тексте данной заявки, правильным считается определение, данное в тексте данной заявки.

В тексте данной заявки считается, что любой диапазон концентраций, диапазон процентов, соотношение диапазонов или диапазон целых чисел включает значение любого целого числа в указанном диапазоне и, в случае необходимости, их доли (такие как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное. В контексте данного изобретения термин "примерно" обозначает  $\pm 20\%$  указанного диапазона, значения, последовательности или структуры, если не указано иное. Следует понимать, что в контексте данного изобретения термины единственного числа обозначают "один или несколько" перечисленных компонентов, если не указано иное или не понятно из контекста. Применение альтернативных указателей (например, "или") следует понимать как обозначение одного, обоих альтернативных значений, или любой их комбинации. В контексте данного изобретения термины "включают" и "содержат" используют синонимичным образом. Кроме того, следует понимать, что отдельные одноцепочечные полипептиды или гетеродимеры, полученные из различных комбинаций структур и заместителей (например, доменов, участков, шарнирных участков и линкеров), описанных в тексте данной заявки, представлены в данном изобретении в той же самой степени, что и каждый одноцепочечный полипептид или гетеродимер, который рассматривается отдельным образом. Таким образом, выбор отдельных компонентов для образования отдельных одноцепочечных полипептидов или гетеродимеров входит в объем данного изобретения.

В контексте данного изобретения белок "по существу, состоит из" нескольких доменов (например, связывающего домена, который специфически связывает мишень, каркасного участка, домена гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагмента участка Fc), если другие участки белка (например, аминокислоты на amino- или карбокси-конце или между двумя доменами), в комбинации, составляют, по большей мере, 20% (например, по большей мере, 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%) от длины белка, и не влияют, по существу (т.е. не снижают активность более чем на 50%, т.е. более чем на 40, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%), на активность различных доменов (например, аффинность связывания с мишенью связывающего домена, активность фрагмента участка Fc и способность домена гетеродимеризации иммуноглобулина облегчать гетеродимеризацию). В некоторых вариантах осуществления изобретения белок (например, одноцепочечный

чечный полипептид) состоит, по существу, из связывающего домена, который специфически связывает мишень, домен гетеродимеризации иммуноглобулина, шарнирный участок, и фрагмент участка Fc может включать соединяющие аминокислоты на amino- и/или карбоксильном конце белка и/или между двумя различными доменами (например, между связывающим доменом и доменом гетеродимеризации иммуноглобулина, между доменом гетеродимеризации иммуноглобулина и шарнирным участком и/или между шарнирным участком и фрагментом участка Fc).

В контексте данного изобретения термин "полипептидный гетеродимер" или "гетеродимер" обозначает димер, образованный двумя различными одноцепочечными полипептидами. Этот термин не включает антитело, образованное четырьмя одноцепочечными полипептидами (т.е. двумя легкими цепями и двумя тяжелыми цепями). Термин "димер" относится к биологическому веществу, которое состоит из двух субъединиц, объединенных одна с другой посредством одной или нескольких видов межмолекулярных связей (например, дисульфидных связей) и других взаимодействий (например, электростатических взаимодействий, солевых мостиков, водородных связей и гидрофобных взаимодействий), и является устойчивым при соответствующих условиях (например, при физиологических условиях, в водном растворе, подходящем для экспрессии, очистки и/или хранения рекомбинантных белков, или при условиях для денатурирующего и/или невосстанавливающего электрофореза).

Термин "одноцепочечный полипептид" обозначает одинарное, линейное и непрерывное присоединение аминокислот ковалентным образом. Он не включает две полипептидные цепи, которые связаны вместе нелинейным образом, таким как посредством дисульфидного мостика между цепями (например, половина молекулы иммуноглобулина, в который легкая цепь связана с тяжелой цепью дисульфидной связью). В некоторых вариантах осуществления изобретения одноцепочечный полипептид может иметь или образовывать одну или несколько дисульфидных связей внутри цепи.

В контексте данного изобретения термин "домен гетеродимеризации иммуноглобулина" обозначает домен иммуноглобулина одноцепочечного полипептида, который преимущественно взаимодействует или связывается с различными доменами иммуноглобулина другого одноцепочечного полипептида, при этом взаимодействие различных доменов гетеродимеризации по существу способствует или эффективно обеспечивает гетеродимеризацию первого и второго одноцепочечного полипептидов (т.е. образование димера между двумя разными одноцепочечными полипептидами, который также называют "гетеродимером"). Взаимодействие (я) между доменами гетеродимеризации "по существу, способствует или эффективно влияет" на гетеродимеризацию первого и второго одноцепочечного полипептидов, если существует статистически значимое снижение димеризации между первым и вторым одноцепочечным полипептидами в отсутствие домена гетеродимеризации первого одноцепочечного полипептида (HD-I) и/или домена гетеродимеризации второго одноцепочечного полипептида (HD-II). В некоторых вариантах осуществления изобретения, когда коэкспрессируются первый и второй одноцепочечные полипептиды по меньшей мере 60%, по меньшей мере от примерно 60 до примерно 70%, по меньшей мере от примерно 70% до примерно 80%, по меньшей мере от примерно 80 до примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% и по меньшей мере от примерно 90 до примерно 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% первого и второго одноцепочечного полипептидов образуют друг с другом гетеродимер. Репрезентативные домены гетеродимеризации иммуноглобулина по данному изобретению включают участок CH1 иммуноглобулина, участок CL иммуноглобулина (например, изотипы Ск или Сλ) или их производные, включая участки CH1 и CL иммуноглобулина дикого типа и измененные (или мутированные) участки CH1 и CL иммуноглобулина, как это описано в тексте данной заявки.

В контексте данного изобретения термин "связывающий домен" или "связывающий участок" обозначает белок, полипептид, олигопептид или пептид, обладающий способностью специфически распознавать и связывать мишень (например, CD3, TCR, CD28, c-Met, RON). Связывающий домен включает любой встречающийся в природе, синтетический, полусинтетический или полученный рекомбинантным способом связывающий партнер для биологической молекулы или другой интересующей мишени. Типичные связывающие домены включают переменные участки одноцепочечного антитела (например, домены антител, sFv, scFv, Fab), эктодомены рецептора (например, c-Met, RON) или лиганды (например, цитокины, хемокины). Известен целый ряд анализов для идентификации связывающих доменов по данному изобретению, которые специфически связывают отдельную мишень, включая вестерн-блоттинг, ИФА и анализ Viacore.

Связывающий домен и белок слияния "специфически связывают" мишень, если он связывает мишень с аффинностью или  $K_a$  (т.е. равновесной константой ассоциации отдельного связывающего взаимодействия с единицами 1/M), равной или превышающей  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , в то же самое время не связываясь по существу с другими компонентами, присутствующими в исследуемом образце. Связывающие домены (или их белки слияния) могут быть классифицированы как связывающие домены с "высокой аффинностью" (или их белки слияния) и связывающие домены с "низкой аффинностью" (или их белки слияния). Связывающие домены с "высокой аффинностью" относятся к связывающим доменам со значением  $K_a$  по меньшей мере  $10^7 \text{ M}^{-1}$  по меньшей мере  $10^8 \text{ M}^{-1}$  по меньшей мере  $10^9 \text{ M}^{-1}$  по меньшей мере  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  по меньшей мере  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  по меньшей мере  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ , или по меньшей мере,  $10^{13} \text{ M}^{-1}$ . Связывающие домены с "низкой аффинностью" относятся к связывающим доменам со значением  $K_a$ , достигающим до  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , до  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , до  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . В альтер-

нативном варианте аффинность может быть определена как равновесная константа диссоциации ( $K_d$ ) отдельного взаимодействия связывания с единицами М (например, от  $10^{-5}$  М до  $10^{-13}$  М). Аффинность связывающих доменов полипептидов и одноцепочечных полипептидов по данному изобретению может быть легко определена с использованием обычных способов (см., например, Scatchard et al. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660; и патенты США No. 5283173, 5468614 или эквивалентные).

"Т-клеточный рецептор" (TCR) представляет собой молекулу, находящуюся на поверхности Т-клеток, которая, вместе с CD3, обычно ответственна за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Он состоит из дисульфидно-присоединенного гетеродимера с высоковариабельными цепями  $\alpha$  и  $\beta$  в большинстве Т-клеток. В других Т-клетках альтернативный рецептор состоит из вариабельной  $\gamma$  и  $\delta$  экспрессируемых цепей. Каждая цепь TCR является членом суперсемейства иммуноглобулинов и несет один N-концевой вариабельный домен иммуноглобулина, один константный домен иммуноглобулина, трансмембранный участок и короткий цитоплазматический хвост на С-конце (см. Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology (5th Ed.), Editor: Saunders, Philadelphia, 2003; Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4<sup>th</sup> Ed., Current Biology Publications, pl48, 149, and 172, 1999). TCR, используемый в данном изобретении, может быть получен из разных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

"CD3" известен в науке как мультипротеиновый комплекс из шести цепей (см. Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p. 172 and 178, 1999). У млекопитающих комплекс включает цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$ , две цепи CD3 $\epsilon$  и гомодимер цепей CD3 $\zeta$ . Цепи CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$  представлены белками с высоким сродством к клеточной поверхности из суперсемейства иммуноглобулинов, содержащими один домен иммуноглобулина. Трансмембранные участки цепей CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$  имеют отрицательный заряд, который является характерным для таких цепей, обеспечивая взаимосвязь с положительно заряженными цепями рецептора Т-клеток. Внутриклеточные хвосты цепей CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$  содержат один сохраненный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM, в то время как каждая цепь CD3 $\zeta$  имеет три мотива. Считается, что ITAM играют важную роль в передаче сигнала комплексом TCR. CD3, используемый в данном изобретении, может быть получен из разных видов животных, включая человека, мышь, крысу или других млекопитающих.

В контексте данного изобретения термин "комплекс TCR" обозначает комплекс, образованный взаимосвязью CD3 с TCR. Например, комплекс TCR может состоять из цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$ , двух цепей CD3 $\epsilon$ , гомодимера из цепей CD3 $\zeta$ , цепи TCR $\alpha$  и цепи TCR $\beta$ . В альтернативном варианте комплекс TCR может состоять из цепи CD3 $\gamma$ , цепи CD3 $\delta$ , двух цепей CD3 $\epsilon$ , гомодимера из цепей CD3 $\zeta$ , цепи TCR $\gamma$  и цепи TCR $\delta$ .

В контексте данного изобретения термин "компонент комплекса TCR" обозначает цепь TCR (т.е. TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  или TCR $\delta$ ), цепь CD3 (т.е. CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или CD3 $\zeta$ ), или комплекс, образованный двумя или более цепями TCR или цепями CD3 (например, комплекс TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , комплекс TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , комплекс CD3 $\epsilon$  и CD3 $\delta$ , комплекс CD3 $\gamma$  и CD3 $\epsilon$ , или комплекс суб-TCR TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и двух цепей CD3 $\epsilon$ ).

Термины, понимаемые специалистом в области технологии антител, обозначают принятые в науке термины, если здесь четко не указано иное. Как известно, антитела имеют вариабельные участки, шарнирный участок и константные домены. Структура и функция иммуноглобулина описаны, например, в Harlow et al., Eds., Antibodies: A Laboratory Manual, Chapter 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1988).

Например, термины "VL" и "VH" обозначают вариабельный связывающий участок легкой и тяжелой цепи антитела соответственно. Вариабельные связывающие участки состоят из дискретных, хорошо определенных субучастков, известных как "гипервариабельные участки" (CDR) и "каркасные участки" (KY). Термин "CL" обозначает "константный участок легкой цепи иммуноглобулина" или "константный участок легкой цепи", т.е. константный участок легкой цепи антитела. Термин "CH" обозначает "константный участок тяжелой цепи иммуноглобулина" или "константный участок тяжелой цепи", который дополнительно может быть разделен, в зависимости от изотипа антитела на домены CH1, CH2 и CH3 (IgA, IgD, IgG) или домены CH1, CH2, CH3 и CH4 (IgE, IgM). "Fab" (антигенсвязывающий фрагмент) является частью антитела, которая связывает антигены и включает вариабельный участок и CH1 тяжелой цепи, связанный с легкой цепью посредством дисульфидной связи между цепями.

В контексте данного изобретения "участок константного домена фрагмента Fc" или "фрагмент участка Fc" обозначает сегмент константного участка тяжелой цепи фрагмента Fc ("кристаллизуемый участок фрагмента" или участок Fc) антитела, который может включать один или более константных доменов, таких как CH2, CH3, CH4 или любую их комбинацию. В качестве пояснения, участок Fc ответствен за эффекторные функции иммуноглобулина, такие как АЗКЦ (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность), АЗКФ (антителозависимый клеточный фагоцитоз), КЗЦ (комплемент-зависимая цитотоксичность) или фиксация комплемента, связывание с рецепторами Fc (например, CD16, CD32, FcRn), большой период полужизни *in vivo* относительно полипептида без участка Fc, связывание белка А и, возможно, даже трансфер через плаценту (см. Capon et al., Nature, 337:525 (1989)).

Кроме того, антитела имеют шарнирную последовательность, которая обычно располагается между Fab и Fc фрагментами (но расположенный ниже шарнирный участок может включать аминоконцевой участок фрагмента Fc). В качестве пояснения, шарнирный участок иммуноглобулина действует в качестве гибкого спейсера для обеспечения свободного перемещения фрагмента Fab в пространстве. В отличие от константных участков, шарнирные участки структурно отличаются, варьируя в последовательности и длине между классами иммуноглобулинов и даже среди подклассов. Например, шарнирный участок IgG1 человека без ограничения гибкий, что позволяет фрагментам Fab вращаться вокруг своей оси симметрии и двигаться по сфере с центром в первом из двух дисульфидных мостиков между тяжелыми цепями. В отличие от этого, шарнирный участок IgG2 человека относительно короткий и содержит жесткую полипролиновую двойную спираль, стабилизированную четырьмя дисульфидными мостиками между тяжелыми цепями, что ограничивает гибкость. Шарнирный участок IgG3 человека отличается от других подклассов своим уникальным удлиненным шарнирным фрагментом (примерно в четыре раза длиннее, чем шарнирный участок IgG1), включая 62 аминокислоты (включая 21 пролинов и 11 цистеинов), образуя негибкую полипролиновую двойную спираль и обеспечивая большую гибкость по причине того, что фрагменты Fab расположены относительно далеко от фрагмента Fc. Шарнирный участок IgG4 человека более короткий, чем IgG1, но имеет такую же длину, что и IgG2, и его гибкость является промежуточной между IgG1 и IgG2.

В соответствии с кристаллографическими исследованиями, домен шарнирного участка IgG может функционально и структурно подразделен на три участка: верхние, основные или средние и нижние шарнирные участки (Shin et al., Immunological Reviews 130:87 (1992)). Типичные верхние шарнирные участки включают EPKSCDKTHT (SEQ ID NO:227), как установлено для IgG1, ERKCCVE (SEQ ID NO:211), как установлено для IgG2, ELKTPGLGDTT HT (SEQ ID NO:245) или EPKSCDTPPP (SEQ ID NO:246), как установлено для IgG3, и ESKYGPP (SEQ ID NO:247), как установлено для IgG4. Типичные средние или основные шарнирные участки включают CPPCP (SEQ ID NO:228), как установлено для IgG1 и IgG2, CPRCP (SEQ ID NO:248), как установлено для IgG3, и CPSCP (SEQ ID NO:249), как установлено для IgG4. В то время как антитела IgG1, IgG2 и IgG4 имеют один верхний и средний шарнирные участки, IgG3 имеет четыре в тандеме - один ELKTPGLGDTTHTCPRCP (SEQ ID NO:250) и три EPKSCDTPPP CPRCP (SEQ ID NO:251).

Как оказалось, антитела IgA и IgD не имеют IgG-подобного основного участка, и IgD имеет два верхних шарнирных участка в тандеме (см. SEQ ID NO:222 и 252). Типичные верхние шарнирные участки дикого типа, находящиеся в антителах IgA1 и IgA2, имеют последовательности SEQ ID NO:215 и 216.

В отличие от этого, антитела IgE и IgM не имеют типичного шарнирного участка, и вместо него имеют домен CH2 с похожими на шарнирный участок свойствами. Типичные последовательности верхних шарнирноподобных участков CH2 дикого типа IgE и IgM представлены SEQ ID NO:253 (VCSRDFTPPTVKILQSSSDGGGHFPPTIQLLCLVSGYTPGTINITWLEDG QVMDVDLSTASTTQEGELASTQSEL-TLSQKHWLSDRYTTCQVTYQGHTFE DSTKKCA) и SEQ ID NO:254 (VIAELPKVSVFVPPRDGFFGNPRKSKLIC QATGFSRQIQVSWLREGKQVSGSVTTDQVQAEAKESGPT-TYKVTSTLTI KESDWLQGSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCPV) соответственно.

В контексте данного изобретения термин "шарнирный участок" или "шарнир" обозначает (а) шарнирный участок иммуноглобулина (состоящий, например, из верхних и основных участков) или его функционального варианта, включая шарнирные участки дикого типа и измененные шарнирные участки иммуноглобулина, (б) междоменный участок лектина или его функциональный вариант, (в) выступающий участок молекулы кластера дифференциации (CD) или ее функциональный вариант, или (г) участок поверхностного клеточного рецептора (междоменный участок), который соединяет V-образные или C-образные домены иммуноглобулина.

В контексте данного изобретения термин "шарнирный участок иммуноглобулина дикого типа" обозначает встречающиеся в природе аминокислотные последовательности верхних и средних шарнирных участков, расположенных между и соединяющих домены CH1 и CH2 (для IgG, IgA и IgD) или расположенных между и соединяющих домены CH1 и CH3 (для IgE и IgM), находящиеся в тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность шарнирного участка иммуноглобулина дикого типа представлена последовательностью человека и может включать шарнирный участок IgG человека. Типичные шарнирные участки иммуноглобулина человека дикого типа имеют последовательности SEQ ID NO:215 (шарнирный участок IgA1), 216 (шарнирный участок IgA2), 217 (шарнирный участок IgD), 667 (шарнирный участок IgG1), 219 (шарнирный участок IgG2), 220 (шарнирный участок IgG3) и 221 (шарнирный участок IgG4).

Термин "измененный шарнирный участок иммуноглобулина дикого типа" или "шарнирный участок измененного иммуноглобулина" обозначает (а) шарнирный участок иммуноглобулина дикого типа с изменениями аминокислот до 30% (например, до 25, 20, 15, 10 или 5% замен или делеций аминокислот), или (б) фрагмент шарнирного участка иммуноглобулина дикого типа, который имеет в длину примерно от 5 аминокислот (например, примерно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот) до примерно 120 аминокислот (например, имеет длину от примерно 10 до примерно 40 аминокислот или от примерно 15 до примерно 30 аминокислот или от примерно 15 до примерно 20 аминокислот или

от примерно 20 до примерно 25 аминокислот), имеет примерно до 30% изменений аминокислот (например, примерно до 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1% замен или делеций аминокислот или их комбинации), и имеет основной шарнирный участок IgG с последовательностями SEQ ID NO:228, 248 или 249.

Термин "пептидный линкер" обозначает последовательность аминокислот, которая соединяет вариабельный участок тяжелой цепи с вариабельным участком легкой цепи и обеспечивает спейсерную функцию, совместимую со взаимодействием двух субсвязывающих доменов таким образом, что получаемый полипептид сохраняет специфическую аффинность связывания с той же самой молекулой-мишенью, что и антитело, которое включает такие же самые вариабельные участки легкой и тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер состоит из пяти до примерно 35 аминокислот, например от примерно 15 до примерно 25 аминокислот.

Термин "соединительные аминокислоты" или "соединительные аминокислотные остатки" обозначает один или более (например, примерно 2-10) аминокислотных остатков между двумя прилегающими участками или доменами одноцепочечного полипептида, таких как между шарнирным участком и прилегающим фрагментом участка Fc или между шарнирным участком и прилегающим доменом связывания, или между пептидным линкером, которые связывают два вариабельных домена иммуноглобулина и прилегающий вариабельный домен иммуноглобулина. Соединительные аминокислоты могут получать при построении структуры одноцепочечного полипептида (например, аминокислотные остатки, полученные в результате использования сайта рестриктазы во время построения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей одноцепочечный полипептид).

Термин "линкер между CH3 и CH1 или CL" обозначает один или несколько (например, примерно 2-12) аминокислотных остатков между С-концом домена CH3 (например, CH3 дикого типа или мутированного CH3) и N-концом домена CH1 или домена CL (например, Ск).

Термин "участок иммуноглобулина дикого типа" или "домен иммуноглобулина дикого типа" обозначает встречающийся в природе участок или домен иммуноглобулина (например, встречающиеся в природе VL, VH, шарнирный участок, CL, CH1, CH2, CH3 или CH4) из различных классов или подклассов иммуноглобулинов (включая, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE и IgM) и различных видов (включая, например, человека, овцу, мышь, крысу и других млекопитающих). Типичные участки CH1 человека дикого типа имеют последовательность SEQ ID NO:114, 186-192 и 194, участки Ск человека дикого типа имеют последовательность SEQ ID NO:112, участки Ск человека дикого типа имеют последовательность SEQ ID NO:113 и 224-226, домены CH2 человека дикого типа имеют последовательность SEQ ID NO:115, 195-201 и 203, домены CH3 человека дикого типа имеют последовательность SEQ ID NO:116, 204-210 и 212, и домены CH4 человека дикого типа имеют последовательность SEQ ID NO:213 и 214.

Термин "измененный участок иммуноглобулина", "измененный домен иммуноглобулина", "мутированный домен иммуноглобулина" или т.п. обозначает участок иммуноглобулина с последовательностью, идентичной участку или домену иммуноглобулина дикого типа (например, VL, VH, шарнирного участка, CL, CH1, CH2, CH3 или CH4 дикого типа) по меньшей мере на 75 (например, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5%). Например, "измененный участок CH1 иммуноглобулина" или "измененный участок CH1" обозначает участок CH1 с последовательностью, идентичной участку CH1 иммуноглобулина дикого типа (например, CH1 человека) по меньшей мере на 75% (например, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5%). Подобным образом, "измененный домен CH2 иммуноглобулина" или "измененный домен CH2" обозначает домен CH2 с последовательностью, идентичной участку CH2 иммуноглобулина дикого типа (например, CH2 человека) по меньшей мере на 75% (например, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 99,5%).

В контексте данного изобретения термин "идентичность последовательности" обозначает процентный показатель остатков аминокислот в одной последовательности, который идентичен аминокислотным остаткам в другой эталонной полипептидной последовательности после сопоставления последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательности, не принимая во внимание любые консервативные замены как часть идентичности последовательности. Процентный показатель значений идентичности последовательности получен с помощью программного обеспечения NCBI BLAST2.0, как это определено Altschul et al. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, с параметрами, установленными на значения по умолчанию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен иммуноглобулина содержит только замены консервативных аминокислот домена иммуноглобулина дикого типа. В других некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен иммуноглобулина содержит только замены неконсервативных аминокислот домена иммуноглобулина дикого типа. В еще других вариантах осуществления изобретения измененный домен иммуноглобулина содержит замены консервативных и неконсервативных аминокислот.

Термин "замена консервативной аминокислоты" обозначает в науке замену одной аминокислоты другой аминокислотой с подобными свойствами. Типичные замены консервативных аминокислот широ-

ко известны в науке (см., например, WO 97/09433, page 10, published March 13, 1997; Lehninger, Biochemistry, Second Edition; Worth Publishers, Inc. NY:NY (1975), pp.71-77; Lewin, Genes IV, Oxford University Press, NY and Cell Press, Cambridge, MA (1990), p. 8). В некоторых вариантах осуществления изобретения замена консервативной аминокислоты включает замену лейцина на серин.

В контексте данного изобретения термин "производное" обозначает модификацию одного или нескольких аминокислотных остатков пептида химическими или биологическими способами с/без использования фермента, например путем гликозилирования, алкилирования, ацилирования, образования эфира или образования амида. Как правило, "производное" отличается от "аналога" тем, что исходный полипептид может служить исходным материалом для получения "производного", в то время как исходный полипептид необязательно может использоваться в качестве исходного материала для получения "аналога". Производное может иметь различные химические, биологические или физические свойства исходного полипептида. Например, производное может быть более гидрофильным или может иметь измененную реакционную способность (например, CDR имеет измененные аминокислоты, которые изменяют его аффинность относительно мишени) в сравнении с исходным полипептидом.

В контексте данного изобретения, если иное не указано, положение остатка аминокислоты в вариабельном участке молекулы иммуноглобулина пронумеровано в соответствии с системой нумерации по Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Bethesda, MD: Public Health Service, National Institutes of Health (1991)), и положение остатка аминокислоты в константном участке молекулы иммуноглобулина пронумеровано в соответствии с номенклатурой EC (Ward et al., 1995 Therap. Immunol. 2:77-94).

"Рецептор" представляет собой молекулу белка, присутствующую в цитоплазматической мембране или в цитоплазме клетки, к которой может присоединяться сигнальная молекула (т.е. лиганд, такой как гормон, нейромедиатор, токсин, цитокин). Связывание сигнальной молекулы с рецептором приводит к конформационному изменению рецептора, что обычно инициирует клеточный ответ. Однако некоторые лиганды всего лишь блокируют рецепторы без индуцирования какого-либо ответа (например, антагонисты). Некоторые белки-рецепторы являются периферическими мембранными белками. Много гормонов и рецепторов-нейромедиаторов являются трансмембранными белками, которые погружены в фосфолипидный бислой клеточных мембран, и другой большой класс рецепторов представлен внутриклеточными белками, такими как белки для рецепторов стероидов и интракринов.

"В-клеточное ассоциированное заболевание или нарушение" или "заболевание или нарушение, связанное с aberrантной активностью В-клеток" обозначает заболевание или нарушение, ассоциированное (например, вызванное или возникшее в результате) aberrантной активности В-клеток или активности, которая отклоняется от нормального, правильного или ожидаемого курса. Например, В-клеточное ассоциированное нарушение или заболевание может включать несоответствующую пролиферацию В-клеток, которые имеют поврежденную или дефективную ДНК или другие клеточные компоненты. Aberrантная активность В-клеток может включать пролиферацию клеток, характеризующуюся несоответствующими высокими уровнями деления В-клеток, несоответствующими низкими уровнями апоптоза В-клеток, или обоими явлениями. Такие заболевания могут характеризоваться, например, однократной или множественной локальными аномальными пролиферациями В-клеток, групп В-клеток или ткани (-ей), раковых или нераковых, злокачественных или доброкачественных. В-клеточное ассоциированное нарушение или заболевание также может включать aberrантную выработку антител, такую как выработку аутоантител, или избыточную выработку антител, которые наиболее желательны при их выработке в нормальных количествах. Также предусматривается, что aberrантная активность В-клеток может возникнуть в определенных субпопуляциях В-клеток, а не в других популяциях, или может включать несоответствующую стимуляцию Т-клеток, такую как несоответствующее представление антигена относительно Т-клеток или другие пути В-клеток. Примеры В-клеточных ассоциированных нарушений или заболеваний включают В-клеточное злокачественное образование или В-клеточный рак (например, В-клеточная лимфома, В-клеточный лейкоз или В-клеточная миелома), заболевание, характеризующееся выработкой аутоантитела (например, аутоиммунные заболевания) или воспаление, или заболевание, характеризующееся несоответствующей стимуляцией Т-клеток, вызванной представлением антигена В-клетками относительно Т-клеток или вызванной другими путями, действующими В-клетки.

Термины "лечение", "лечить" или "снижение симптомов" обозначают терапевтическое лечение или профилактическое/превентивное лечение. Лечение является терапевтическим, если по меньшей мере один симптом заболевания у индивидуума, принимающего лечение, улучшается, или лечение может замедлять ухудшение прогрессирующего заболевания у индивидуума, или предотвратить возникновение дополнительных связанных заболеваний.

"Терапевтически эффективное количество (или доза)" или "эффективное количество (или доза)" специфической связывающейся молекулы или соединения обозначает количество соединения, достаточное для снижения одного или нескольких симптомов заболевания, подвергнутого лечению, статистически значимым образом. При использовании отдельного активного действующего вещества, которое вводится в виде монотерапии, терапевтически эффективная доза обозначает только данное вещество. При использовании относительно комбинации терапевтически эффективная доза относится к комбинирован-

ным количествам активных действующих веществ, что приводит к терапевтическому эффекту при их последовательном или одновременном введении (в одном и том же препарате или сопутственно в разных препаратах).

Термин "фармацевтически приемлемый" относится к молекулярным единицам и композициям, которые не приводят к аллергии или другим серьезным нежелательным реакциям при введении с использованием хорошо известных в науке путей введения.

Термин "нуждающийся пациент" обозначает пациента, имеющего риск или страдающего от заболевания, нарушения или состояния, которое поддается лечению или улучшению с использованием описанных здесь полипептидного гетеродимера или их композиций.

В контексте данного изобретения термин "белок слияния, полученный из иммуноглобулина" обозначает белок слияния, который включает по меньшей мере один участок иммуноглобулина, такой как домен VL, VH, CL, CH1, CH2, CH3 и CH4. Участок иммуноглобулина может быть представлен участком иммуноглобулина дикого типа или измененным участком иммуноглобулина. Типичные белки слияния, полученные из иммуноглобулина, включают одноцепочечные переменные фрагменты антитела (scFv) (см., например, Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83, 1988), SMIP™ белки (см. публикацию патента США No. 2003/0133939, 2003/0118592 и 2005/0136049), белки PIMS (см. публикацию заявки PCT No. WO 2009/023386), и многофункциональные связывающие белки (такие как белки SCORPION™ и Xceptor) (см. публикацию заявки PCT No. WO 2007/146968, публикацию заявки на патент США No. 2006/0051844, и патент США No. 7166707).

Дополнительные определения представлены в тексте данной заявки.

Полипептидные гетеродимеры.

В одном аспекте данное изобретение описывает полипептидный гетеродимер, образованный объединением двух разных одноцепочечных полипептидов. Первый одноцепочечный полипептид (SCP-I) включает, состоит, по существу, из или состоит из от одного до четырех связывающих доменов, которые специфически связывают от одной до четырех мишеней, шарнирный участок (H-I), домен гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-I) и фрагмент участка Fc (FRP-I), в то время как второй одноцепочечный полипептид включает, состоит, по существу, из или состоит из от нуля до четырех связывающих доменов, которые специфически связывают от нуля до четырех мишеней, шарнирный участок (H-II), домен гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-II) и фрагмент участка Fc (FRP-II), при условии, что полипептидный гетеродимер включает по меньшей мере два связывающих домена, которые специфически связывают одну или более мишеней, например по меньшей мере две различные мишени. H-I и H-II могут иметь одинаковую последовательность, но могут и отличаться. HD-I может включать участок иммуноглобулина CH1, и HD-II может включать участок CL иммуноглобулина. В альтернативном варианте HD-I может включать участок CL иммуноглобулина, и HD-II может включать участок иммуноглобулина CH1. FRP-I и FRP-II могут иметь одинаковую последовательность, но могут и отличаться. Отдельные компоненты полипептидных гетеродимеров по данному изобретению описаны подробно ниже.

Связывающие домены.

Как это указано выше, полипептидный гетеродимер по данному изобретению включает два одноцепочечных полипептида: один одноцепочечный полипептид включает от одного до четырех связывающих доменов, которые специфически связывают от одной до четырех мишеней, и другой одноцепочечный полипептид полипептидного гетеродимера включает от нуля до четырех связывающих доменов, которые специфически связывают от нуля до четырех мишеней. Общее число связывающих доменов полипептидного гетеродимера варьирует от примерно двух до восьми, и общее количество различных мишеней, с которыми связываются связывающие домены, варьирует от примерно одного до восьми, например от двух до восьми, двух до четырех, двух до трех или двух мишеней.

Если одноцепочечный полипептид полипептидного гетеродимера включает один связывающий домен, связывающий домен может быть расположен на аминоконце или карбоксильном конце фрагмента участка Fc одноцепочечного полипептида. Например, одноцепочечный полипептид, включающий два связывающих домена, расположенных на аминоконце и карбоксильном конце фрагмента участка Fc одноцепочечного полипептида, или оба связывающих домена могут быть расположены в направлении N-конца или C-конца относительно фрагмента участка Fc. В другом примере одноцепочечный полипептид может включать три связывающих домена, при этом (а) два связывающих домена являются аминоконцевыми на разных одноцепочечных белках и третий связывающий домен расположен ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc на SCP-I или SCP-II, (б) два связывающих домена являются карбокси-концевыми на разных одноцепочечных белках и третий связывающий домен расположен ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc на SCP-I или SCP-II. В еще одном примере полипептидный гетеродимер может включать четыре связывающих домена, при этом два связывающих домена расположены ближе к аминоконцу относительно фрагмента участка Fc на разных цепях и другие два связывающих домена расположены ближе к карбокси-концу относительно фрагмента участка Fc на разных цепях. В альтернативном варианте в любом из таких вариантов воплощения изобретения два связывающих домена могут быть присоединены друг к другу в тандеме и располагаться на SCP-I или SCP-II или обоих



доменах, в зависимости от количества присутствующих связывающих доменов - укладка доменов используется в случае присутствия от пяти до восьми связывающих доменов в SCP-I и SCP-II.

Связывание мишени связывающим доменом опосредует взаимодействие между мишенью (например, рецептором или лигандом) и другой молекулой. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывание мишени (например, рецептора) связывающим доменом стимулирует определенные функции мишени (например, передачу сигнала) или сближает мишени для биологического эффекта (например, направляет Т-клетки к опухоли, что, в свою очередь, активирует Т-клетки). В других некоторых вариантах осуществления изобретения связывание мишени связывающими доменами блокирует взаимодействие между мишенью и другой молекулой, и это изменяет, снижает или элиминирует определенные функции мишени.

Молекула-мишень, которая специфически связана связывающим доменом, содержащимся в полипептидном гетеродимере по данному изобретению, может находиться на или во взаимосвязи с интересующей клеткой ("клеткой-мишенью"). Типичные клетки-мишени включают раковые клетки, клетки, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием или нарушением или с воспалительным заболеванием или нарушением, В-клетки и Т-клетки. Молекула-мишень также может быть и не ассоциирована с клеткой. Типичные молекулы-мишени, не ассоциированные с клеткой, включают растворимые белки, секретируемые белки, депонированные белки и внеклеточные структурные (матрикс) белки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающие домены полипептидных гетеродимеров по данному изобретению специфически связывают мишень, выбираемую из мишеней Т-клеток, опухолевых антигенов, мишеней В-клеток, провоспалительных цитокинов или хемокинов, проонкогенных цитокинов или факторов роста, ангиогенных агентов, рецепторов Fc, рецептора трансферрина, тирозинкиназных рецепторов (RTK), TNFSFR или любой их комбинации. Например, полипептидные гетеродимеры по данному изобретению специфически связывают мишень Т-клеток и опухолевую мишень.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает Т-клеточную мишень, такую как комплекс TCR или его компонент (например, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$ ), CD28, PD-1, HVEM, BTLA, CD80, CD86, GITR и TGFBR1.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает комплекс TCR или его компонент. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен специфически связывает отдельную цепь CD3 человека (например, цепь CD3 $\gamma$  человека, цепь CD3 $\delta$  человека, и цепь CD3 $\epsilon$  человека) или комбинацию двух или более отдельных цепей CD3 человека (например, комплекс CD3 $\gamma$  человека и CD3 $\epsilon$  человека или комплекс CD3 $\delta$  человека и CD3 $\epsilon$  человека). В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен специфически связывает цепь CD3 $\epsilon$  человека. В других некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен специфически связывает один или более TCR $\alpha$  человека, TCR $\beta$  человека или гетеродимер, образованный из TCR $\alpha$  человека и TCR $\beta$  человека. В других некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен по данному изобретению связывает комплекс, образованный из одной или более цепей CD3 человека с одной или более цепей TCR человека, такой как комплекс, образованный из цепи CD3 $\gamma$  человека, цепи CD3 $\delta$  человека, или цепи CD3 $\epsilon$  человека с цепью TCR $\alpha$  человека или цепью TCR $\beta$  человека. В любом из таких вариантов воплощения изобретения полипептидный гетеродимер по данному изобретению также может связывать опухолевую мишень.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает опухолевую мишень, включая следующие: RON, c-Met, CEACAM-6, PSMA, EpCAM, CEA, PCTA-1, STEAP-1, PSCA, ALCAM (CD166), EphA2, CD151, CA-125, MUC-1, MAGE-1, TROP2, IGF1R, CD44v6, CD151, TGFBR2, GHRHR, GHR, IL-6R, gp130, TNFR2, OSMR $\beta$ , Patched-1, Frizzled, Robo1, LTRP, CD80, CD81, CD86, CCR5, HER-3, HER-4, EGFR, CEA, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5<sub>AC</sub>, MUC5<sub>B</sub>, MUC7,  $\beta$ XGч, Lewis-Y, CD33, CD30, ганглиозид GD3, 9-O-ацетил-GD3, GM2, Globo H, фукозил GM1, Poly SA, GD2, карбоангидраза IX (MN/CA IX), CD44v6, Sonic Hedgehog (Shh), Wue-1, плазмоклеточный антиген, (связанный с мембраной) IgE, меланома хондроитин сульфат протеогликан (MCSP), CCR8, предшественник ФНО-альфа, STEAP-2, мезотелин, A33 антиген, антиген стволовых клеток предстательной железы (PSCA), Ly-6; десмоглеин 4, неопитоп Е-кадгерина, ацетилхолиновый рецептор плода, CD25, CA19-9 маркер, CA-125 маркер и мюллерово ингибирующее вещество (MIS) рецептор II типа, sTn (сигналированный антиген Tn; TAG-72), FAP (антиген активации фибробластов), эндосиалин, EGFRvIII, LG, SAS, CD63, B7-H3 или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает В-клеточную мишень, такую как CD19, CD20, CD21, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38, CD70, CD79b, HLA-DR или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает провоспалительный цитокин или хемокин, такой как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, гиперИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-1, ИЛ-8, IP-10, ИФН- $\gamma$ , ИФН- $\alpha$ , RANKL, FASL, ТФр $\beta$ , ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-17A/F, TWEAK, CSF2, IGF1, IGF2 или BLyS/APRIL или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает проонкогенный цитокин или фактор роста, такой как ГЦФР, MSP, ЭФР (включая эпирегулин, херрегулин,  $\beta$ -регулин, нейрегулин), HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, гиперИЛ-6, ИЛ-8, Wnt, sHH, ТФр $\beta$ , PDGF или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает ангиогенный агент, такой как PDGFR, VEGFR1-4, NRP1, ангиопоэтин 2, c-Met или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает рецептор Fc, такой как CD64, CD32A, CD32B, CD16, FcRn или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает рецептор трансферрина, такой как CD71.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает рецептор тирозинкиназы, такой как EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, IGF1R, EphA2, c-Met, RON или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает TNFSFR, такой как TNFR1, TNFR2, TWEAKR, TACI, BAFF-R, BCMA, FAS, OX40, GITR, 4-1-BB, LTbetaR, HVEM, RANK или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению специфически связывает гиперИЛ-6, ИЛ-10, LIGHT, CD40, PDL1, PDL2 или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько связывающих доменов полипептидного гетеродимера по данному изобретению являются агонистом одной из следующих молекул: ИЛ-10, HLA-G, ГЦФР, ИЛ-35, PD-1, BTLA, TNFR1, TNFR2, DR4, DR5, TWEAKR, FAS или любой их комбинации.

Связывающий домен также может быть любым пептидом, который специфически связывает интересующую мишень. Источники связывающих доменов включают вариабельные участки антитела из различных видов (которые могут быть представлены в виде антител, sFv, scFv, Fab, или растворимого домена VH или доменных антител), включая человека, грызунов, птиц и овец. Дополнительные источники связывающих доменов включают вариабельные участки антител из других видов, таких как верблюды (из верблюдов, дромедаров или лам; Ghahroudi et al. (1997) FEBS Letters 414(3):521-526; Vincke et al. (2009) Journal of Biological Chemistry (2009) 284:3273-3284; Hamers-Casterman et al. (1993) Nature, 363:446 and Nguyen et al. (1998) J. Mol. Biol. 275:413), акул-нянек (Roux et al. (1998) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 95:11804), американского гидролага (Nguyen et al. (2002) Immunogenetics, 54:39) или миноги (Herrin et al., (2008) Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA) 105:2040-2045 и Alder et al. (2008) Nature Immunology 9:319-327). Такие антитела могут образовывать антигенсвязывающие участки с использованием только вариабельного домена тяжелой цепи, т.е. такие функциональные антитела являются гомодимерами только тяжелых цепей (обозначается как "антитела с тяжелой цепью") (Jespers et al. (2004) Nature Biotechnology 22:1161-1165; Cortez-Retamozo et al. (2004) Cancer Research 64:2853-2857; Baral et al. (2006) Nature Medicine 12:580-584, and Barthelemy et al. (2008) Journal of Biological Chemistry 283:3639-3654).

Типичные антитела к CD3, из которых может быть получен связывающий домен по данному изобретению, включают моноклональное антитело Cris-7 (Reinherz E.L. et al. (eds.), Leukocyte typing II., Springer Verlag, New York, (1986)), моноклональное антитело BC3 (Anasetti et al. (1990) J. Exp. Med 172:1691), OKT3 (Ortho multicenter Transplant Study Group (1985) N. Engl. J. Med. 313:337) и их производные, такие как OKT3 ала-ала (Herold et al. (2003) J. Clin. Invest. 11:409), визилизумаб (Carpenter et al. (2002) Blood 99:2712), и моноклональное антитело 145-2C11 (Hirsch et al. (1988) J. Immunol. 140: 3766). Типичное антитело к TCR представлено моноклональным антителом H57 (Lavasani et al. (2007) Scandinavian Journal of Immunology 65:39-47).

Альтернативный источник связывающих доменов по данному изобретению включает последовательности, которые кодируют обычные пептидные библиотеки, или последовательности, которые кодируют рекомбинантное разнообразие аминокислот в петлевых участках альтернативных структур, не являющихся антителом, таких как домены фибриногена (см., например, Weisel et al. (1985) Science 230:1388), домены Кунитца (см., например, патент США No. 6423498), повторяющиеся белки анкирина (Binz et al. (2003) Journal of Molecular Biology 332:489-503 и Binz et al. (2004) Nature Biotechnology

22(5):575-582), фибронектин-связывающие домены (Richards et al. (2003) *Journal of Molecular Biology* 326:1475-1488; Parker et al. (2005) *Protein Engineering Design and Selection* 18(9):435-444 и Hackel et al. (2008) *Journal of Molecular Biology* 381:1238-1252), цистеин-узловые минибелки (Vita et al. (1995) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 92:6404-6408; Martin et al. (2002) *Nature Biotechnology* 21:71-76 and Huang et al. (2005) *Structure* 13:755-768), повторяющиеся домены тетратрикопептида (Main et al. (2003) *Structure* 11:497-508 and Cortajarena et al. (2008) *ACS Chemical Biology* 3:161-166), лейцин-обогащенные повторяющиеся домены (Stumpp et al. (2003) *Journal of Molecular Biology* 332:471-487), домены липокалина (см., например, WO 2006/095164, Beste et al. (1999) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 96:1898-1903 and Schönfeld et al. (2009) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 106:8198-8203), V-образные домены (см., например, публикацию заявки на патент США No. 2007/0065431), домены лектина C-типа (Zelensky and Gready (2005) *FEBS J.* 272:6179; Beavil et al. (1992) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 89:753-757 and Sato et al. (2003) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (USA)* 100:7779-7784), mAb<sup>2</sup> или FCAB<sup>TM</sup> (см., например, публикации заявок на патент США No. WO 2007/098934; WO 2006/072620), или подобные (Nord et al. (1995) *Protein Engineering* 8(6):601-608; Nord et al. (1997) *Nature Biotechnology* 15:772-777; Nord et al. (2001) *European Journal of Biochemistry* 268(15):4269-4277 и Binz et al. (2005) *Nature Biotechnology* 23:1257-1268).

Связывающие домены по изобретению могут быть получены, как это описано в тексте данной заявки, или с использованием целого ряда известных в науке способов (см., например, патенты США No. 6291161 и 6291158). Например, связывающие домены по данному изобретению могут быть идентифицированы способом скрининга фаговой библиотеки Fab на предмет Fab фрагментов, которые специфически связываются с интересующей мишенью (см. Hoet et al. (2005) *Nature Biotechnol.* 23:344). Кроме того, традиционные стратегии разработки гибридомы с использованием интересующей мишени в виде иммуногена в стандартных системах (например, мышах, HUMAB MOUSE®, TC MOUSE<sup>TM</sup>, KM-MOUSE®, ламах, цыплятах, крысах, хомяках, кроликах и т.д.) могут использоваться для разработки связывающих доменов по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает связывающий домен CD86, такой как эктодомен CTLA4, эктодомен CD28 или связывающий домен варибельного участка иммуноглобулина (такой как scFv), специфичный относительно CD86 (например, из моноклональных антител 3D1 или FUN1). В некоторых вариантах осуществления изобретения используют не весь эктодомен. Например, могут использоваться домены в пределах эктодомена CTLA4, которые связывают CD86 и предотвращают связывание CD86 с CD28. Связывающий домен CD86 может блокировать связывание CD86 с CD28 и, таким способом, снижать активацию Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает агонист ИЛ-10, такой как ИЛ-10, моноИЛ-10, или его функциональный участок. Термин "моноИЛ-10" обозначает молекулу ИЛ-10, имеющую короткий линкер (GGGSGG, SEQ ID NO:760), который разделяет два субдомена молекулы (домены аминок- и карбоксильного конца), таким образом, что такие субдомены могут образовывать внутримолекулярный димер.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает агонист HLA-G, такой как HLA-G5, HLA-G1, мутеин HLA-G или его функциональный участок; эктодомен HLA-G5, HLA-G1 или мутеина HLA-G; или связывающий домен варибельного участка иммуноглобулина (такой как scFv), специфичный относительно ILT2, ILT4 или KIR2DL4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает агонист ГЦФР, такой как ГЦФР или его субдомен.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает агонист ИЛ-35, такой как связывающий домен варибельного участка иммуноглобулина (такой как scFv), специфичный относительно ИЛ-35R или ИЛ-35, или его функциональный участок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает антагонист LIGHT, такой как связывающий домен варибельного участка иммуноглобулина (такой как scFv), специфичный относительно LIGHT, или эктодомен HVEM, или его функциональный участок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает агонист PD-1, такой как связывающий домен варибельного участка иммуноглобулина (такой как scFv), специфичный относительно PD-1, или лиганд PD-1 (например, PD-L1 или PD-L2), или его функциональный участок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает агонист BTLA, такой как связывающий домен варибельного участка иммуноглобулинового происхождения (такой как scFv), специфичный относительно BTLA, или эктодомен HVEM, или его функциональный участок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает антагонист GITRL, такой как связывающий домен варибельного участка иммуноглобулинового происхождения (такой как scFv), специфичный относительно GITRL, или эктодомен GITR, растворимый GITR, или его функциональный участок.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает антагонист CD40, такой как связывающий домен варибельного участка иммуноглобулинового происхождения (такой как scFv), специфичный относительно CD40.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен представлен одноцепочечным фрагментом Fv (scFv), который включает участки VH и VL, специфичные относительно интересующей мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> имеют человеческое происхождение. Типичные участки VH включают участок VH 2E12 (антитело к CD28) scFv с последовательностью SEQ ID NO:106, участок VH P2C2 (антитело к CD79b) scFv с последовательностью SEQ ID NO:184, участок VH 5D5 (антитело к c-Met) scFv с последовательностью SEQ ID NO:258, участок VH A2 (антитело к гиперИЛ-6) scFv с последовательностью SEQ ID NO:80, участок VH 3D1 (антитело к CD86) scFv с последовательностью SEQ ID NO:92, участок VH MET021 (антитело к c-Met) scFv с последовательностью SEQ ID NO:100, участок VH G19-4 (антитело к CD3) scFv с последовательностью SEQ ID NO:103, участок VH HD37 (антитело к CD19) scFv с последовательностью SEQ ID NO:117, участок VH M0042 (антитело к HLA-DR) scFv с последовательностью SEQ ID NO:121, участок VH BMA031 (антитело к TCR) scFv с последовательностью SEQ ID NO:828, участок VH OKT3-M (антитело к CD3) scFv с последовательностью SEQ ID NO:831, и участок VH HuM291 (антитело к CD3) scFv с последовательностью SEQ ID NO:835. Нуклеотидные последовательности, кодирующие участки VH A2 (антитело к гиперИЛ-6) и 3D1 (антитело к CD86) scFv, представлены SEQ ID NO:79 и 91 соответственно.

Типичные домены VL включают участок VL 2E12 (антитело к CD28) scFv с последовательностью SEQ ID NO:107, участок VL P2C2 (антитело к CD79b) scFv с последовательностью SEQ ID NO:182, участок VL 5D5 (антитело к c-Met) scFv с последовательностью SEQ ID NO:259, участок VL A2 (антитело к гиперИЛ-6) scFv с последовательностью SEQ ID NO:84, участок VL 3D1 (антитело к CD86) scFv с последовательностью SEQ ID NO:96, участок VL MET021 (антитело к c-Met) scFv с последовательностью SEQ ID NO:101, участок VL G19-4 (антитело к CD3) scFv с последовательностью SEQ ID NO:104, участок VL HD37 (антитело к CD19) scFv с последовательностью SEQ ID NO:119, участок VL M0042 (антитело к HLA-DR) scFv с последовательностью SEQ ID NO:122, участок VL BMA031 (антитело к TCR) scFv с последовательностью SEQ ID NO:829, участок VL OKT3-M (антитело к CD3) scFv с последовательностью SEQ ID NO:833, и участок VL HuM291 (антитело к CD3) scFv с последовательностью SEQ ID NO:836. Нуклеотидные последовательности, кодирующие участки VL A2 (антитело к гиперИЛ-6) и 3D1 (антитело к CD86) scFv, представлены SEQ ID NO:83 и 95 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен представлен одноцепочечным фрагментом Fv (scFv), который включает домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>, специфичные относительно комплекса TCR или его компонента. В некоторых вариантах осуществления изобретения домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> представлены доменами человека или гуманизированными доменами V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub>. Типичные домены V<sub>H</sub> включают домен BC3 (антитело к CD3) V<sub>H</sub>, домен OKT3 (антитело к CD3) V<sub>H</sub>, домен H57 (антитело к TCR) V<sub>H</sub> и домен 2C11 (антитело к CD3) V<sub>H</sub> с последовательностями SEQ ID NO:301, 303, 313 и 317 соответственно. Дополнительные типичные домены V<sub>H</sub> включают домены Cris-7 (антитело к CD3) V<sub>H</sub> с последовательностями SEQ ID NO:327 и 331-333. Типичные домены V<sub>L</sub> включают домен BC3 (антитело к CD3) V<sub>L</sub>, домен OKT3 (антитело к CD3) V<sub>L</sub>, домен H57 (антитело к TCR) V<sub>L</sub> и домен 2C11 (антитело к CD3) V<sub>L</sub> с последовательностями SEQ ID NO:302, 304, 315 и 318 соответственно. Дополнительные типичные домены V<sub>L</sub> включают домены Cris-7 (антитело к CD3) V<sub>L</sub> с последовательностями SEQ ID NO:328, 329 и 330.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен включает или представлен последовательностью, которая идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99%, по меньшей мере на 99,5% или 100% аминокислотной последовательности вариативного участка легкой цепи (V<sub>L</sub>) или вариативного участка тяжелой цепи (V<sub>H</sub>), или обоих участков, при этом каждый CDR включает нулевые изменения или по меньшей мере одно, два или три изменения в моноклональном антителе или фрагменте, или его производном, которые специфически связываются с интересующей мишенью (например, c-Met, RON, CD28, CD79b, CD3ε, TCRα, TCRβ, гиперИЛ-6, CD86, CD19 и HLA-DR), и такой мутант или производное все еще связывается со своей мишенью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен участка VH или VL по данному изобретению может быть получен или основан на VH или VL известного моноклонального антитела и содержит одну или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) вставок, одну или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) делеций, одну или несколько (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) замен аминокислот (например, замен консервативных аминокислот или замен неконсервативных аминокислот), или комбинацию указанных выше изменений при сравнении с VH или VL известного моноклонального антитела. Вставка(-и), делеция(-и) или замена(-ы) могут быть в любом месте участка VH, включая аминокислотный или карбокси-конец, или оба конца данного участка, при условии, что каждый CDR включает нулевые изменения или, по большей мере, одно, два или три изменения, и при условии, что связывающий домен, включающий модифицированный участок VH или VL, все еще может специфически связываться со своей мишенью с примерно такой же аффинностью, что и связывающий домен дикого типа.

Домены VH и VL могут быть расположены в любой ориентации (т.е. со стороны аминокислотного или карбоксильного конца, VH-VL или VL-VH) и могут быть соединены аминокислотной последовательностью

(например, имеющей длину от примерно пяти до примерно 35 аминокислот), способной обеспечивать спейсерную функцию, таким образом, два субсвязывающих домена могут взаимодействовать с образованием функционального связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотная последовательность, которая соединяет домены VH и VL (также указана в тексте данной заявки как "линкер"), включает последовательность, принадлежащую семейству  $(\text{Gly}_n\text{Ser})$ , такому как  $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_4\text{Ser})_1$ ,  $(\text{Gly}_3\text{Ser})_1(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ,  $(\text{Gly}_3\text{Ser})_n(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  или  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ , при этом  $n$  является целым числом от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер представлен GGGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO:183) или GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:108). Дополнительный типичный линкер представлен GGGGSGGGGS GGGGAS (SEQ ID NO:739). В некоторых вариантах осуществления изобретения такие линкеры на основе  $(\text{Gly}_n\text{Ser})$  используют для соединения доменов VH и VL в связывающем домене, но не используют для соединения связывающего домена с доменом гетеродимеризации иммуноглобулина или фрагментом участка Fc.

Типичные связывающие домены, специфичные относительно CD28, включают 2E12 scFv с последовательностью SEQ ID NO:109, связывающие домены, специфичные относительно CD79b включают P2C2 scFv с последовательностью SEQ ID NO:185; связывающие домены, специфичные относительно c-Met включают 5D5 scFv с последовательностью SEQ ID NO:257; связывающие домены, специфичные относительно RON включают 4C04 scFv с последовательностью SEQ ID NO:261 и 11H09 scFv с последовательностью SEQ ID NO:265; связывающие домены, специфичные относительно гиперИЛ-6 включают A2 scFv с последовательностью SEQ ID NO:86; связывающие домены, специфичные относительно CD86 включают 3D1 scFv с последовательностью SEQ ID NO:98; связывающие домены, специфичные относительно HLA-DR включают M0042 scFv с последовательностью SEQ ID NO:120; связывающие домены, специфичные относительно CD3 включают G19-4 scFv с последовательностью SEQ ID NO: 102, OKT3-M scFv с последовательностью SEQ ID NO:834, и HuM291 scFv с последовательностью SEQ ID NO:837; связывающие домены, специфичные относительно CD19 включают H37 scFv с последовательностью SEQ ID NO:105; и связывающие домены, специфичные относительно c-Met включают MET021 scFv с последовательностью SEQ ID NO:120 (с CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO:296-298 и 464-466 соответственно). Нуклеотидные последовательности, кодирующие участки A2 (антитело к гиперИЛ-6) и 3D1 (антитело к CD86) scFv, представлены SEQ ID NO:85 и 97 соответственно. Типичные связывающие домены, которые связывают комплекс TCR или его компонент, включают BMA031 scFv с последовательностью SEQ ID NO:830 и другие scFv с последовательностью SEQ ID NO:310, 311, 312, 319 и 334-340.

Дополнительные типичные связывающие домены включают эктодомен PDL2 с последовательностью SEQ ID NO:88 и моноИЛ-10 с последовательностью SEQ ID NO:90. Нуклеотидные последовательности, кодирующие эктодомен PDL2 и моноИЛ-10 имеют последовательность SEQ ID NO:87 и 89 соответственно.

Аминокислотная последовательность легкой цепи 4C04 (антитело к RON) scFv имеет последовательность SEQ ID NO:602, и CDR1, CDR2 и CDR3 имеют последовательность SEQ ID NO:604-606 соответственно. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 4C04 (антитело к RON) scFv имеет последовательность SEQ ID NO:603, и CDR1, CDR2 и CDR3 имеют последовательность SEQ ID NO:607-609 соответственно.

Аминокислотная последовательность легкой цепи 11H09 (антитело к RON) scFv имеет последовательность SEQ ID NO:610, и CDR1, CDR2 и CDR3 имеют последовательность SEQ ID NO:612-614 соответственно. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 11H09 (антитело к RON) scFv имеет последовательность SEQ ID NO:611, и CDR1, CDR2 и CDR3 имеют последовательность SEQ ID NO:615-617 соответственно.

Связывающий домен может быть расположен на амино- или карбоксильном конце относительно фрагмента участка Fc одноцепочечного полипептида по данному изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен расположен на аминоконце одноцепочечного полипептида. В других некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен расположен на карбоксильном конце одноцепочечного полипептида. В других некоторых вариантах осуществления изобретения связывающий домен расположен на амино- и карбоксильном конце одноцепочечного полипептида.

Домены гетеродимеризации.

Как это указано выше, полипептидный гетеродимер по данному изобретению включает домен гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой полипептидной цепи. Домены гетеродимеризации иммуноглобулина в двух одноцепочечных полипептидах полипептидного гетеродимера отличаются друг от друга и, следовательно, могут быть по-разному модифицированы для облегчения гетеродимеризации в обеих цепях и для сведения к минимуму гомодимеризацию любой цепи. Как это показано в примерах, домены гетеродимеризации иммуноглобулина, описанные в тексте данной заявки, обеспечивают эффективную гетеродимеризацию различных полипептидов и облегчают очистку полученных полипептидных гетеродимеров.

Как это описано в тексте данной заявки, домены гетеродимеризации иммуноглобулина используют

для обеспечения гетеродимеризации двух разных одноцепочечных полипептидов (например, одного короткого и одного длинного) в соответствии с данным изобретением и включают домены CH1 и CL иммуноглобулинов, например, домены CH1 и CL человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен участком CH1 дикого типа, таким как участок CH1 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM дикого типа. В дополнительных вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен участком CH1 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM дикого типа с последовательностью SEQ ID NO:114, 186-192 и 194 соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен участком CH1 IgG1 дикого типа с последовательностью SEQ ID NO: 114.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен измененным участком CH1 дикого типа, таким как измененный участок CH1 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен измененным участком CH1 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM. В других дополнительных вариантах осуществления изобретения остаток цистеина участка CH1 дикого типа (например, CH1 человека), участвующий в образовании дисульфидной связи с доменом CL иммуноглобулина дикого типа (например, CL человека), удален или заменен в измененном участке CH1 иммуноглобулина, таким образом, в результате чего дисульфидная связь между измененным участком CH1 и доменом CL дикого типа не образуется.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен доменом CL дикого типа, таким как домен Сκ дикого типа или домен Сλ дикого типа. В отдельных вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен доменом Сκ человека дикого типа или доменом Сλ человека дикого типа с последовательностью SEQ ID NO:112 и 113 соответственно. В дополнительных вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен измененным доменом CL иммуноглобулина, таким как измененный домен Сκ или Сλ, например, измененный домен Сκ человека или домен Сλ человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения остаток цистеина в домене CL дикого типа (например, CL человека), участвующий в формировании дисульфидной связи с участком CH1 иммуноглобулина дикого типа (например, CH1 человека), удален или заменен в измененном домене CL иммуноглобулина. Такие измененные домены CL могут дополнительно включать делецию аминокислот на аминоконце. Типичный домен Сκ имеет последовательность SEQ ID NO:141, в которой первый аргинин и последний цистеин домена Сκ человека дикого типа удалены. В некоторых вариантах осуществления изобретения удален только последний цистеин домена Сκ человека дикого типа в измененном домене Сκ по той причине, что первый аргинин, удаленный из домена Сκ человека дикого типа, может быть обеспечен линкером, который имеет аргинин на карбоксильном конце, и связями аминоконца измененного домена Сκ с другим доменом (например, фрагментом участка Fc). Типичный домен Сλ имеет последовательность SEQ ID NO:140, в которой первый аргинин домена Сλ человека дикого типа удален, и цистеин, участвующий в образовании дисульфидной связи с цистеином участка CH1, заменен на серин.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен измененным доменом Сκ, который содержит одну или несколько аминокислотных замен в сравнении с доменом Сκ дикого типа, в положениях, которые могут участвовать в образовании межцепочечной водородной связи при взаимодействии Сκ-Сκ. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен измененным доменом Сκ человека, имеющим одну или более аминокислот в положениях N29, N30, Q52, V55, T56, S68 или T70, которые заменены на другие аминокислоты. Нумерация аминокислот на основе их положений в измененной последовательности Сκ человека указана в последовательности SEQ ID NO:141. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина представлен измененным доменом Сκ человека, имеющим одну, две, три или четыре аминокислотных замены в положениях N29, N30, V55 или T70. Аминокислота, используемая в качестве заместителя в указанных выше положениях, может быть аланином, или аминокислотным остатком с молекулой боковой цепи, такой как аргинин, триптофан, тирозин, глутамат, глутамин или лизин. Дополнительные аминокислотные остатки, которые могут использоваться для замены аминокислотных остатков последовательности Сκ человека дикого типа в указанных выше положениях (например, N30), включают аспарат, метионин, серин и фенилаланин. Типичные измененные домены Сκ иммуноглобулина имеют последовательность SEQ ID NO:142-178. Измененные домены Сκ человека представлены доменами, которые облегчают гетеродимеризацию участка CH1, но сводят к минимуму гомодимеризацию другого домена Сκ. Репрезентативные измененные домены Сκ человека имеют последовательность SEQ ID NO:160 (N29W V55A T70A), 161 (N29Y V55A T70A), 202 (T70E N29A N30A V55A), 167 (N30R V55A T70A), 168 (N30K V55A T70A), 170 (N30E V55A T70A), 172 (V55R N29A N30A), 175 (N29W N30Y V55A T70E), 176 (N29Y N30Y V55A T70E), 177 (N30E V55A T70E), 178 (N30Y V55A T70E), 838 (N30D V55A T70E), 839 (N30M V55A T70E),

840 (N30S V55A T70E) и 841 (N30F V55A T70E).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в дополнение или альтернативно мутациям в описанных здесь доменах Ск домены гетеродимеризации иммуноглобулина (т.е. домены иммуноглобулина CH1 и CL) полипептидного гетеродимера имеют мутации, таким образом, полученные домены гетеродимеризации иммуноглобулина образуют солевые мостики (т.е. ионные взаимодействия) между остатками аминокислот в мутированных сайтах. Например, домен гетеродимеризации иммуноглобулина полипептидного гетеродимера может быть представлен мутированным доменом CH1 в комбинации с мутированным доменом Ск. В мутированном домене CH1 валин в положении 68 (V68) домена CH1 человека дикого типа заменен аминокислотным остатком, имеющим отрицательный заряд (например, аспаратом или глутаматом), в то время как лейцин в положении 27 (L27) мутированного домена Ск человека, в котором первый аргинин и последний цистеин были удалены, заменен аминокислотным остатком с положительным зарядом (например, лизином, аргинином или гистидином). Взаимодействие зарядов между аминокислотными остатками с отрицательным зарядом полученного мутированного домена CH1 и аминокислотными остатками с положительным зарядом полученного мутированного домена Ск образует солевой мостик, который стабилизирует интерфейс гетеродимера между мутированными доменами CH1 и Ск. В альтернативном варианте V68 CH1 дикого типа может быть заменен аминокислотным остатком с положительным зарядом, в то время как L27 мутированного домена Ск человека, в котором первый аргинин и последний цистеин были удалены, может быть заменен аминокислотным остатком с отрицательным зарядом. Типичные мутированные последовательности CH1, в которых V68 заменен аминокислотой с отрицательным или положительным зарядом, представлены SEQ ID NO:844 и 845. Типичные мутированные последовательности Ск, в которых L27 заменен аминокислотой с отрицательным или положительным зарядом, представлены SEQ ID NO:842 и 843.

Положения, отличные от V68 CH1 домена человека и L27 домена Ск человека, могут быть заменены аминокислотами с противоположными зарядами для выработки ионных взаимодействий между аминокислотами в добавление или как альтернатива мутаций в V68 CH1 домена и L27 домена Ск. Такие положения могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего способа, включая случайный мутагенез, анализ кристаллической структуры пары CH1-Ск для идентификации аминокислотных остатков в CH1-Ск и последующая идентификация подходящих положений аминокислотных остатков в CH1-Ск с использованием набора критериев (например, склонность к участию в ионных взаимодействиях, близость к потенциальному партнерскому остатку и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры по данному изобретению содержат только одну пару доменов гетеродимеризации иммуноглобулина. Например, первая цепь полипептидного гетеродимера может включать участок CH1 в качестве домена гетеродимеризации иммуноглобулина, в то время как вторая цепь может включать домен CL (например, Ск или Сл ) в качестве домена гетеродимеризации иммуноглобулина. В альтернативном варианте первая цепь может включать участок CL (например, Ск или Сл ) в качестве домена гетеродимеризации иммуноглобулина, в то время как вторая цепь может включать участок CH1 в качестве домена гетеродимеризации иммуноглобулина. Как это указано в тексте данной заявки, домены гетеродимеризации иммуноглобулина первой и второй цепей способны ассоциировать с образованием полипептидного гетеродимера по данному изобретению.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры по данному изобретению могут включать две пары доменов гетеродимеризации иммуноглобулина. Например, первая цепь полипептидного гетеродимера может включать два участка CH1, в то время как вторая цепь может иметь два домена CL, которые ассоциируют с двумя участками CH1 в первой цепи. В альтернативном варианте первая цепь может включать два домена CL, в то время как вторая цепь может иметь два участка CH1, которые ассоциируют с двумя доменами CL в первой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения первая цепь полипептида включает участок CH1 и домен CL, в то время как вторая цепь полипептида включает домен CL и участок CH1, которые ассоциируют с участком CH1 и доменом CL, соответственно, первой цепи полипептида.

В вариантах осуществления изобретения, в которых полипептидный гетеродимер включает только одну пару гетеродимеризации (т.е. один домен гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи), домен гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи может располагаться на amino-конце во фрагменте участка Fc такой цепи. В альтернативном варианте домен гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи может располагаться на карбоксильном конце фрагмента участка Fc данной цепи.

В вариантах осуществления изобретения, в которых полипептидный гетеродимер включает две пары гетеродимеризации (т.е. два домена гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи), оба домена гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи могут располагаться на amino-конце во фрагменте участка Fc такой цепи. В альтернативном варианте оба домена гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи могут располагаться на карбоксильном конце фрагмента участка Fc данной цепи. В дополнительных вариантах осуществления изобретения один домен гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи может располагаться на amino-конце во фрагменте участка Fc данной цепи, в то время как

второй домен гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи может располагаться на карбоксильном конце фрагмента участка Fc данной цепи. Другими словами, в таких вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc помещен между двумя доменами гетеродимеризации иммуноглобулина в каждой цепи.

#### Фрагмент участка Fc.

Как указано в тексте данной заявки, полипептидные гетеродимеры по данному изобретению включают фрагмент константного домена участка Fc (также обозначаемого здесь как фрагмент участка Fc) в каждой полипептидной цепи. Включение фрагмента участка Fc замедляет клиренс гетеродимеров из кровеносного русла после введения субъекту. Путем мутаций или других изменений, фрагмент участка Fc дополнительно обеспечивает относительно легкую модуляцию эффекторных функций полипептидного гетеродимера (например, АЗКЦ, АЗКФ, КЗЦ, фиксация комплемента и связывание с рецепторами Fc), которая может быть повышена или понижена в зависимости от подвергнутого лечению заболевания, как это известно в науке и описано в тексте данной заявки. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc полипептидных гетеродимеров по данному изобретению будет способен опосредовать одну или более таких эффекторных функций.

Фрагмент участка Fc, присутствующий в одноцепочечных полипептидах, которые образуют часть полипептидных гетеродимеров по данному изобретению, может включать домен CH2, домен CH3, домен CH4 или любую их комбинацию. Например, фрагмент участка Fc может включать домен CH2, домен CH3, оба домена CH2 и CH3, оба домена CH3 и CH4, два домена CH3, домен CH4 или два домена CH4.

Домен CH2, который может образовывать фрагмент участка Fc одноцепочечного полипептидного гетеродимера по данному изобретению, может быть представлен доменом CH2 иммуноглобулина дикого типа или измененным доменом CH2 иммуноглобулина из определенных классов или подклассов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD) и из различных видов (включая человека, мышь, крысу и других млекопитающих).

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH2 представлен доменом CH2 иммуноглобулина человека дикого типа, таким как домены CH2 дикого типа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 или IgD человека с последовательностями SEQ ID NO:115, 199-201 и 195-197 соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH2 представлен участком CH2 IgG1 человека дикого типа с последовательностью SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH2 представлен измененным участком CH2 иммуноглобулина (например, измененным доменом CH2 IgG1 человека), который включает аминокислотную замену в положении аспарагина 297 (например, замена аспарагина аланином). Такая замена аминокислоты снижает или элиминирует гликозилирование в данном сайте и упраздняет эффективное связывание Fc с Fcγ R и C1q. Последовательность измененного домена CH2 IgG1 человека с заменой Асн на Ала в положении 297 представлена SEQ ID NO:324.

В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH2 представлен измененным участком CH2 иммуноглобулина (например, измененным доменом CH2 IgG1 человека), который включает по меньшей мере одну замену или делецию в положениях от 234 до 238. Например, участок CH2 иммуноглобулина может включать замену в положении 234, 235, 236, 237 или 238, положениях 234 и 235, положениях 234 и 236, положениях 234 и 237, положениях 234 и 238, положениях 234-236, положениях 234, 235 и 237, положениях 234, 236 и 238, положениях 234, 235, 237, и 238, положениях 236-238, или любую другую комбинацию двух, трех, четырех или пяти аминокислот в положениях 234-238. В дополнение или в качестве альтернативы измененный участок CH2 может включать одну или более (например, две, три, четыре или пять) делеций аминокислот в положениях 234-238, например, в положении 236 или положении 237, в то время как в других положениях присутствует замена. Указанные выше мутации снижают или элиминируют активность антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или способность связывания рецептора Fc полипептидного гетеродимера, который включает измененный домен CH2. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотные остатки в одном или более положениях 234-238 были заменены одним или более остатками аланина. В дополнительных вариантах осуществления изобретения только один аминокислотный остаток в положении 234-238 удален, в то время как одна или более оставшихся аминокислот в положениях 234-238 могут быть заменены другой аминокислотой (например, аланином или серином).

В других некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH2 представлен измененным участком CH2 иммуноглобулина (например, измененным доменом CH2 IgG1 человека), который включает одну или более замен аминокислот в положениях 253, 310, 318, 320, 322 и 331. Например, участок CH2 иммуноглобулина может включать замену в положении 253, 310, 318, 320, 322 или 331, положениях 318 и 320, положениях 318 и 322, положениях 318, 320 и 322, или любую другую комбинацию двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислот в положениях 253, 310, 318, 320, 322 и 331. Указанные выше мутации снижают или элиминируют комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) полипептидного гетеродимера, который включает измененный домен CH2.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения в добавление к замене аминокислоты в положении 297, измененный участок CH2 (например, измененный домен CH2 IgG1 человека) может до-



полнительно включать одну или более (например, две, три, четыре или пять) дополнительных замен в положениях 234-238. Например, участок CH2 иммуноглобулина может включать замену в положениях 234 и 297, положениях 234, 235 и 297, положениях 234, 236 и 297, положениях 234-236 и 297, положениях 234, 235, 237 и 297, положениях 234, 236, 238 и 297, положениях 234, 235, 237, 238 и 297, положениях 236-238 и 297, или любую другую комбинацию двух, трех, четырех или пяти аминокислот в положениях 234-238 в дополнение к положению 297. В дополнение или в качестве альтернативы, измененный участок CH2 может включать одну или более (например, две, три, четыре или пять) делеций аминокислот в положениях 234-238, например, в положении 236 или положении 237. Дополнительные мутации снижают или элиминируют активность антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или способность связывания рецептора Fc полипептидного гетеродимера, который включает измененный домен CH2. В некоторых вариантах осуществления изобретения аминокислотные остатки в одном или более положениях 234-238 были заменены одним или более остатками аланина. В дополнительных вариантах осуществления изобретения только один аминокислотный остаток в положении 234-238 удален, в то время как одна или более оставшихся аминокислот в положениях 234-238 могут быть заменены другой аминокислотой (например, аланином или серином).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в дополнение к одной или более (например, 2, 3, 4 или 5) заменам аминокислот в положениях 234-238, мутированный участок CH2 (например, измененный домен CH2 IgG1 человека) в белке слияния по данному изобретению может содержать одну или более (например, 2, 3, 4, 5 или 6) дополнительных замен аминокислот (например, замененных аланином) в одном или более положениях, участвующих в фиксации комплемента (например, в положениях I253, H310, E318, K320, K322 или P331). Примеры мутированных участков CH2 иммуноглобулина включают участки CH2 IgG1, IgG2, IgG4 человека и IgG2a мыши с заменами аланином в положениях 234, 235, 237 (если присутствует), 318, 320 и 322. Типичный мутированный участок CH2 иммуноглобулина представлен участком CH2 IGHG2с мыши с заменами аланином в положениях L234, L235, G237, E318, K320 и K322 (SEQ ID NO:314).

В других вариантах осуществления изобретения дополнительно к аминокислотной замене в положении 297 и дополнительной делеции(-ям) или замене(-ам) в положениях 234-238, измененный участок CH2 (например, измененный домен CH2 IgG1 человека) может дополнительно включать одну или более (например, две, три, четыре, пять или шесть) дополнительных замен в положениях 253, 310, 318, 320, 322 и 331. Например, участок CH2 иммуноглобулина может включать (1) замену в положении 297, (2) одну или более замен или делеций или их комбинацию в положениях 234-238, и одну или более (например, 2, 3, 4, 5 или 6) аминокислотных замен в положениях I253, H310, E318, K320, K322 и P331, таких как одна, две, три замены в положениях E318, K320 и K322. Аминокислоты в указанных выше положениях могут быть заменены аланином или серином.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок CH2 иммуноглобулина полипептида включает: (i) замену аминокислоты аспарагин в положении 297 и одной аминокислоты в положении 234, 235, 236 или 237; (ii) замену аминокислоты аспарагин в положении 297 и двух аминокислот в положениях 234-237; (iii) замену аминокислоты аспарагин в положении 297 и аминокислот в трех положениях 234-237; (iv) замену аминокислоты аспарагин в положении 297, аминокислот в положениях 234, 235 и 237, и делецию аминокислоты в положении 236; (v) замену аминокислот в трех положениях 234-237 и аминокислот в положениях 318, 320 и 322; или (vi) замену аминокислот в трех положениях 234-237, делецию аминокислоты в положении 236, и замены аминокислот в положениях 318, 320 и 322.

Типичные измененные участки CH2 иммуноглобулина с заменами аминокислоты аспарагин в положении 297 включают: участок CH2 IgG1 человека с заменами аланина в положениях L234, L235, G237 и N297 и делецию в положении G236 (SEQ ID NO:325), участок CH2 IgG2 человека с заменами аланина в положениях V234, G236 и N297 (SEQ ID NO:326), участок CH2 IgG4 человека с заменами аланина в положениях F234, L235, G237 и N297 и делецию G236 (SEQ ID NO:322), участок CH2 IgG4 человека с заменами аланина в положениях F234 и N297 (SEQ ID NO:343), участок CH2 IgG4 человека с заменами аланина в положениях L235 и N297 (SEQ ID NO:344), участок CH2 IgG4 человека с заменами аланина в положениях G236 и N297 (SEQ ID NO:345), и участок CH2 IgG4 человека с заменами аланина в положениях G237 и N297 (SEQ ID NO:346).

В некоторых вариантах осуществления изобретения в дополнение к описанным выше заменам аминокислот измененный участок CH2 (например, измененный домен CH2 IgG1 человека) может содержать одну или более дополнительных замен аминокислот в одном или более положениях, кроме указанных выше положений. Такие замены аминокислот могут быть представлены заменами консервативных или неконсервативных аминокислот. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения P233 может быть изменен на E233 в измененном участке CH2 IgG2 (см., например, SEQ ID NO:326). Кроме того или в качестве альтернативы, в некоторых вариантах осуществления изобретения измененный участок CH2 может содержать одну или более вставок, делеций аминокислот, или оба явления. Вставка(-и), делеция(-и) или замена(-ы) могут быть в любом участке CH2 иммуноглобулина, таком как N- или C-конец участка CH2 иммуноглобулина дикого типа, полученный в результате соединения участка CH2 с другим участком (например, связывающим доменом или доменом гетеродимеризации иммуноглобулина).

посредством шарнирного участка.

В некоторых вариантах осуществления изобретения измененный участок CH2 в полипептидном гетеродимере по данному изобретению включает или представлен последовательностью, которая идентична по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% участку CH2 иммуноглобулина дикого типа, такому как участок CH2 IgG1, IgG2 или IgG4 человека дикого типа или IgG2a мыши дикого типа (например, IGHG2c).

Измененный участок CH2 иммуноглобулина в полипептидном гетеродимере по данному изобретению может быть получен из участка CH2 различных изотипов иммуноглобулинов, таких как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2 и IgD, из различных видов (включая человека, мышь, крысу и других млекопитающих). В некоторых вариантах осуществления изобретения измененный участок CH2 иммуноглобулина в белке слияния по данному изобретению может быть получен из участка CH2 IgG1, IgG2 или IgG4 человека или IgG2a мыши (например, IGHG2c) с последовательностями SEQ ID NO:115, 199, 201 и 320.

В некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен CH2 представлен доменом CH2 IgG1 человека с заменой на аланин в положениях 235, 318, 320 и 322 (т.е. доменом CH2 IgG1 человека с заменами L235A, E318A, K320A и K322A) (SEQ ID NO:595), и в некоторых случаях с мутацией N297 (например, в аланин). В других некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен CH2 представлен доменом CH2 IgG1 человека с заменами на аланин в положениях 234, 235, 237, 318, 320 и 322 (т.е. доменом CH2 IgG1 человека с заменами L234A, L235A, G237A, E318A, K320A и K322A) (SEQ ID NO:596), и в некоторых случаях с мутацией N297 (например, в аланин).

В некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен CH2 представлен измененным доменом CH2 IgG1 человека с мутациями, известными в науке, которые повышают иммунологическую активность, такую как АЗКЦ, АЗКФ, КЗЦ, фиксацию комплемента, связывание рецептора Fc или любую их комбинацию.

Домен CH3, который может образовывать фрагмент участка Fc одноцепочечного полипептида гетеродимера по данному изобретению, может быть представлен доменом CH3 иммуноглобулина дикого типа или измененным доменом CH3 иммуноглобулина из определенных классов или подклассов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgM) и из различных видов (включая человека, мышь, крысу и других млекопитающих). В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 представлен доменом CH3 иммуноглобулина человека дикого типа, таким как домены CH3 дикого типа IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM человека с последовательностями SEQ ID NO:116, 208-210, 204-207 и 212 соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 представлен участком CH3 IgG1 дикого типа с последовательностью SEQ ID NO:116. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH3 представлен измененным доменом CH3 иммуноглобулина человека, таким как измененный домен CH3 на основе или полученный из домена CH3 дикого типа антител к IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM человека. Например, измененный домен CH3 может быть представлен доменом CH3 IgG1 человека с одной или двумя мутациями в положениях H433 и N434 (положения пронумерованы в соответствии с нумерацией ЕС). Мутации в таких положениях могут участвовать в фиксации комплемента. В других некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен CH3 может быть представлен доменом CH3 IgG1 человека, но иметь одну или две замены аминокислот в положении F405 или Y407. Аминокислоты в таких положениях участвуют во взаимодействии с другим доменом CH3. В некоторых вариантах осуществления изобретения измененный домен CH3 может быть представлен доменом CH3 IgG1 человека с последним удаленным лизином. Последовательность такого измененного домена CH3 представлена SEQ ID NO:761.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает пару CH3, которая включает так называемые мутации "выступов во впадину" (см. Marvin and Zhu, *Acta Pharmacologica Sinica* 26:649-58, 2005; Ridgway et al., *Protein Engineering* 9:617-21, 1996). Более специфически, мутации могут быть введены в каждый из двух доменов CH3, таким образом, необходима пространственная комплементарность для ассоциации облигатов CH3/CH3 двух таких доменов CH3 для образования пары друг с другом. Например, домен CH3 в одном одноцепочечном полипептиде полипептидного гетеродимера может содержать мутацию T366W (мутацию "выступ", в результате которой небольшую аминокислоту заменяется на большую аминокислоту), и домен CH3 в другом одноцепочечном полипептиде полипептидного гетеродимера может содержать мутацию Y407A (мутацию "впадина", в результате которой более крупная аминокислота заменяется на более мелкую). Другие типичные мутации выступов во впадину включают (1) мутацию T366Y в одном домене CH3 и Y407T в другом домене CH3, и (2) мутацию T366W в одном домене CH3 и мутации T366S, L368A и Y407V в другом домене CH3.

Домен CH4, который может образовывать фрагмент участка Fc одноцепочечного полипептида гетеродимера по данному изобретению, может быть представлен доменом CH4 иммуноглобулина дикого типа или измененным доменом CH4 иммуноглобулина из молекул IgE или IgM. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH4 представлен доменом CH4 иммуноглобулина человека дикого

типа, таким как домены CH4 дикого типа молекул IgE и IgM человека с SEQ ID NO:213 и 214 соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен CH4 представлен измененным доменом CH4 иммуноглобулина человека, таким как измененный домен CH4 на основе или полученный из домена CH4 молекул IgE или IgM человека, которые содержат мутации, повышающие или снижающие иммунологическую активность, ассоциированную с участком Fc IgE или IgM.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент константного домена участка Fc в гетеродимерах по данному изобретению включает комбинацию доменов CH2, CH3 или CH4 (т.е. более одного константного субдомена, выбираемого из CH2, CH3 и CH4). Например, фрагмент участка Fc может включать домены CH2 и CH3 или домены CH3 и CH4. В других некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc может включать два домена CH3 и не включать домены CH2 или CH4 (т.е. только два или более CH3). Множественные константные субдомены, которые образуют фрагмент участка Fc, могут быть основаны или получены из одной и той же молекулы иммуноглобулина, или одного и того же класса или подкласса молекул иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc представлен IgG CH2CH3 (например, IgG1 CH2CH3, IgG2 CH2CH3 и IgG4 CH2CH3) и может быть представлен (например, IgG1, IgG2 и IgG4 человека) CH2CH3 человека. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc включает (1) домены CH2 и CH3 IgG1 человека дикого типа, (2) CH2 IgG1 человека с заменой N297A (т.е. CH2(N297A)) и CH3 IgG1 человека дикого типа, или (3) IgG1 CH2(N297A) человека и измененный CH3 IgG1 человека с удаленным последним лизином.

В альтернативном варианте множественные константные субдомены могут быть основаны или получены из разных молекул иммуноглобулинов или разных классов или подклассов молекул иммуноглобулинов. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc включает домен CH3 IgM человека и домен CH3 IgG1 человека. Множественные константные субдомены, которые образуют фрагмент участка Fc, могут быть напрямую соединены или могут быть соединены друг с другом посредством одной или нескольких (например, примерно 2-10) аминокислот.

Типичные фрагменты участка Fc имеют последовательность SEQ ID NO:305-309, 321, 323, 341, 342 и 762.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагменты участка Fc обоих одноцепочечных полипептидов полипептидного гетеродимера идентичны друг другу. В других некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc одного одноцепочечного полипептида полипептидного гетеродимера отличается от фрагмента участка Fc другого одноцепочечного полипептида гетеродимера. Например, фрагмент участка Fc может включать домен CH3 с мутацией "выступ", в то время как другой фрагмент участка Fc может включать домен CH3 с мутацией "впадина".

#### Шарнирный участок.

Шарнирный участок, содержащийся в одноцепочечном полипептиде полипептидного гетеродимера по данному изобретению, может быть расположен (а) непосредственно сразу в направлении amino-конца относительно фрагмента участка Fc (например, в зависимости от изотипа, в направлении amino-конца домена CH2, в то время как фрагмент участка Fc представлен CH2CH3, или в направлении amino-конца домена CH3, в то время как фрагмент участка Fc представлен CH3CH4), (б) между и соединяет связывающий домен (например, scFv) и домен гетеродимеризации иммуноглобулина, (в) между и соединяет домен гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагмент участка Fc (например, если фрагмент участка Fc представлен CH2CH3 или CH3CH4, в зависимости от изотипа или изотипов), (г) между и соединяет фрагмент участка Fc и связывающий домен, (д) на amino-конце одноцепочечного полипептида, или (е) на карбоксил-конце одноцепочечного полипептида. Одноцепочечный полипептид, включающий шарнирный участок, как это описано в тексте данной заявки, будет способен ассоциировать с другим одноцепочечным полипептидом слияния с образованием описанного здесь полипептидного гетеродимера, и образованный полипептидный гетеродимер будет иметь связывающий домен, сохраняющий свою специфичность относительно мишени или аффинность связывания с отдельной мишенью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок представлен одноцепочечным полипептидом, который образует полипептидный гетеродимер с другим одноцепочечным полипептидом, и может быть представлен шарнирным участком иммуноглобулина, таким как шарнирный участок иммуноглобулина дикого типа или измененный шарнирный участок иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок представлен шарнирным участком иммуноглобулина человека дикого типа (например, шарнирными участками иммуноглобулина человека с SEQ ID NO:215-221). В других некоторых вариантах осуществления изобретения на amino-или карбоксильный конец шарнирного участка иммуноглобулина дикого типа в качестве части молекулы белка слияния может быть добавлен один или более аминокислотных остатков. Например, дополнительные соединяющие аминокислотные остатки на аминоконце могут быть представлены "RT", "RSS", "TG", или "T", или на карбоксильном конце могут быть представлены "SG", или шарнирный участок может иметь делецию в комбинации со вставкой, такой как ΔP с "SG", добавленным на карбоксильном конце.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок представлен измененным шарнирным участком иммуноглобулина, в котором один или более остатков цистеина в шарнирном уча-

стке иммуноглобулина дикого типа заменены одним или более остатками аминокислот (например, серином или аланином). Например, шарнирный участок может быть представлен измененным шарнирным участком иммуноглобулина на основе или полученном из шарнирного участка IgG1 человека дикого типа с SEQ ID NO:667, который от аминокислотного до карбокси-конца включает верхний шарнирный участок (EPKSCDKTHT, SEQ ID NO:227) и базовый шарнирный участок (CPPCP, SEQ ID NO:228). Типичные измененные шарнирные участки иммуноглобулина включают шарнирный участок иммуноглобулина IgG1 человека, имеющий один, два или три остатка цистеина, присутствующих в шарнирном участке IgG1 человека дикого типа, замененных одним, двумя или тремя остатками других аминокислот (например, серином или аланином). Измененный шарнирный участок иммуноглобулина может дополнительно включать пролин, замененный другой аминокислотой (например, серином или аланином). Например, описанный выше измененный шарнирный участок IgG1 человека может дополнительно включать пролин, расположенный в направлении карбокси-конца относительно трех цистеинов шарнирного участка IgG1 человека дикого типа, замененный остатком другой аминокислоты (например, серином, аланином). В одном варианте осуществления изобретения пролин основного шарнирного участка не заменен. Типичные измененные шарнирные участки иммуноглобулина имеют последовательность SEQ ID NO:229-240, 255, 664-677, и 748-759. Пример измененного шарнирного участка IgG1 представлен измененным шарнирным участком IgG1 человека, в котором первый цистеин заменен на серин. Последовательность такого измененного шарнирного участка IgG1 представлена SEQ ID NO:664 и обозначена как "шарнирный участок IgG1 SCC-P человека" или "шарнирный участок SCC-P". В некоторых вариантах осуществления изобретения на аминокислотный или карбоксильный конец мутированного шарнирного участка иммуноглобулина дикого типа в качестве части молекулы белка слияния может быть добавлен один или более аминокислотных остатков (например, "RT", "RSS" или "T").

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок полипептида включает или представлен последовательностью, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентична шарнирному участку иммуноглобулина дикого типа, такому как шарнирный участок IgG1 человека дикого типа, шарнирный участок IgG2 человека дикого типа или шарнирный участок IgG4 человека дикого типа.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения шарнирный участок, присутствующий в одноцепочечном полипептиде, который образует полипептидный гетеродимер с другим одноцепочечным полипептидом, может быть представлен шарнирным участком, который не основан или не был получен из шарнирного участка иммуноглобулина (т.е. не является шарнирным участком иммуноглобулина дикого типа или измененным шарнирным участком иммуноглобулина). Такие типы не основанных на иммуноглобулине шарнирных участков могут использоваться на или возле карбоксильного конца (например, расположены в направлении карбокси-конца относительно фрагментов участков Fc) одноцепочечных полипептидов, образующих полипептидные гетеродимеры. Примеры таких шарнирных участков включают пептиды от примерно пяти до примерно 150 аминокислот междоменного или "стволового" участка С-лектина II типа или молекул CD, например пептиды от примерно восьми до 25 аминокислот и пептиды от примерно семи до 18 аминокислот, и их производные.

Термин "междоменный или "стволовой" участок" С-лектина II типа или молекулы CD обозначает участок внеклеточного домена С-лектина II типа или молекулы CD, расположенный между лектин-подобным доменом С типа (CTLD; например, подобно CTLD рецепторам клетки естественного киллера) и трансмембранным доменом. Например, в молекуле CD94 человека (GenBank Accession No. AAC50291.1, PRI November 30, 1995) внеклеточный домен соответствует аминокислотным остаткам 34-179, в то время как CTLD соответствует аминокислотным остаткам 61-176. В соответствии с этим междоменный или "стволовой" участок молекулы CD94 человека включает аминокислотные остатки 34-60, которые находятся между мембраной и CTLD (см. Boyington et al., Immunity 10:75, 1999; для описаний других "стволовых" участков, см. также Beavil et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:753, 1992; и Figdor et al., Nature Rev. Immunol. 2:77, 2002). Такие молекулы С-лектина II типа или CD также могут иметь от шести до 10 соединяющих аминокислот между "стволовым" участком и трансмембранным участком или CTLD. В другом примере белок человека NKG2A с 233 аминокислотами (GenBank Accession No. P26715.1, PRI June 15, 2010) имеет трансмембранный домен, варьирующий с количеством аминокислот 71-93, и внеклеточный домен, варьирующий с количеством аминокислот 94-233. CTLD состоит из аминокислот 119-231, и "стволовой" участок включает аминокислоты 99-116, которые фланкированы соединениями пяти и двух аминокислот. Другие молекулы С-лектина II типа или CD, также как их внеклеточные лиганд-связывающие домены, междоменные или "стволовые" участки и CTLD хорошо известны в науке (см., например, GenBank Accession No. NP\_001993.2; AAN07037.1, PRI July 15, 2006; NP\_001773.1, PRI June 20, 2010; AAL65234.1, PRI January 17, 2002 и CAA04925.1, PRI November 14, 2006, где указаны последовательности CD23, CD69, CD72, NKG2A и NKG2D человека и их описание соответственно).

"Производное" междоменного или "стволового" участка, или его фрагмента, молекулы С-лектина II типа или CD включает от примерно восьми до примерно 150 аминокислот в последовательности, в которой одна, две или три аминокислоты "стволового" участка молекулы С-лектина II типа или CD дикого типа имеют делецию, вставку, замену или любую другую их комбинацию, например одно или более изменений представлены заменами или одна или более мутаций включают только одну делецию. В дополнительных вариантах осуществления изобретения производное междоменного или "стволового" участка более устойчиво к протеолитическому расщеплению в сравнении с последовательностью междоменного или "стволового" участка дикого типа, такой как последовательность из от примерно восьми до примерно 20 аминокислот NKG2A, NKG2D, CD23, CD64, CD72 или CD94.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирные участки междоменного или "стволового" участка имеют от семи до 18 аминокислот и могут образовывать  $\alpha$ -спиральную структуру. В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирные участки междоменного или "стволового" участка содержат 0, 1, 2, 3 или 4 цистеина. Типичные шарнирные участки междоменного или "стволового" участка представлены пептидными фрагментами междоменного или "стволового" участков, такими как фрагменты от десяти до 150 аминокислот из "стволовых" участков CD69, CD72, CD94, NKG2A и NKG2D с последовательностью SEQ ID NO:241-244, 716 и 601. Дополнительные типичные шарнирные участки междоменного или "стволового" участка включают участки с последовательностью SEQ ID NO:78, 734-737, 742-747 и 766-790.

Альтернативные шарнирные участки, которые могут использоваться в одноцепочечных полипептидах полипептидных гетеродимеров, получают из участков рецепторов клеточной поверхности (междоменные участки), которые соединяют V-образные домены или C-образные домены иммуноглобулина. Участки между V-образными доменами Ig, в которых рецептор клеточной поверхности содержит множество V-образных доменов Ig в тандеме и между C-образными доменами Ig, в которых рецептор клеточной поверхности содержит множественные тандемные участки C-образных доменов Ig, также предусмотрены в качестве шарнирных участков, используемых в одноцепочечных полипептидах полипептидных гетеродимеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности шарнирных участков междоменных участков рецептора клеточной поверхности могут дополнительно содержать встречающийся в природе или дополненный мотив, такой как последовательность основного шарнирного участка IgG, который содержит одну или более дисульфидных связей для стабилизации образования полипептидного гетеродимера. Примеры шарнирных участков включают междоменные участки между V-образными участками Ig и C-образными участками Ig CD2, CD4, CD22, CD33, CD48, CD58, CD66, CD80, CD86, CD150, CD166 и CD244.

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности шарнирных участков имеют от примерно 5 до 150 аминокислот, от 5 до 10 аминокислот, от 10 до 20 аминокислот, от 20 до 30 аминокислот, от 30 до 40 аминокислот, от 40 до 50 аминокислот, от 50 до 60 аминокислот, от 5 до 60 аминокислот, от 5 до 40 аминокислот, от 8 до 20 аминокислот или от 10 до 15 аминокислот. Шарнирный участок может быть первоначально гибким, но также может обеспечивать более жесткие характеристики или может содержать первично  $\alpha$ -спиральную структуру с минимальной  $\beta$ -складчатой структурой. Длина или последовательности шарнирных участков могут влиять на аффинность связывания связывающих доменов, к которым присоединяются шарнирные участки прямым или непрямым образом (посредством другого участка или домена, такого как домен гетеродимеризации иммуноглобулина), а также на одну или более видов активности фрагмента участка Fc, к которому присоединяются шарнирные участки прямым или непрямым образом (см. примеры 9 и 10).

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности шарнирных участков устойчивы в плазме и сыворотке и устойчивы к протеолитическому расщеплению. Первый лизин в верхнем шарнирном участке IgG1 может быть мутирован для сведения к минимуму протеолитического расщепления, например, лизин может быть заменен метионином, треонином, аланином или глицином, или удален (см., например, SEQ ID NO:379-434, которые могут включать соединяющие аминокислоты на аминоконце, такие как RT).

В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательности шарнирных участков могут содержать встречающийся в природе или добавленный мотив, такой как структура основного шарнирного участка иммуноглобулина CPPCP (SEQ ID NO:228), которая характеризуется способностью образовывать дисульфидную связь или множество дисульфидных связей для стабилизации карбоксильного конца молекулы. В других вариантах осуществления изобретения последовательности шарнирных участков могут содержать один или более сайтов гликозилирования.

Типичные шарнирные участки, включая измененные шарнирные участки иммуноглобулина, имеют последовательность SEQ ID NO:379-434, 618-749, и 763-791.

В некоторых вариантах осуществления изобретения одноцепочечный полипептид полипептидного гетеродимера по данному изобретению включает более одного шарнирного участка. Например, одноцепочечный полипептид, имеющий два связывающих домена, один из которых находится на аминоконце и другой находится на карбоксильном конце, может иметь два шарнирных участка. Один шарнирный уча-

сток может быть прямым или непрямым образом (например, посредством домена гетеродимеризации иммуноглобулина) соединен со связывающим доменом в месте или около аминоконца, и другой шарнирный участок может быть присоединен (например, прямым образом) к другому связывающему домену в месте или около карбоксильного конца. В некоторых вариантах осуществления изобретения, даже если одноцепочечный полипептид имеет только один связывающий домен, он может включать более одного шарнирного участка, например, на amino- или карбоксильном конце. Такой шарнирный участок может взаимодействовать с соответствующим шарнирным участком в другой цепи гетеродимера с образованием одной или более межцепочечных дисульфидных связей для облегчения или повышения гетеродимеризации двух цепей. Шарнирный участок (H-I) SCP-I полипептидного гетеродимера "соответствует" шарнирному участку (H-II) SCP-II гетеродимера, при этом H-I и H-II расположены на одном и том же конце фрагмента участка Fc соответствующего одноцепочечного полипептида. Например, полипептидный гетеродимер может включать следующие два одноцепочечных полипептида: Первую цепь полипептида от amino- до карбоксильного конца, включающую первый связывающий домен, CH1, шарнирный участок, CH2 и CH3, и вторую цепь полипептида от amino- до карбоксильного конца, которая включает СК, первый шарнирный участок, CH2, CH3, второй шарнирный участок и второй связывающий домен. Шарнирный участок в первой цепи будет рассматриваться как "соответствующий" первому шарнирному участку второй цепи при сравнении аминоконца и фрагментов участка Fc, к которым он присоединяется.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых одноцепочечный полипептид полипептидного гетеродимера включает связывающий домен на или возле карбоксильного конца, шарнирный участок может присутствовать для соединения связывающего домена с другим участком одноцепочечного полипептида (например, фрагмента участка Fc или домена гетеродимеризации иммуноглобулина). В одном варианте осуществления изобретения такой шарнирный участок не имеет происхождения иммуноглобулина (т.е. шарнирный участок не основан или не получен из шарнирного участка иммуноглобулина дикого типа) и может быть представлен "стволовым" участком С-лектина II или молекулы CD, междоменным участком, который соединяет V-образные или С-образные домены Ig рецептора клеточной поверхности, или производным, или их функциональным вариантом. Типичные карбокси-концевые шарнирные участки, иногда обозначаемые как "задние" шарнирные участки, включают участки с последовательностью SEQ ID NO:78, 734-737, 742-747 и 766-790.

В некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок одноцепочечного полипептида полипептидного гетеродимера идентичен соответствующему шарнирному участку другой одноцепочечной полипептидной цепи гетеродимера. В других некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок одной цепи отличается от такового участка второй цепи (по своей длине или последовательности). Разные участки в разных цепях обеспечивают различную манипуляцию аффинностью связывания связывающих доменов, к которым присоединяются шарнирные участки, таким образом, гетеродимер способен преимущественно связываться с мишенью одного связывающего домена через мишень второго связывающего домена. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер имеет связывающий домен CD3 или TCR в одной цепи и связывающий домен относительно опухолевого антигена в другой цепи. Наличие двух разных шарнирных участков в двух цепях может обеспечивать связывание гетеродимера вначале с опухолевым антигеном, а затем с молекулой CD3 или TCR. Таким образом, гетеродимер может задействовать CD3<sup>+</sup> Т-клетки для опухолевых клеток, несущих опухолевый антиген, который, в свою очередь, может повредить или уничтожить опухолевые клетки.

Другие компоненты или модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения одноцепочечный полипептид, образующий гетеродимер с другим одноцепочечным полипептидом, может содержать один или более дополнительных доменов или участков. Такие дополнительные участки могут быть представлены лидерной последовательностью (также обозначаемой "сигнальным пептидом") на аминоконце для секреции экспрессируемого одноцепочечного полипептида. Типичные лидерные пептиды по данному изобретению включают естественные лидерные последовательности или другие последовательности, такие как SEQ ID NO:110 и 111.

Дополнительные участки также могут быть представлены последовательностями на карбоксильном конце для идентификации или очистки одноцепочечных полипептидов (например, теги антигенных детерминант для определения или очистки, такие как тег гистидина, биотин, антигенная детерминанта FLAG® или любая другая их комбинация).

Дополнительные необязательные участки могут быть представлены дополнительными аминокислотными остатками (обозначаемыми как "соединяющие аминокислоты" или "соединяющие аминокислотные остатки"), имеющими в длину от 1 до примерно 10 аминокислот (например, от примерно 2 до 5 аминокислот), которые могут возникнуть в результате использования специфических систем экспрессии или построения вектора для одноцепочечных полипептидов по данному изобретению. Такие дополнительные аминокислотные остатки (например, одна, две, три, четыре или пять дополнительных аминокислот) могут присутствовать на amino- или карбоксильном конце или между различными участками или доменами одноцепочечного полипептида, такими как между связывающим доменом и доменом гетеродимеризации иммуноглобулина, между доменом гетеродимеризации иммуноглобулина и шарнирным

участком, между шарнирным участком и фрагментом участка Fc, между доменами фрагмента участка Fc (например, между доменами CH2 и CH3 или между двумя доменами CH3), между связывающим доменом и шарнирным участком, между фрагментом участка Fc и доменом гетеродимеризации иммуноглобулина, или между вариабельным доменом и линкером. Типичные соединяющие аминокислоты на аминоконце, подходящие к шарнирному участку, включают RDQ (SEQ ID NO:598), RT, SS, SASS (SEQ ID NO:599) и SSS (SEQ ID NO:600). Типичные соединяющие аминокислоты на карбоксильном конце относительно шарнирного участка включают аминокислоты SG. Дополнительные типичные соединяющие аминокислоты включают SR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения соединяющие аминокислоты присутствуют между фрагментом участка Fc, который включает домены CH2 и CH3, и доменом гетеродимеризации иммуноглобулина (CH1 или CL). Такие соединяющие аминокислоты также обозначаются как "линкер между CH3 и CH1 или CL", если они присутствуют между С-концом CH3 и N-концом CH1 или CL. Такой линкер может иметь в длину примерно 2-12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления изобретения фрагмент участка Fc включает домены CH2 и CH3 IgG1 человека, в которых остаток лизина С-конца CH3 IgG1 человека удален. Типичные линкеры между CH3 и CH1 имеют последовательности SEQ ID NO:847-849. Типичные линкеры между CH3 и Ск имеют последовательности SEQ ID NO:850-852 (при этом аргинин на карбоксильном конце в линкерах может альтернативно обозначаться как первый аргинин Ск). В некоторых вариантах осуществления изобретения присутствие таких линкеров или пар линкеров (например, SEQ ID NO:847 для линкера CH3-CH1 в одном одноцепочечном полипептиде гетеродимера и SEQ ID NO:850 для линкера CH3-Ск в другом одноцепочечном полипептиде гетеродимера; SEQ ID NO:848 для линкера CH3-CH1 и SEQ ID NO:851 для линкера CH3-Ск; и SEQ ID NO:849 для линкера CH3-CH1 и SEQ ID NO:852 для линкера CH3-Ск) улучшает выработку гетеродимера в сравнении с присутствием эталонного линкера с последовательностью SEQ ID NO:846 (в которой последний лизин CH3 включен как часть линкера) в обоих одноцепочечных полипептидах гетеродимера.

В некоторых вариантах осуществления изобретения участок Fc иммуноглобулина (например, участки CH2, CH3 и/или CH4) полипептидного гетеродимера по данному изобретению может иметь измененную схему гликозилирования относительно эталонной последовательности иммуноглобулина. Например, для изменения одного или более отдельных остатков аминокислот, образующих сайт гликозилирования, может использоваться любая из целого ряда способов генной инженерии, такой как N297 домена CH2 (нумерация по EC) (см. Co et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30:1361; Jacquemon et al. (2006) *J. Thromb. Haemost.* 4:1047; Schuster et al. (2005) *Cancer Res.* 65:7934; Warnock et al. (2005) *Biotechnol. Bioeng.* 92:831). В альтернативном варианте клетки-хозяева, вырабатывающие полипептидные гетеродимеры по данному изобретению, могут быть получены рекомбинантным образом для получения измененной схемы гликозилирования. Например, один известный в науке способ предусматривает изменение гликозилирования в форме разделенных пополам, нефукозилированных вариантов, которые повышают АЗКЦ. Варианты получают в ходе экспрессии в клетке-хозяине, содержащей олигосахарид-модифицирующий фермент. В альтернативном варианте способ POTELLIGENT®, разработанный BioWa/Kyowa Hakko, предусматривает снижение содержания глюкозы в гликозилированных молекулах по данному изобретению.

В одном известном способе предусмотрено использование СНО клетки-хозяина для рекомбинантной выработки иммуноглобулинов с последующим изменением схемы гликозилирования участка Fc иммуноглобулина посредством выработки ГДФ-глюкозы.

В альтернативном варианте для изменения схемы гликозилирования полипептидных гетеродимеров по данному изобретению используют химические способы. Например, целый ряд ингибиторов гликозидазы и/или маннозидазы обеспечивают один или более желаемых эффектов повышения активности АЗКЦ, повышения связывания рецептора Fc и изменения схемы гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки, экспрессирующие полипептидные гетеродимеры по данному изобретению, выращивают в питательной среде, содержащей модификатор углеводов в концентрации, которая повышает АЗКЦ молекул иммуноглобулотеина, вырабатываемого указанной клеткой-хозяином, при этом указанный модификатор углеводов находится в концентрации менее чем 800 мкМ. В одном варианте осуществления изобретения клетки, экспрессирующие такие полипептидные гетеродимеры, выращивают в питательной среде, содержащей кастаноспермин или кифуненсин, например кастаноспермин в концентрации 100-800 мкМ, такой как 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 мкМ. Способы изменения гликозилирования с использованием модификатора углеводов, такого как кастаноспермин, описаны в патенте США No. 7846434 или публикации PCT No. WO 2008/052030.

Структурные схемы и типичные гетеродимеры.

Для образования полипептидного гетеродимера по данному изобретению разработаны два одноцепочечных полипептида, таким образом, домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида соответствующим образом присоединен и взаимодействует с доменом гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетеродимер может включать вторую пару доменов гетеродимеризации иммуноглобулина для облегчения или повышения гетеродимеризации обеих цепей. В некоторых вариантах осуществ-

ления изобретения, кроме взаимодействия между двумя доменами гетеродимеризации иммуноглобулина, фрагмент участка Fc (например, домен CH3) в первой цепи может взаимодействовать с фрагментом Fc во второй цепи для повышения гетеродимеризации (например, посредством взаимодействия между двумя доменами CH3 дикого типа или между парой доменов CH3 с мутациями "выступ во впадину"). Более того, в некоторых вариантах осуществления изобретения шарнирный участок в первой цепи (например, измененный шарнирный участок IgG1 человека с двумя остатками цистеина с последовательностью SEQ ID NO:664) может взаимодействовать с шарнирным участком во второй цепи (например, таким же самым измененным шарнирным участком IgG1 человека с последовательностью SEQ ID NO:664) с образованием, например, дисульфидных связей, которые могут дополнительно усиливать взаимодействие между первым и вторым одноцепочечными полипептидами с образованием полипептидного гетеродимера по данному изобретению. Более того, в некоторых вариантах осуществления изобретения первая и вторая цепь могут включать вторую пару шарнирных участков (например, на карбоксильном конце обеих цепей) для дополнительного усиления взаимодействий между двумя цепями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер по данному изобретению включает два связывающих домена (BD1 и BD2), при этом связывающие домены связывают две различные молекулы-мишени. В некоторых вариантах осуществления изобретения два связывающих домена (BD1 и BD2) находятся на SCP-I с доменом гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-I) и фрагментом участка Fc (FRP-1), расположенным между BD1 и BD2. В других некоторых вариантах осуществления изобретения первый связывающий домен (BD1) находится на SCP-I и второй связывающий домен (BD2) находится на SCP-II. В некоторых вариантах осуществления изобретения BD1 и BD2 находятся на аминоконце фрагмента участка Fc SCP-I и SCP-II соответственно. В других некоторых вариантах осуществления изобретения BD1 расположен в направлении amino-конца фрагмента участка Fc SCP-I и BD2 расположен на карбоксильном конце относительно фрагмента участка Fc SCP-II. В других некоторых вариантах осуществления изобретения BD1 расположен в направлении карбокси-конца относительно фрагмента участка Fc SCP-I и BD2 расположен в направлении amino-конца фрагмента участка Fc SCP-II. В других некоторых вариантах осуществления изобретения BD1 и BD2 находятся на карбоксильном конце фрагмента участка Fc SCP-I и SCP-II соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает три связывающих домена (BD1, BD2 и BD3), при этом связывающие домены связывают три различные молекулы-мишени. Например, BD1, BD2 и BD3 связывают различные мишени, или BD1 и BD2 связывают первую мишень, в то время как BD3 связывает вторую мишень, или BD1 и BD3 связывают первую мишень, в то время как BD2 связывает вторую мишень, или BD2 и BD3 связывают первую мишень, в то время как BD1 связывает вторую мишень. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагмент участка Fc расположены между BD1 и BD2 на SCP-I, и BD3 расположен в направлении amino-конца фрагмента участка Fc SCP-II. В дополнительных вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагмент участка Fc расположены между BD1 и BD2 на SCP-II, и BD3 расположен в направлении карбокси-конца относительно фрагмента участка Fc SCP-I.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает четыре связывающих домена (BD1, BD2, BD3 и BD4), при этом связывающие домены связывают от двух до четырех различных молекул-мишеней. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагмент участка Fc SCP-I расположены между BD1 и BD2, и домен гетеродимеризации иммуноглобулина и фрагмент участка Fc SCP-II расположены между BD3 и BD4.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает пять связывающих доменов (BD1, BD2, BD3, BD4 и BD5), при этом связывающие домены связывают от двух до четырех различных молекул-мишеней. В некоторых вариантах осуществления изобретения SCP-I включает три связывающих домена (BD1, BD2 и BD3), и SCP-II включает два связывающих домена (BD4 и BD5). В дополнительных вариантах осуществления изобретения BD1 и BD2 могут быть, например, соединены в tandem друг с другом (непосредственным образом или посредством пептидного линкера с примерно от двух до восьми аминокислот) на amino- (или карбоксильном) конце SCP-I с BD3, расположенном на карбоксильном (или amino-) конце SCP-I или SCP-II, при этом BD4 и BD5 находятся на SCP-II, если BD3 находится на SCP-I, или BD4 или BD5 находятся на SCP-I, если BD3 находится на SCP-II.

В еще одних вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает шесть связывающих доменов (BD1-BD6). В некоторых вариантах осуществления изобретения SCP-I и SCP-II включает три связывающих домена (например, BD1-BD3 на SCP-I и BD4-BD6 на SCP-II). В таких вариантах осуществления изобретения, например, BD1 и BD2 могут быть соединены в tandem и расположены на amino- (или карбоксильном) конце SCP-I, и BD3 может быть расположен на карбоксильном (или amino-) конце SCP-I. Подобным образом, BD4 и BD5 могут быть соединены в tandem и расположены на amino- (или карбоксильном) конце SCP-II, и BD6 может быть расположен на карбоксильном (или amino-) конце SCP-II. В других некоторых вариантах осуществления изобретения первый одноцепочечный полипептид (SCP-I) включает четыре связывающих домена (BD1-BD4), и второй одноцепочечный полипептид (SCP-II) включает два связывающих домена (BD5 и BD6). В таких вариантах осуществления изобретения BD1 и BD2



могут быть соединены в тандем и расположены на или возле аминоконца SCP-I, BD3 и BD4 могут быть соединены в тандем и расположены на или возле карбоксильного конца SCP-I, и BD5 и BD6 могут быть расположены на или возле amino- и карбоксильного конца SCP-II соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает семь связывающих доменов (BD1-BD7). В таких вариантах осуществления изобретения SCP-I может включать четыре связывающих домена (BD1-BD4), и SCP-II может включать другие три связывающих домена (BD5-BD7). Например, BD1 и BD2 могут быть соединены в тандем и расположены на или около аминоконца SCP-I, и BD3 и BD4 могут быть соединены в тандем и расположены на или около карбоксильного конца SCP-II. BD5 и BD6 могут быть соединены в тандем и расположены на или около amino- (или карбоксильного) конца SCP-II, и BD7 может быть расположен на или возле карбоксильного (или amino-) конца SCP-II.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер включает восемь связывающих доменов (BD1-BD8). В таких вариантах осуществления изобретения первый и второй одноцепочечные полипептиды могут включать четыре связывающих домена. В каждой цепи два связывающих домена могут быть расположены на или возле аминоконца, и два других связывающих домена расположены на или возле карбоксильного конца.

Для упрощения описания того, как различные компоненты могут быть расположены для получения первого и второго одноцепочечного полипептида, образующих полипептидные гетеродимеры по данному изобретению, ниже представлены схемы типичных вариантов воплощения изобретения от (1) до (50), в которых в каждый гетеродимер включено только два связывающих домена.

В варианте осуществления изобретения (1) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, участок CH1, шарнирный участок и фрагмент участка Fc; и второй одноцепочечный полипептид, включающий второй связывающий домен, участок CL (например, Cκ, Cλ), шарнирный участок и фрагмент участка Fc.

В варианте осуществления изобретения (2) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc и участок CH1; и второй одноцепочечный полипептид, включающий второй связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc и участок CL.

В варианте осуществления изобретения (3) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, участок CH1, шарнирный участок, фрагмент участка Fc и второй участок CH1; и второй одноцепочечный полипептид, включающий второй связывающий домен, участок CL, шарнирный участок, фрагмент участка Fc и второй участок CL.

В варианте осуществления изобретения (4) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, участок CH1, второй участок CH1, шарнирный участок и фрагмент участка Fc; и второй одноцепочечный полипептид, включающий второй связывающий домен, участок CL, второй участок CL, шарнирный участок и фрагмент участка Fc.

В варианте осуществления изобретения (5) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CH1 и второй участок CH1; и второй одноцепочечный полипептид, включающий второй связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CL и второй участок CL.

В варианте осуществления изобретения (6) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает участок CH1, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, второй шарнирный участок и первый связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий участок CL, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, второй шарнирный участок и второй связывающий домен.

В варианте осуществления изобретения (7) полипептидный гетеродимер образован следующими двумя одноцепочечными полипептидами: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CH1, второй шарнирный участок и первый связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CL, второй шарнирный участок и второй связывающий домен.

В варианте осуществления изобретения (8) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает участок CH1, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, второй участок CH1, второй шарнирный участок и первый связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий участок CL, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, второй участок CL, второй шарнирный участок и второй связывающий домен.









В варианте осуществления изобретения (55) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CH1, второй шарнирный участок и второй связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий третий связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc и участок CL.

В варианте осуществления изобретения (56) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CH1, второй шарнирный участок и второй связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CL, второй шарнирный участок и третий связывающий домен.

В варианте осуществления изобретения (57) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CL, второй шарнирный участок и второй связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий третий связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc и участок CH1.

В варианте осуществления изобретения (58) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу, первый одноцепочечный полипептид включает первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CL, второй шарнирный участок и второй связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CH1, второй шарнирный участок и третий связывающий домен.

В варианте осуществления изобретения (59) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу: первый связывающий домен, участок CH1, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, второй шарнирный участок и второй связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий третий связывающий домен, участок CL, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, второй шарнирный участок и четвертый связывающий домен.

В варианте осуществления изобретения (60) полипептидный гетеродимер включает следующие два одноцепочечных полипептида: от amino- к карбоксильному концу: первый одноцепочечный полипептид, включающий первый связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CH1, второй шарнирный участок и второй связывающий домен; и второй одноцепочечный полипептид, включающий третий связывающий домен, шарнирный участок, фрагмент участка Fc, участок CL, второй шарнирный участок и четвертый связывающий домен.

В вариантах осуществления изобретения от (1) до (32) полипептидный гетеродимер по данному изобретению включает следующие два одноцепочечных полипептида: первый одноцепочечный полипептид, включающий первый связывающий домен (BD1), который специфически связывается с мишенью-Т-клеткой (например, комплексом TCR или его компонентом, включая TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$ ), шарнирный участок, представленный шарнирным участком SCC-P IgG1, фрагмент участка Fc, который является фрагментом участка дикого типа или измененного IgG1 CH2CH3 человека, и участок CL, который представлен участком дикого типа или измененным участком С $\kappa$  человека с заменами N30Y V55A T70E (YAE); и второй одноцепочечный полипептид, включающий связывающий домен (BD2), который специфически связывается с мишенью-В-клеткой (например, CD19, CD79b, HLA-DR, CD37, CD20) или опухолевым или раковым антигеном (например, RON, c-Met, EpCAM, CEACAM-6, PSMA), шарнирный участок, который также представлен шарнирным участком SCC-P IgG1, фрагмент участка Fc, который является фрагментом участка дикого типа или измененного IgG1 CH2CH3 человека, и участок CH1, который представлен участком CH1 человека.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер по вариантам воплощения изобретения от (1) до (32) может дополнительно включать третий связывающий домен (BD3), который идентичен BD1 или BD2 и присоединен к одноцепочечному полипептиду посредством второго шарнирного участка (например, линкера H75 или H68 с последовательностью SEQ ID NO:742 и 78 соответственно). В других дополнительных вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер по вариантам воплощения изобретения от (1) до (32) может дополнительно включать третий и четвертый связывающие домены (BD3) и (BD4), каждый из которых идентичен или отличается от BD1 или BD2 и присоединен к одноцепочечному полипептиду(-ам) посредством второго шарнирного участка (например, линкера H75 или H68 с последовательностью SEQ ID NO:742 и 78).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры по данному изобретению могут быть получены способом рекомбинации для включения связывающих доменов с различной аффинностью к особенно чувствительным специфическим типам клеток. Например, может оказаться необходимым, чтобы полипептидный гетеродимер со связывающим доменом для комплекса TCR или его компонента и другим связывающим доменом к опухолевому антигену (или мишени В-клетке) преимущественно связывался с опухолевыми клетками, имеющими опухолевый антиген (или В-

клетками, несущими мишень В-клеток) с большей аффинностью, таким образом, полипептидный гетеродимер будет вначале связываться с опухолевыми клетками (или В-клетками) и затем вовлекать Т-клетки посредством своего связывающего домена TCR/CD3 к месту расположения опухоли или клеток. Различная аффинность связывания может быть достигнута путем, например, выбора связывающего домена для одной мишени с более высокой аффинностью, чем аффинность другого связывающего домена относительно своей мишени, или путем включения множественных связывающих доменов для одной мишени на полипептидном гетеродимере и одного связывающего домена или меньшего количества связывающих доменов для второй или других мишеней. Кроме того, использование разных шарнирных участков (например, использование шарнирных участков с разной длиной) может влиять на связывание одного домена более, чем на связывание другого домена, или использование разных шарнирных участков для разных связывающих доменов для изменения активности связывания связывающих доменов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения может оказаться необходимым, чтобы множество связывающих доменов были расположены на соответствующем расстоянии от друг друга, таким образом, их взаимодействия со своими мишенями будут производить желаемый эффект. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер, включающий связывающий домен для комплекса TCR или его компонента в одноцепочечном полипептиде и второй связывающий домен для опухолевого антигена или мишени-В-клетки во втором одноцепочечном полипептиде, может иметь оба связывающих домена на amino- или карбоксильных концах своих соответствующих цепей, таким образом, такие домены находятся в физической близости относительно друг друга в полипептидном гетеродимере.

Типичные гетеродимеры могут быть образованы из пар одноцепочечных полипептидов, описанных в тексте данной заявки. Если идентификационные номера последовательностей, указанные в тексте данной заявки, содержат последовательности сигнального пептида (например, первые 20 аминокислот), такие последовательности сигнального пептида не являются частью зрелых одноцепочечных полипептидов, которые образуют типичные полипептидные гетеродимеры, и, следовательно, их необходимо исключать.

Типичные одноцепочечные полипептиды имеют последовательности SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 29-32, 53-72, 74, 810-826, 859-864 и 874-882.

Типичные гетеродимеры могут быть образованы из следующих пар одноцепочечных полипептидов: SEQ ID NO:2 и 4, SEQ ID NO:6 и 8, SEQ ID NO:10 и 12, SEQ ID NO:14 и 16, SEQ ID NO:18 и 20, SEQ ID NO:20 и 22, SEQ ID NO:20 и 24, SEQ ID NO:30 и 32, SEQ ID NO:29 и 31, SEQ ID NO:29 и 32, SEQ ID NO:30 и 72, SEQ ID NO:53 и 72, SEQ ID NO:54 и 72, SEQ ID NO:55 и 72, SEQ ID NO:70 и 72, SEQ ID NO:71 и 72, SEQ ID NO:63 и 56, SEQ ID NO:64 и 57, SEQ ID NO:65 и 60, SEQ ID NO:66 и 58, SEQ ID NO:67 и 59, SEQ ID NO:68 и 61, SEQ ID NO:69 и 62, SEQ ID NO:54 и 811, SEQ ID NO:54 и 812, SEQ ID NO:54 и 813, SEQ ID NO:814 и 818, SEQ ID NO:815 и 818, SEQ ID NO:816 и 818, SEQ ID NO:817 и 818, SEQ ID NO:814 и 820, SEQ ID NO:814 и 821, SEQ ID NO:54 и 819, SEQ ID NO:814 и 826, SEQ ID NO:814 и 822, SEQ ID NO:814 и 823, SEQ ID NO:814 и 824, SEQ ID NO:859 и 862, SEQ ID NO:860 и 863, SEQ ID NO:861 и 864, SEQ ID NO:874 и 825, SEQ ID NO:875 и 879, SEQ ID NO:876 и 880, SEQ ID NO:877 и 881 или SEQ ID NO:878 и 882.

Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы получения гетеродимеров.

В родственном аспекте данное изобретение также описывает выделенные молекулы нуклеиновой кислоты (используется взаимозаменяемый термин "полинуклеотид"), которая кодирует описанные здесь одноцепочечные полипептиды. Типичные молекулы нуклеиновых кислот (с или без нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность сигнального пептида) имеют последовательности SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25-28, 33-52 и 792-808.

Данное изобретение также описывает векторы, которые включают последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей описанные здесь одноцепочечные полипептиды. В контексте данного изобретения термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Типичные векторы включают плазмиды, искусственные хромосомы дрожжей и вирусные геномы. Определенные векторы могут автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в то время как другие векторы могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина и, таким образом, реплицироваться в геноме хозяина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения векторы могут быть представлены рекомбинантными векторами экспрессии. Термин "рекомбинантные векторы экспрессии" или "векторы экспрессии" обозначает векторы, которые содержат последовательности нуклеиновой кислоты, которые оперативно присоединены к контрольной последовательности экспрессии (например, промотору), и, таким образом, способны направлять экспрессию таких последовательностей.

Последовательности промоторов, используемые для описанных здесь векторов экспрессии, могут быть выбраны из любого требуемого гена, с использованием векторов CAT (хлорамфениколтрансферазы) или других векторов с избираемыми маркерами. Эукариотические промоторы включают немедленно-ранний CMV, HSV тимидинкиназы, ранний и поздний SV40, LTR из ретровируса и металлотионеин-I мыши. В некоторых вариантах осуществления изобретения промоторы представлены индуцируемыми

промоторами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представлен вектором экспрессии, который включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей первый одноцепочечный полипептид описанного здесь полипептидного гетеродимера. В других некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представлен вектором экспрессии, который включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей второй одноцепочечный полипептид описанного здесь полипептидного гетеродимера.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор представлен вектором экспрессии, который включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей первый и второй одноцепочечный полипептид полипептидного гетеродимера. Промотор последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый одноцепочечный полипептид, может быть представлен так же, как и промотор нуклеиновой кислоты, кодирующей второй одноцепочечный полипептид. В альтернативном варианте промотор последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей первый одноцепочечный полипептид, может отличаться от промотора нуклеиновой кислоты, кодирующей второй одноцепочечный полипептид, таким образом, уровень экспрессии первого и второго одноцепочечных полипептидов может быть дифференцированно модулирован до максимальной гетеродимеризации первого и второго одноцепочечных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или оба промотора нуклеиновой кислоты, кодирующей первый и второй одноцепочечные полипептиды, представлены индуцируемыми промоторами.

Данное изобретение также описывает клетку-хозяина, трансформированную или трансфицированную, или содержащую иным образом любые нуклеиновые кислоты или векторы, описанные в тексте данной заявки. Типичные клетки-хозяева включают клетки VERO, клетки HeLa, линии клеток яичника китайского хомячка (CHO) (включая модифицированные клетки CHO, способные модифицировать схему гликозилирования экспрессируемых поливалентных связывающих молекул, см. публикацию заявки на патент США No. 2003/0115614), клетки COS (такие как COS-7), W138, BHK, HepG2, 3T3, RIN, MDCK, A549, PC12, K562, клетки HEK293, клетки HepG2, клетки N, клетки 3T3, клетки *Spodoptera frugiperda* (например, клетки Sf9), клетки *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, или членов семейства *Streptomycete*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает первый вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую первый одноцепочечный полипептид, и второй вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую второй одноцепочечный полипептид.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин включает вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую первый и второй одноцепочечные полипептиды.

Изобретение также включает способ получения описанных здесь полипептидных гетеродимеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает культивирование клетки-хозяина, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую первый и второй одноцепочечные полипептиды в условиях, подходящих для экспрессии полипептидов, и, в некоторых случаях, выделение или очистку гетеродимеров, образованных из первого и второго одноцепочечных полипептидов из культуры. Нуклеиновая кислота, кодирующая первый одноцепочечный полипептид, и нуклеиновая кислота, кодирующая второй одноцепочечный полипептид, могут присутствовать в одном векторе экспрессии в клетке-хозяине или в двух различных векторах экспрессии клетки-хозяина. В последнем случае соотношение между двумя векторами экспрессии можно контролировать для достижения максимальной гетеродимеризации первого и второго одноцепочечных полипептидов.

Данное изобретение описывает очищенные полипептидные гетеродимеры, как это описано в тексте данной заявки. В контексте данного изобретения термин "очищенный" описывает композицию, выделяемую из других компонентов, при этом полипептидный гетеродимер обогащен в любой степени относительно своего состояния в естественном виде. В некоторых вариантах осуществления изобретения данное изобретение описывает, по существу, очищенные полипептидные гетеродимеры, как это описано в тексте данной заявки. Термин "по существу, очищенный" обозначает композицию полипептидного гетеродимера, в котором полипептидный гетеродимер образует основной компонент композиции, таким образом, составляя по меньшей мере примерно 50, например по меньшей мере примерно 60, примерно 70, примерно 80, примерно 90, примерно 95, примерно 99% полипептидов по весу в композиции.

Специалисту в данной области хорошо известны другие способы очистки белка. Такие способы включают, на одном уровне, грубое фракционирование фракций полипептида и неполипептида. Часто необходима дальнейшая очистка с использованием способов хроматографии и электрофореза для достижения частичной или полной очистки (или очистки до состояния однородности). Аналитические способы, особенно подходящие для получения чистого белка слияния, представлены ионообменной хроматографией, эксклюзионной хроматографией, электрофорезом в полиакриламидном геле; и изоэлектрическим фокусированием. Особенно эффективные способы очистки пептидов представлены жидкостной экспресс-хроматографией белков и ВЭЖХ.

Специалисту в данной области известны различные способы количественной оценки степени очистки относительно данного изобретения. Они включают, например, оценку количества полипептидных



гетеродимеров во фракции с использованием анализа SDS/PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и ВЭЖХ, как это представлено в примерах в тексте данной заявки.

Способ получения описанных здесь полипептидных гетеродимеров преимущественнее способа первоначальной экспрессии и отдельной очистки отдельных одноцепочечных полипептидов с последующей инкубацией очищенных отдельных одноцепочечных полипептидов вместе с образованием полипептидных гетеродимеров. Например, определенные одноцепочечные полипептиды (например, определенные полипептиды, содержащие только участки CH1 в качестве своих доменов гетеродимеризации иммуноглобулина) неустойчивы при отдельной экспрессии. Кроме того, отдельная экспрессия и очистка отдельных одноцепочечных полипептидов с дальнейшей комбинацией очищенных одноцепочечных полипептидов включает больше этапов, чем ко-экспрессия одноцепочечных полипептидов с последующей очисткой полученных полипептидных гетеродимеров, и, как правило, менее эффективна и способы использования гетеродимеров.

Кроме полипептидных гетеродимеров, данное изобретение также описывает фармацевтические композиции и единицы лекарственных форм, которые включают полипептидные гетеродимеры, а также способы использования полипептидных гетеродимеров, фармацевтических композиций и лекарственных форм.

Композиции полипептидных гетеродимеров по данному изобретению обычно включают описанный здесь полипептидный гетеродимер в комбинации с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом, включая фармацевтически приемлемые носители и разбавители. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества будут нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях. Они хорошо известны в фармацевтической науке и описаны, например, в Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients: A Comprehensive Guide to Uses, Properties, and Safety, 5th Ed., 2006.

Фармацевтически приемлемые носители для терапевтического использования также хорошо известны в фармацевтической науке и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro (Ed.) 1985). Типичные фармацевтически приемлемые носители включают стерильный физиологический раствор и фосфатно-солевой буферный раствор при физиологическом значении pH. В фармацевтической композиции могут быть также представлены консерванты, стабилизаторы, красители и т.п. Кроме того, также могут использоваться антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Фармацевтические композиции также могут содержать разбавители, такие как буферы, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, полипептиды с низким молекулярным весом (менее чем примерно 10 остатков), белки, аминокислоты, углеводы (например, глюкозу, сахарозу, декстрины), хелатирующие агенты (например, ЭДТА), глутатион и другие стабилизаторы и вспомогательные вещества. Нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с неспецифическим сывороточным альбумином, являются типичными разбавителями. Например, продукт может быть представлен в виде лиофилизата с использованием соответствующих растворов вспомогательных веществ (например, сахарозы) в качестве разбавителей.

Данное изобретение также описывает способ лечения заболевания или нарушения, связанного с, например, избыточной опосредованной рецептором передачей сигнала, включая введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера, включающего связывающий домен, который специфически связывается с рецептором, таким как рецептор тирозинкиназы, включая EGFR, EGFRvIII, ErbB2, ErbB3, ErbB4, IGF1R, c-Met, RON и EphA2.

Типичные заболевания или нарушения, связанные с избыточной опосредованной рецептором передачей сигнала, включают рак (например, солидная злокачественная опухоль и гемобластозы), аутоиммунные или воспалительные заболевания или состояния, сепсис в результате бактериальной инфекции и вирусную инфекцию.

В одном аспекте данное изобретение описывает способ направленной активации Т-клеток, включающий введение нуждающемуся пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера, который включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или их комбинацию, и второй связывающий домен, который специфически связывает различные мишени, например, опухоеспецифический антиген или другой антиген по выбору в указанном сайте или клетку, в которой необходимо произвести активацию Т-клеток.

В другом аспекте данное изобретение описывает способ ингибирования роста, метастазов или метастатического роста злокачественной опухоли (например, солидной злокачественной опухоли или гемобластоза), включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества описанного здесь полипептидного гетеродимера или его композиции.

Воздействию композиций и способов по данному изобретению подвергнуты целый ряд видов рака, включая солидную злокачественную опухоль и гемобластоз. Типы рака, которые подвергаются лечению, включают, но не ограничиваются, следующие: аденокарцинома молочной железы, предстательной железы, поджелудочной железы, толстой и прямой кишки; все формы бронхогенной карциномы легкого (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, мелкоклеточный рак легкого и немелкоклеточ-

ный рак легкого); миелоид; меланома; гепатома; нейробластома; папиллома; апудома; хориста; ангиома; карциноидный синдром; карциноидная опухоль сердца; и карцинома (например, Уолкера, базально-клеточная, базальная плоскоклеточная, Брауна-Пирса, протоковая, опухоль Эрлиха, Кребса 2, клеток Меркеля, слизистой, немелкоклеточная легкого, овсяновидных клеток, папиллярная, уплотненная, бронхиолярная, бронхогенная, плоскоклеточная и переходноклеточная). Дополнительные типы рака, которые могут быть подвергнуты лечению, включают следующие: гистиоцитарные нарушения; лейкоз; злокачественный гистиоцитоз; болезнь Ходжкина; иммунопролиферативный мелкоклеточный рак; неходжкинская лимфома; плазмацитома; ретикулоэндотелиоз; меланома; хондробластома; хондрома; хондросаркома; фиброма; фибросаркома; гигантоклеточные опухоли; гистиоцитома; липома; липосаркома; мезотелиома; миксома; миксосаркома; остеома; остеосаркома; хордома; краниофарингиома; дисгерминома; гамартома; мезенхимомы; мезонефрома; миосаркома; амелобластома; цементома; одонтома; тератома; тимомы; трофобластная опухоль. Кроме того, представленные ниже типы рака также рассматриваются как подвергающиеся лечению: аденома; холангиома; холестеатома; циклиндрома; цистаденокарцинома; цистаденома; фолликулярная аденома яичника; гинандробластома; гепатома; гидраденома; опухоль островковых клеток; опухоль из клеток Лейдига; папиллома; опухоль клеток Сертолли; текома; лейомиома; лейомиосаркома; миобластома; миома; миосаркома; рабдомиома; рабдомиосаркома; эпендимома; ганглионейрома; глиома; медуллобластома; менингиома; нейрилеммома; нейробластома; нейроэпителиома; нейрофиброма; нейрома; парагангиома; нехромаффинная парагангиома; и мультиформная глиобластома. Типы рака, которые могут быть подвержены лечению, также включают, но не ограничиваются, следующие: ангиокератома; ангиолимфоидная гиперплазия с эозинофилией; склерозирующая ангиома; ангиоматоз; гломангиома; гемангиоэндотелиома; гемангиома; гемангиоперицитомы; гемангиосаркома; лимфангиома; лимфангиомиома; лимфангиосаркома; пинеалома; карциносаркома; хондросаркома; филоидная цистосаркома; фибросаркома; гемангиосаркома; лейомиосаркома; лейкосаркома; липосаркома; лимфангиосаркома; миосаркома; миксосаркома; карцинома яичника; рабдомиосаркома; саркома; неоплазмы; нейрофиброматоз; и дисплазия шейки матки.

Дополнительные типичные виды рака, которые тоже подвержены лечению композициями и способами, описанными в тексте данной заявки, включают следующие: В-клеточные виды рака, включая В-клеточные лимфомы [такие как различные формы болезни Ходжкина, неходжкинская лимфома (НХЛ) или лимфомы центральной нервной системы], лейкозы [такие как острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), волосатоклеточный лейкоз и миелолейкоз] и миеломы (такие как множественная миелома). Дополнительные В-клеточные виды рака включают следующие: мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, лимфоплазматическая лимфома, лимфома маргинальной зоны селезенки, плазматическая миелома, солитарная плазмацитома кости, экстраоссальная плазмацитома, экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны мукозоассоциированной (MALT) лимфоидной ткани, нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны, фолликулярная лимфома, лимфома клеток мантийной зоны, диффузная В-крупноклеточная лимфома, В-крупноклеточная лимфома средостения (тимуса), внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома, первичная выпотная лимфома, лимфома/лейкоз Беркитта, пролиферации В-клеток с неопределенным потенциалом злокачественности, лимфоматоидный грануломатоз, и посттрансплантационное лимфопролиферативное нарушение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста злокачественного новообразования или метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования или гемобластома, включают гетеродимеры, которые специфически связываются с опухолью или раковым антигеном и мишенью-Т-клеткой. Такие гетеродимеры обычно разработаны таким образом, чтобы иметь большую аффинность связывания с опухолевым или раковым антигеном (например по меньшей мере примерно в 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75 или 100 раз выше) в сравнении с мишенью-Т-клеткой, таким образом, они будут преимущественно связываться вначале с опухолевым или раковым антигеном, а затем связываться с мишенью-Т-клеткой, которая, в свою очередь, задействует и активирует Т-клетки для повреждения или разрушения опухолевых или раковых клеток, несущих на своей поверхности опухолевый или раковый антиген. Типичные опухолевые или раковые антигены и мишени-Т-клетки включают представленные выше примеры в предыдущей главе, описывающей связывающие домены полипептидных гетеродимеров. Например, мишень-Т-клетка может быть представлена CD3 или PSMA.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста, метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования, или в направленной активации Т-клеток, включают по меньшей мере один связывающий домен, который специфически связывается с онкологической мишенью (включая опухолевый или клеточный антиген, такие как RON, c-Met, CEACAM-6 или PSMA), и другой связывающий домен, который специфически связывается с комплексом TCR или его компонентом (например, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  и CD3 $\epsilon$ ).

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста, метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования, включают по меньшей мере один связывающий домен, который специфически связывается с CD28, и

второй связывающий домен, который специфически связывается с CD79b. Такие полипептидные гетеродимеры могут дополнительно включать связывающий домен, который включает эктодомен PDL2, связывающий домен, который специфически связывается с гиперИЛ-6, или оба связывающих домена.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста, метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования, включают по меньшей мере один связывающий домен, который специфически связывается с RON, и второй связывающий домен, который специфически связывается с c-Met.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста, метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования, включают связывающие домены, которые специфически связываются с одним или более следующими рецепторами тирозинкиназы: c-Met, RON, EGFR, EGFRvIII, Her2, ErbB3, ErbB4 и IGF1R, EphA2. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры могут дополнительно включать один или более связывающих доменов, которые специфически связываются с одним или более следующими антиангиогенными агентами: PDGFR, VEGFR1-4 и ангиопоэтин 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения представленные выше гетеродимеры могут дополнительно включать один или более связывающих доменов, которые специфически связываются с одним или более следующими рецепторами Fc для повышения направленности цитотоксической эффекторной функции: CD64, CD32A и CD16. В некоторых вариантах осуществления изобретения представленные выше гетеродимеры могут дополнительно включать связывающий домен, который специфически связывается с рецептором трансферрина (CD71) для обеспечения разрушения рецепторов.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста, метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования, включают связывающие домены, которые являются агонистами двух или более следующих TNFSFR: TNFR1, TNFR2, DR4, DR5, TWEAKR и FAS.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста, метастазов, или метастатического роста злокачественного новообразования, включают связывающие домены, которые специфически связываются с двумя или несколькими следующими проонкогенными цитокинами или факторами роста: ГЦФР, MSP, ЭФР (включая эпирегулин, херрегулин,  $\beta$ -регулин, нейрегулин), HIF-1 $\alpha$ , VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, гиперИЛ-6, ИЛ-8, Wnt, sHH, TФр $\beta$  или PDGF.

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования роста злокачественного новообразования, или метастазов или метастатического роста злокачественного новообразования, включают гетеродимеры, которые специфически связываются, например, с EGFR, ErbB3, ErbB4, c-Met, RON, EphA2, IGF1R, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, CD44v6, CD151, EpCAM, CEACAM6, TGFB2, GHRHR, GHR, ИЛ-6R, gp130, TNFR2, PD1, TWEAK-R, OSMR $\beta$ , Patched-1, Frizzled или Robo1.

Полипептидные гетеродимеры, используемые для ингибирования метастазов или метастатического роста гемобластоза, включают гетеродимеры, которые специфически связываются, например, с EGFR, ErbB3, c-Met, RON, EphA2, IGF1R, TGFB2, ИЛ-6R, gp130, TNFR2, PD1, OSMR $\beta$ , LT $\beta$ R, CD19, CD80, CD81 или CD86.

В другом аспекте данное изобретение описывает способ лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, предполагающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества описанного здесь полипептидного гетеродимера или его композиции.

Типичные аутоиммунные или воспалительные заболевания, нарушения или состояния, которые могут быть подвергнуты лечению белками слияния и композициями, а также единицами лекарственных доз, включают, но не ограничиваются, следующие: воспалительная болезнь кишечника (например, болезнь Крона или язвенный колит), сахарный диабет (например, диабет I типа), дерматомиозит, полимиозит, злокачественная анемия, первичный билиарный цирроз, острый рассеянный энцефаломиелит (ОРЭМ), болезнь Эддисона, анкилозирующий спондилит, синдром антифосфолипидных антител (APS), аутоиммунный гепатит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), болезнь Хашимото, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, системная красная волчанка, волчаночный нефрит, психоневрологическая волчанка, рассеянный склероз (РС), миастения гравис, вульгарная пузырчатка, астма, псориаз, псориатический артрит, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, височный артериит (также известный как "гигантоклеточный артериит"), аутоиммунная гемолитическая анемия, буллезный пемфигоид, васкулит, целиакия, хроническая обструктивная болезнь легких, эндометриоз, гнойный гидраденит, интерстициальный цистит, очаговая склеродерма, склеродерма, нарколепсия, нейромиотония, витилиго и аутоиммунное заболевание внутреннего уха.

Типичные полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, могут включать один или несколько связывающих доменов, которые специфически связываются с CD28, и один, два или три следующих дополнительных связывающих домена: связывающий домен, который включает эктодомен PDL2, связывающий домен, который

включает моноИЛ-10, и связывающий домен, который специфически связывается с CD86. Например, полипептидный гетеродимер может включать связывающий домен, который специфически связывается с CD28, и от одного до трех связывающих доменов, которые специфически связываются с CD86.

Дополнительные типичные полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, могут включать один или несколько связывающих доменов, которые специфически связываются с CD28, и один или несколько связывающих доменов, которые являются агонистом ИЛ-10 (например, моноИЛ-10), агонистом HLA-G, агонистом ГЦФР, агонистом ИЛ-35, агонистом PD-1, агонистом BTLA, антагонистом LIGHT, антагонистом GITRL или антагонистом CD40. В альтернативном варианте полипептидные гетеродимеры могут включать два или несколько связывающих доменов, выбираемых из агониста ИЛ-10 (например, моноИЛ-10), агониста HLA-G, агониста ГЦФР, агониста ИЛ-35, агониста PD-1, агониста BTLA, антагониста LIGHT, антагониста GITRL или антагониста CD40.

Дополнительные типичные полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, могут включать один или несколько связывающих доменов, которые специфически связываются с CD32B, и один или несколько связывающих доменов, которые являются агонистом ИЛ-10 (например, моноИЛ-10), агонистом HLA-G, агонистом ГЦФР, агонистом ИЛ-35, агонистом PD-1, агонистом BTLA, антагонистом LIGHT, антагонистом GITRL или антагонистом CD40.

Дополнительные типичные полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, могут включать связывающие домены, которые специфически связываются с одним или более следующими TNFSFR: TNFR1, TNFR2, HVEM, LT $\beta$ R, TWEAKR, TACI, BAFF-R, BCMA или FAS.

Дополнительные типичные полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, могут включать связывающие домены, которые специфически связываются с одним или более следующими провоспалительными цитокинами/хемокинами, такими как ФНО- $\alpha$ , ИЛ-6, ИЛ-2, ИЛ-1, ИЛ-8, IP-10, ИФН- $\gamma$ , ИФН- $\alpha$ , RANKL, FASL, TФр $\beta$ , ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-17/AF, TWEAK, CSF2, IGF1, IGF2 или BLYS/APRIL.

Полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, включают соединения, которые специфически связываются, например, с TGFBR2, ИЛ-6R, gp130, TNFR1, TNFR2, PD1, HVEM, OX40, CD40, CD137, TWEAK-R, LT $\beta$ R, LIFR $\beta$ , OSMR $\beta$ , CD3, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD19, CD28, CD80, CD81, CD86, TLR7, TLR9 или любой их комбинацией.

В другом аспекте данное изобретение описывает способ лечения В-клеточного ассоциированного заболевания или нарушения, который включает введение нуждающемуся в этом пациенту (например, пациенту, имеющему или имеющему подозрение на В-клеточное ассоциированное нарушение или заболевание) эффективного количества описанного здесь полипептидного гетеродимера, такого, который специфически связывается с В-клеточной мишенью.

Полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения В-клеточного ассоциированного заболевания или нарушения, могут включать связывающие домены, которые специфически связываются с одной или несколькими В-клеточными мишенями, такими как CD79b, CD19, HLA-DR, CD20, CD21, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38 или CD70. Полипептидные гетеродимеры могут дополнительно включать связывающий домен, который специфически связывается с Т-клеточной мишенью, такой как комплекс TCR или его компонент, включая TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  или CD3 $\epsilon$ .

Полипептидные гетеродимеры, используемые для лечения В-клеточного ассоциированного заболевания или нарушения, могут включать связывающий домен, который специфически связывается с В-клеточной мишенью, такой как CD79b, CD19, HLA-DR, CD20, CD21, CD22, CD30, CD33, CD37, CD38 и CD70, и связывающий домен, который специфически связывается с CD64, CD32A или CD16 для повышения целевой цитотоксической эффекторной функции.

Полипептидные гетеродимеры или их композиции по данному изобретению могут быть введены перорально, местно, чрескожно, парентерально, с использованием спрея для ингаляции, вагинально, ректально или интракраниальной инъекцией, или любой из указанных выше комбинаций. В одном варианте осуществления изобретения полипептидные гетеродимеры или их композиции вводят парентерально. В контексте данного изобретения термин "парентеральный" включает подкожные инъекции, внутривенные, внутримышечные, интракостеральные инъекции или способы инфузии. Также предусмотрены внутривенная, интрадермальная, внутримышечная, интрамаммарная, интраперитонеальная, интратекальная, ретробульбарная, интрапульмонарная инъекции и/или хирургическая имплантация в отдельном месте. Например, изобретение включает введение полипептидных гетеродимеров или их композиций путем внутривенной инъекции.

Фармацевтически эффективная доза зависит от типа заболевания, используемой композиции, пути введения, типа подвергнутого лечению субъекта, физических характеристик отдельного субъекта, рассматриваемого для проведения лечения, приема сопутствующих препаратов и других факторов, которые

будут очевидными для специалиста в медицинской науке. Например, количество от 0,01 и 1000 мг/кг (например, от примерно 0,1 до 1 мг/кг, от примерно 1 до 10 мг/кг, примерно 10-50 мг/кг, примерно 50-100 мг/кг, примерно 100-500 мг/кг или примерно 500-1000 мг/кг) на массу тела (которое может быть введено в виде однократной дозы, ежедневно, еженедельно, ежемесячно или при любом подходящем интервале) активного действующего вещества в зависимости от силы полипептидного гетеродимера по данному изобретению.

Также предусмотрено введение полипептидных гетеродимеров или их композиций в комбинации со вторым агентом. Второй агент может быть представлен агентом, принятым в науке в качестве стандартного лечения отдельного болезненного состояния или нарушения, такого как рак, воспаление, аутоиммунное заболевание и инфекция. Предусмотренные типичные вторые агенты включают полипептидные гетеродимеры, которые связываются с мишенями, отличающимися от мишеней, с которыми связываются первичные полипептидные гетеродимеры, поликлональные антитела, моноклональные антитела, белки слияния иммуноглобулинового происхождения, химиотерапевтические агенты, ионизирующее облучение, стероиды, НСПВП, противомикробные агенты или другие активные и вспомогательные агенты, или любая их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер и второй агент действуют синергичным образом. Другими словами, эти два соединения взаимодействуют таким образом, что комбинированный эффект соединений выше суммарных индивидуальных эффектов каждого соединения при введении в качестве монотерапии (см., например, Berenbaum, *Pharmacol. Rev.* 41:93, 1989).

В других некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидный гетеродимер и второй агент действуют аддитивным образом. Другими словами, такие два соединения взаимодействуют таким образом, что комбинированный эффект соединений такой же, как и суммарные эффекты каждого соединения при введении в виде монотерапии.

Вторые агенты, используемые в комбинации с описанными здесь полипептидными гетеродимерами или их композициями, могут быть представлены стероидами, НСПВП, ингибиторами mTOR (например, рапамицин (сиролимус), темсиролимус, дефоролimus, эверолимус, зотаролimus, куркумин, фарнезилтиосалициловая кислота), ингибиторы калхейнына (например, циклоспорин, такролимус), антиметаболиты (например, микофеноловая кислота, микофенолата мофетил), поликлональные антитела (например, антитимоцитарный глобулин), моноклональные антитела (например, даклизумаб, базиликсимаб) и белки слияния CTLA4-Ig (например, абатацепт или белатацепт).

Вторые агенты, используемые для ингибирования роста солидного злокачественного новообразования, ингибирования метастазов или метастатического роста злокачественного новообразования, или лечения или снижения симптомов гемобластоза включают агенты химиотерапии, ионизирующего облучения и другие противораковые агенты. Примеры агентов химиотерапии, предусмотренные в качестве дополнительных терапевтических агентов, включают алкилирующие агенты, такие как азотистые иприты (например, мехлорэтамин, циклофосфамид, ифосфамид, мелфалан и хлорамбуцил); бифункциональные химиотерапевтические агенты (например, бендамустин); нитрозомочевину (например, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU) и семустин (метил-CCNU)); этиленимины и метилмеламины (например, триэтиленмеламин (ТЕМ), триэтилен тиофосфориамид (тиотепан) и гексаметилмеламин (НММ, алтретамин)); алкилсульфонаты (например, бусульфат); и триазины (например, дакарбазин (DTIC)); антиметаболиты, такие как аналоги фолиевой кислоты (например, метотрексат, триметотрексат и пеметрексед (антифолат с множественными мишенями)); аналоги пиримидина (такой как 5-фторурацил (5-ФУ), фтордезоксифуридин, гемцитабин, цитозина арабинозид (АгаС, цитарабин), 5-азациитидин и 2,2'-дифтордезоксифуридин); и аналоги пурина (например, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, азатиоприн, 2'-дезоксикоформидин (пентостатин), эритрогидроксинониладенин (ЕННА), флударабина фосфат, 2-хлордезоксиаденозин (кладрибин, 2-CdA)); ингибиторы топоизомеразы I типа, такие как камптотецин (СРТ), топотекан и иринотекан; естественные продукты, такие как эпиподофиллотоксины (например, этопозид и тенипозид); и алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин и винорелбин); противоопухолевые антибиотики, такие как актиномицин D, доксорубин и блеомицин; радиосенсибилизаторы, такие как 5-бромдеоксиуридин, 5-йоддеоксиуридин и бромдеоксицитидин; координационные комплексы платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; замещенная мочевина, такая как гидроксимочевина; и производные метилгидразина, такие как N-метилгидразин (МН) и прокарбазин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения вторые агенты, используемые для ингибирования роста метастазов или метастатического роста злокачественного новообразования, включают полипептидные гетеродимеры по данному изобретению, которые связываются с мишенями раковых клеток, отличающимися от мишеней, с которыми связывается первый полипептидный гетеродимер. В некоторых вариантах осуществления изобретения вторые агенты, используемые для подобных видов лечения, включают поликлональные антитела, моноклональные антитела и белки слияния иммуноглобулинового происхождения, которые связываются с мишенями раковых клеток. Типичные мишени раковых клеток представлены выше в контексте описания мишеней полипептидных гетеродимеров, используемых в указанном выше лечении.

Дополнительные терапевтические агенты, предусмотренные данным изобретением для лечения ау-

тоиммунных заболеваний, включают иммуносупрессанты, которые действуют для супрессии или маскировки иммунной системы подвергнутого лечению пациента. Иммуносупрессивные агенты включают, например, нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП), анальгетики, глюкокортикоиды, противоревматические препараты, модифицирующие лечение болезни (DMARD) для лечения артрита, или модификаторы биологического ответа. Композиции в описании DMARD также используются в лечении множества других аутоиммунных заболеваний, кроме ревматоидного артрита.

Типичные НСПВП выбирают из группы, включающей ибупрофен, напроксен, натрия напроксен, ингибиторы Сох-2, такие как Виокс и Целебрекс, а также салилаты. Типичные анальгетики выбирают из группы, состоящей из ацетаминофена, оксикодона, трамадола или пропаксифена гидрохлорида. Типичные глюкокортикоиды выбирают из группы, состоящей из кортизона, дексаметазона, гидрокортизона, метилпреднизолона, преднизолона или преднизона. Типичные модификаторы биологического ответа включают молекулы, направленные против маркеров клеточной поверхности (например, CD4, CD5, и т.д.), ингибиторы цитокинов, такие как антагонисты ФНО (например, этанерцепт (Энбрел), адалимумаб (Хумира) и инфликсимаб (Ремикад)), ингибиторы хемокина и ингибиторы адгезирующих молекул. Модификаторы биологического ответа включают моноклональные антитела, а также рекомбинантные формы молекул. Типичные DMARD включают азатиоприн, циклофосфамид, циклоспорин, метотрексат, пеницилламин, лефлуномид, сульфасалазин, гидроксихлорохин, золото (для перорального приема (ауранофин) и внутримышечного введения) и миноциклин.

Дополнительные вторые агенты, используемые для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, нарушения или состояния, могут быть представлены поликлональным или моноклональным антителом, белком слияния иммуноглобулинового происхождения (например, белками слияния scFv, SMIP™, PIMS, SCORPION™) или полипептидным гетеродимером по данному изобретению, который специфически связывается с мишенью, ассоциированной с подобным заболеванием, нарушением или состоянием. Примеры таких мишеней представлены выше в контексте мишеней полипептидных гетеродимеров по данному изобретению, используемых в указанном выше лечении.

Предусматривается, что композиция связывающей молекулы и второй активный агент может быть введен одновременно в одной и той же композиции. В альтернативном варианте вторые агенты могут вводиться в отдельной композиции, но сопутственно (т.е. с приемом с промежутком по меньшей мере в один час между введениями).

В некоторых вариантах осуществления изобретения второй активный агент может быть введен перед введением полипептидного гетеродимера или его композиции. Предыдущее введение обозначает введение второго активного агента за по меньшей мере один час до лечения полипептидным гетеродимером или его композицией. Дополнительно предусмотрено, что активный агент может быть введен после введения композиции связывающей молекулы. Последующее введение обозначает введение спустя по меньшей мере один час после введения полипептидного гетеродимера или его композиции.

Изобретение предусматривает лекарственную форму, включающую фармацевтическую композицию по изобретению. Такие лекарственные формы включают, например, ампулу или шприц с одинарной или множественной дозой, включая двухкомpartmentальную ампулу или шприц, один компартимент которых включает фармацевтическую композицию по данному изобретению в лиофилизированной форме, а другой компартимент включает разбавитель для восстановления. Лекарственная форма с множественной дозой может также быть представлена, например, мешком или пробиркой для подсоединения устройства для внутривенной инфузии.

Данное изобретение также предусматривает набор, включающий фармацевтическую композицию по данному изобретению в единице дозы, или множественную дозу, контейнер, например ампулу, и набор инструкций для введения композиции пациентам, страдающим от нарушения, такого как описанное выше нарушение.

### Примеры

Пример 1. Двухвалентный полипептидный гетеродимер с двумя парами доменов гетеродимеризации.

Полипептидный гетеродимер X0172 был получен путем ко-экспрессии одноцепочечных полипептидов X0130 (2E12 CH1 CH2 CH3 Ск) и X0168 (Ск CH2 CH3 CH1 H68 2E12). Одноцепочечный полипептид X0130 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 2E12 (антитело к CD28) scFv, CH1 IgG1 человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и измененный Ск человека (без первого Arg или последнего Cys). Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот X130 представлены SEQ ID NO:1 и 2 соответственно. Одноцепочечный полипептид X0168 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: измененный Ск человека (без первого Arg или последнего Cys), шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека, CH1 IgG1 человека, линкер H68 и 2E12 (антитело к CD28) scFv. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот X168 представлены SEQ ID NO:3 и 4 соответственно. Аминокислотная последовательность линкера H68 представлена SEQ ID NO:78.

Для сравнения, полипептидный гетеродимер X0124 был получен путем коэкспрессии одноцепочечного полипептида X0112 (2E12 CH1 CH2 CH3) и X0113 (Ск CH2 CH3). Одноцепочечный полипептид

X0112 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 2E12 (антитело к CD28) scFv, CH1 IgG1 человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека и CH3 IgG1 человека. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот X0112 представлены SEQ ID NO:5 и 6 соответственно. Одноцепочечный полипептид X0113 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: измененный Ск человека (без первого Arg или последнего Cys), шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека и CH3 IgG1 человека. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислот X0113 представлены SEQ ID NO:7 и 8 соответственно.

#### Экспрессия.

За день до трансфекции клетки HEK293 были суспендированы в клеточной концентрации  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде для экспрессии Freestyle 293 (Gibco). Для большей трансфекции использовали 250 мл клеток, для меньшей трансфекции использовали 60 мл клеток. На день трансфекции 320 мкл реагента 293fectin (Invitrogen) было смешано с 8 мл среды. В то же самое время 250 мкг ДНК каждой из двух цепей также было смешано с 8 мл среды и инкубировано в течение 5 мин. Спустя 15 мин инкубации смесь ДНК-293fectin была добавлена к 250 мл 293 клеток и возвращена в мешалку при 37°C с перемешиванием при скорости 120 об/мин. Для меньшей трансфекции использовали 60 мл клеток, четыре ДНК, 293fectin и среду.

#### Очистка.

Для очистки белков использовали аффинную хроматографию белка А. В колонку Biorad (хроматографическая колонка Econo-column, размер  $2,5 \times 10$  см) было добавлено 2 мл носителя агарозы с белком А (Repligen), экстенсивно промыто ФСБ (10× объемов колонки), после чего был загружен супернатант, промыт ФСБ снова и элюирован с использованием 3 объемов колонки буфера для элюирования Pierce IgG. Затем белки были экстенсивно диализированы относительно ФСБ. После этого белки могли быть сконцентрированы с использованием устройства центрифужных фильтров Amicon до финального объема примерно 0,5 мл.

Для второго этапа очистки использовали аффинную хроматографию белка L или катионообменную хроматографию. Для хроматографии белком L, очищенный полипептидный гетеродимер с белком А был пропущен через колонку с агарозой и белком L, которая была предварительно уравновешена ФСБ, затем промыли ФСБ (10× объемов колонки) и элюировали с использованием буфера элюирования Pierce IgG. Затем белки были экстенсивно диализированы относительно ФСБ и сконцентрированы с использованием устройства центрифужных фильтров Amicon до финального объема примерно 0,5 мл.

Образцы (200-300 мкг) ранее аффинно очищенных (белок А или белок L) полипептидных гетеродимеров были диализированы в 20 mM MES, pH 6,0 (буфер А) и загружены в катионообменную колонку MonoS 5/50 GL (GE Healthcare) при скорости потока 2 мл/мин с использованием прибора АКТА Explorer FPLC. Равновесие колонки было установлено с использованием 5 объемов колонки (КО), затем были осуществлены прогоны с использованием градиента в смеси 50%:50% буфер А:буфер В (буфер В представлен 20 mM MES, 1 M NaCl, pH 6,0) над 20 КО. Полученная смесь 100% буфера В была пропущена относительно 5 КО для очистки колонки, и через систему были пропущены другие 5 КО при 100% буфере А для установления равновесия перед следующим введением. Пики были собраны и проанализированы с использованием SDS-PAGE и масс-спектрометрии с электрораспылением.

#### Анализ SDS-PAGE.

Очищенные белки были проанализированы на геле 10% SDS-PAGE с использованием гелевого компонента Invitrogen X-cell Surelock.

#### Синергия с субоптимальной концентраций РМА.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные у внутрибольничных доноров, были выделены из гепаринизированной цельной крови путем центрифугирования над средой разделения лимфоцитов (MP Biomedicals, Aurora, OH) и промыты дважды с использованием среды RPMI (Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA). Затем CD4+ Т-клетки были обогащены PBMC с использованием отрицательной селекции с набором для выделения Т-клеток MACS CD4+ T-cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Обогащенные (>95%) CD4+ Т-клетки были ресуспендированы в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в полной RPMI/10% FCS. Тестовые реагенты были приготовлены при концентрации 40 мкг/мл (с получением финальной концентрации 10 мкг/мл) в полной среде RPMI/10% FCS и добавлены в 96-луночные плоскодонные планшеты в концентрации 50 мкл/луночка (BD Falcon, San Jose, C.A). РМА (форбол 12 миристат 13-ацетат; A.G. Scientific, Inc., San Diego, CA) в полной среде RPMI/10% FCS было добавлено в 50 мкл/луночка при концентрации 4 нг/мл (финальная концентрация 1 нг/мл). Затем Т-клетки в полной RPMI/10% FCS были добавлены в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток/луночка в объеме 50 мкл, и, наконец, в каждую луночку для доведения финального объема до 200 мкл/луночка была добавлена полная среда RPMI/10% FCS (обычно 50 мкл). Клетки были обработаны тестовыми образцами +/- РМА и инкубированы в течение 72 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. В луночки в течение последних 6 ч культивирования был добавлен 1 мкл <sup>3</sup>H-тимидина (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) в разведении 1:50 с полной RPMI/10% FCS (50 мкл/луночка). Планшеты были собраны в Unifilter-96, микропланшет GF/C (Perkin Elmer, Boston, MA) с использованием Packard Filtermate Harvester (Perkin Elmer, Boston, MA). Числа были выражены в едини-

цах копий/мин и представлены средними значениями реплицируемых образцов.

На фиг. 2 указано, что полипептидный гетеродимер X0172 имеет отличительное свойство в сравнении с 2E12 SMIP M0039 (SEQ ID NO:77). Он не синергирует с РМА также как и SMIP. Такой двухвалентный полипептидный гетеродимер имеет свойство, близкое к одновалентному полипептидному гетеродимеру X0124, а не двухвалентному SMIP.

На фиг. 3 показано, что двухвалентный полипептидный гетеродимер X0172 связывается с CD4<sup>+</sup> Т-клетками лучше, чем 2E12 scFv (SEQ ID NO:109) и одновалентный полипептидный гетеродимер X0124.

Пример 2. Двухвалентный, трехвалентный, четырехвалентный гетеродимер с использованием одной пары домена гетеродимеризации.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер X0251 был получен путем коэкспрессии одноцепочечных полипептидов X0244 (Ск(YAE) CH2(N297A) CH3 H68 2E12) и X0245 (2E12 CH1 CH2(N297A) CH3). Одноцепочечный полипептид X0244 включает, от amino- до карбоксильного конца: Ск(YAE) человека (т.е. Ск человека без первого Arg или последнего Cys, но с заменами N30Y, V55A и T70E), шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 (N297A) человека (т.е. CH2 IgG1 человека с заменой N297A), CH3 IgG1 человека, линкер H68 и 2E12 (антитело к CD28) scFv. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0244 представлены SEQ ID NO:9 и 10 соответственно. Одноцепочечный полипептид X0245 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 2E12 (антитело к CD28) scFv, CH1 IgG1 человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека (N297A) и CH3 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0245 представлены SEQ ID NO:11 и 12 соответственно.

Трехвалентный биспецифический полипептидный гетеродимер X0252 был получен путем коэкспрессии одноцепочечных полипептидов X0246 (P2C2 Ск(YAE) CH2(N297A) CH3) и X0247 (2E12 CH1 CH2(N297A) CH3 H68 2E12). Одноцепочечный полипептид X0246 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: P2C2 (антитело к CD79b) scFv, Ск(YAE) человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 (N297A) человека и CH3 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0246 представлены SEQ ID NO:13 и 14 соответственно. Одноцепочечный полипептид X0247 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 2E12 (антитело к CD28) scFv, CH1 IgG1 человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека (N297A), CH3 IgG1 человека, линкер H68 и 2E12 (антитело к CD28) scFv. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0247 представлены SEQ ID NO:15 и 16 соответственно.

Четырехвалентный триспецифический полипептидный гетеродимер X0253 был получен путем коэкспрессии одноцепочечных полипептидов X0248 (P2C2 Ск(YAE) CH2(N297A) CH3 H68 A2) и X0249 (PDL2 ECD CH1 CH2(N297A) CH3 H68 2E12). Одноцепочечный полипептид X0248 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: P2C2 (антитело к CD79b) scFv, Ск(YAE) человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 (N297A) человека, CH3 IgG1 человека, линкер H68 и A2 (антитело к гиперИЛ-6) scFv. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0248 представлены SEQ ID NO: 17 и 18 соответственно. Одноцепочечный полипептид X0249 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: PDL2 ECD (т.е. эктодомен PDL2), CH1 IgG1 человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека (N297A), CH3 IgG1 человека, линкер H68 и 2E12 (антитело к CD28) scFv. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0249 представлены SEQ ID NO:19 и 20 соответственно.

Другой четырехвалентный тетраспецифический полипептидный гетеродимер X0283 был получен путем коэкспрессии одноцепочечных полипептидов X0249 (PDL2 ECD CH1 CH2(N297A) CH3 H68 2E12) и X0281 (моноИЛ-10 Ск(YAE) CH2(N297A) CH3 H68 3D1). Одноцепочечный полипептид X0281 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: моноИЛ-10, Ск(YAE) человека, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 (N297A) человека, CH3 IgG1 человека, линкер H68 и 3D1 (антитело к CD86) scFv. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0281 представлены SEQ ID NO:21 и 22.

В качестве контроля полипептидного гетеродимера X0283 четырехвалентный полипептидный гетеродимер X0284 был получен путем коэкспрессии одноцепочечных полипептидов X0249 (PDL2 ECD CH1 CH2(N297A) CH3 H68 2E12) и X0282 (моноИЛ-10 Ск CH2(N297A) CH3 H68 3D1). Одноцепочечный полипептид X0282 идентичен X0281, за исключением того, что он не содержит замен N30Y V55A T70E в последовательности Ск человека. Таким образом, одноцепочечный полипептид X0282 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: моноИЛ-10, измененный Ск человека (без первого Arg или последнего Cys), шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека (N297A), CH3 IgG1 человека, линкер H68 и 3D1 (антитело к CD86) scFv. Последовательности нуклеотида и аминокислот X0282 представлены SEQ ID NO:23 и 24 соответственно.

Молекулы полипептидного гетеродимера были экспрессированы и очищены, как это описано в примере 1. Очищенные белки были проанализированы с использованием электрофореза SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Эксклюзионная хроматография была выполнена на АКТА Explorer FPLC (Pharmacia Biotech) с использованием колонки Superdex200 10/300 GL. Некоторые белки были проанализированы путем масс-спектрометрии с электрораспылением с использованием Agilent 6120 TOF ES/MS.



С использованием Biacore T100 SPR и HBS-P+ (GE Healthcare) в качестве буфера были проведены измерения поверхностного плазменного резонанса (SPR). Мишени были непосредственным образом иммобилизованы на чипе CM5 с использованием стандартных способов образования аминной связи (BIACORE® Amine Coupling Kit, GE Healthcare), при этом финальные уровни иммобилизации составили от 800 до 1900 PE (резонансных единиц). Полипептидный гетеродимер X0283 был введен при 25°C или 37°C в течение 150 с при скорости потока 30 мкл/мин при серии концентраций от 10 нМ до 1 мкМ. Диссоциация отслеживалась в течение 1200 с, и поверхность была регенерирована путем введения 50 мМ NaOH в течение 60 с. Взаимодействия связывания с поверхностью были стабильными в течение по меньшей мере 60 циклов регенерации. Данные были проанализированы с использованием BiaEvaluation для программного обеспечения T100 (версия 2.0, GE Healthcare).

Электрофорез SDS-PAGE и анализ катионообменной хроматографией показали, что полипептидные гетеродимеры X0251, X0252 и X0253 были в достаточной степени хорошо экспрессированы и очищены (фиг. 4). Анализ масс-спектрометрии X0252 показал, что белок в большинстве своем однородный с неопределяемым количеством гомодимеров (фиг. 5). Кроме того, анализы электрофореза SDS-PAGE и катионообменной хроматографии полипептидных гетеродимеров X0283 и X0284 показали, что полипептидный гетеродимер X0283, имеющий домены гетеродимеризации CH1/Ск(YAE), эффективно собирается в гетеродимер в сравнении с контрольным полипептидным гетеродимером X0284, имеющим домены гетеродимеризации CH1/Ск, которые также образуют гомодимеры (фиг. 6). Анализ Biosc дополнително показал, что домен связывания 3D1 (антитело к CD86) на карбоксильном конце одноцепочечного полипептида X0281 одновалентно связывается с CD86 (фиг. 7).

**Пример 3. Полипептидные гетеродимеры со связывающими доменами антитела к RON и антитела к с-MET.**

Был получен двухвалентный полипептидный гетеродимер со связывающими доменами антитела к RON (ORN151) и два биспецифических полипептидных гетеродимера, включающих связывающие домены антитела к RON и антитела к с-Met (ORN152 и ORN153).

Двухвалентный полипептидный гетеродимер ORN151 включает одноцепочечные полипептиды ORN145 (4C04 CH2 CH3 CH1) и ORN148 (11H09 CH2 CH3 Ск(YAE)). Одноцепочечный полипептид ORN145 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 4C04 (антитело к RON) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот ORN145 представлены SEQ ID NO:26 и 30 соответственно. Одноцепочечный полипептид ORN148 включает, начиная от amino-до карбоксильного конца: 11H09 (антитело к RON) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 человека, CH3 человека и Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот ORN148 представлены SEQ ID NO:28 и 32 соответственно.

Биспецифический (с-Met, RON) полипептидный гетеродимер ORN152 включает одноцепочечные полипептиды ORN116 (MET021 CH2 CH3 CH1) и ORN146 (4C04 CH2 CH3 Ск(YAE)). Одноцепочечный полипептид ORN116 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: MET021 (антитело к с-Met) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот ORN116 представлены SEQ ID NO:25 и 29 соответственно. Одноцепочечный полипептид ORN146 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 4C04 (антитело к RON) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 человека, CH3 человека и Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот ORN146 представлены SEQ ID NO:27 и 31 соответственно.

Биспецифический (с-Met, RON) полипептидный гетеродимер ORN153 включает одноцепочечные полипептиды ORN116 (MET021 CH2 CH3 CH1) и ORN148 (11H09 CH2 CH3 Ск(YAE)).

Полипептидные гетеродимеры ORN151, ORN152 и ORN153 были экспрессированы, как это описано в примере 1. Были получены следующие уровни экспрессии: 1,9 мкг белка/мл культуры для ORN151, 3,1 мкг/мл для ORN152 и 4,9 мкг/мл для ORN153.

**Пример 4. Полипептидные гетеродимеры со связывающими доменами антитела к CD3.**

Было получено несколько биспецифических полипептидных гетеродимеров со связывающими доменами антитела к CD3: полипептидные гетеродимеры S0268, S0269, и от TSC020 до TSC030. Полипептидный гетеродимер S0268 включает одноцепочечные полипептиды ORN145 (4C04 CH2 CH3 CH1) и TSC019 (G19-4 CH2 CH3 Ск(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC019 включает, начиная от amino-до карбоксильного конца: G19-4 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 человека, CH3 человека и Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC019 представлены SEQ ID NO:52 и 72 соответственно.

Биспецифический (CD3, с-Met) полипептидный гетеродимер S0269 включает одноцепочечные полипептиды ORN160 (5D5 CH2 CH3 CH1) и TSC019 (G19-4 CH2 CH3 Ск(YAE)). Одноцепочечный полипептид ORN160 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 5D5 (антитело к с-Met) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот ORN160 представлены SEQ ID NO:33 и 53 соответственно.

Двухвалентный (CD19) полипептидный гетеродимер TSC020 включает одноцепочечные полипептиды TSC001 (HD37 CH2 CH3 CH1) и TSC019 (G19-4 CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC001 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC001 представлены SEQ ID NO:34 и 54 соответственно.

Биспецифический (CD20, CD3) полипептидный гетеродимер TSC021 включает одноцепочечные полипептиды TSC002 (2H7 CH2 CH3 CH1) и TSC019 (G19-4 CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC002 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 2H7 (антитело к CD20) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC002 представлены SEQ ID NO:35 и 55 соответственно.

Биспецифический (CD79b, CD3) полипептидный гетеродимер TSC022 включает одноцепочечные полипептиды TSC017 (P2C2 H2 CH3 CH1) и TSC019 (G19-4 CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC017 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: P2C2 (антитело к CD79b) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC017 представлены SEQ ID NO:50 и 70 соответственно.

Биспецифический (HLA-DR, CD3) полипептидный гетеродимер TSC023 включает одноцепочечные полипептиды TSC018 (M0042 CH2 CH3 CH1) и TSC019 (G19-4 CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC018 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: M0042 (антитело к HLA-DR) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC018 представлены SEQ ID NO:51 и 71 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC024 включает одноцепочечные полипептиды TSC010 (HD37-"IgA1 hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC003 (G19-4-"IgA1 hinge"-CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC010 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgA1 человека (PSTPPTPSPSTPPTPSPSCPPCP, SEQ ID NO:752), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC010 представлены SEQ ID NO:43 и 63 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC003 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: C19-4(антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgA1 человека (SEQ ID NO:752), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC003 представлены SEQ ID NO:36 и 56 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC025 включает одноцепочечные полипептиды TSC011 (HD37-"IgA2 hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC004 (G19-4-"IgA2 hinge"-CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC011 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgA2 человека (PPPPCPPPCP, SEQ ID NO:748), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC011 представлены SEQ ID NO:44 и 64 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC004 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4(антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgA2 человека (SEQ ID NO:748), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC004 представлены SEQ ID NO:37 и 57 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC026 включает одноцепочечные полипептиды TSC012 (HD37-"IgG1 hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC007 (G19-4-"IgG1 hinge"-CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC012 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgG1 человека (EPKSSDKTHTSPSPSPCPPCP, SEQ ID NO:750), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC012 представлены SEQ ID NO:45 и 65 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC007 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: C19-4(антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgG1 человека (SEQ ID NO:750), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC007 представлены SEQ ID NO:40 и 60 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC027 включает одноцепочечные полипептиды TSC013 (HD37-"IgG3 hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC005 (G19-4-"IgG3 hinge"-CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC013 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgG3 человека (EPKSSDTPPPSPRSPCPPCP, SEQ ID NO:751), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC013 представлены SEQ ID NO:46 и 66 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC005 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4(антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgG3 человека (SEQ ID NO:751), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC005 представлены SEQ ID NO:38 и 58 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC028 включает одноцепочечные полипептиды

TSC014 (HD37-"IgD hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC006 (G19-4-"IgD hinge"-CH2 CH3 C $\kappa$ (YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC014 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgD человека (ESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKAT-TAPATTRNTCPPCP, SEQ ID NO:754), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC014 представлены SEQ ID NO:47 и 67 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC006 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4 (антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgD человека (SEQ ID NO:754), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и C $\kappa$ (YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC006 представлены SEQ ID NO:39 и 59 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC029 включает одноцепочечные полипептиды TSC015 (HD37-"IgE CH2 hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC008 (G19-4-"IgE CH2 hinge"-CH2 CH3 C $\kappa$ (YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC015 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgE человека (SEQ ID NO:757), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC015 представлены SEQ ID NO:48 и 68 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC008 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4 (антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgE человека (SEQ ID NO:757), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и C $\kappa$ (YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC008 представлены SEQ ID NO:41 и 61 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC030 включает одноцепочечные полипептиды TSC016 (HD37-"IgM CH2 hinge"-CH2 CH3 CH1) и TSC009 (G19-4-"IgM CH2 hinge"-CH2 CH3 C $\kappa$ (YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC016 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, измененный шарнирный участок IgM человека (SEQ ID NO:759), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC016 представлены SEQ ID NO:49 и 69 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC009 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4 (антитело к CD3) scFv, измененный шарнирный участок IgM человека (SEQ ID NO:759), CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и C $\kappa$ (YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC009 представлены SEQ ID NO:42 и 62 соответственно.

Биспецифические полипептидные гетеродимеры S0268 (RON, CD3) и S0269 (CD3, c-Met) были экспрессированы, как это описано в примере 1. Были получены следующие уровни экспрессии: 2,2 мкг белка/мл культуры для S0268 и 2,7 мкг/мл для S0269.

Пример 5. Связывание клеток биспецифическими полипептидными гетеродимерами.

Для сравнения эффективности молекул биспецифического полипептидного гетеродимера при связывании с антигеном опухолевой клетки и Т-клетками, были сопоставлены характеристики связывания на клетке полипептидного гетеродимера S0268 относительно антитела к RON (связывающий домен 4C04)  $\times$  антитела к CD3 (связывающий домен G19-4) (как это описано в примере 4) с различными биспецифическими скаффолд-белками (SCORPION<sup>TM</sup>), содержащими те же самые связывающие домены, что и S0266. Кроме того, были сопоставлены характеристики связывания на клетке двух биспецифических полипептидных гетеродимеров TSC020 и TSC021 (как это описано в примере 4), связывающихся с различными антигенами В-клетки (CD19 для TSC020 и CD20 для TSC021), а также антигеном Т-клетки (CD3). Последовательности нуклеотида и аминокислот белка SCORPION S0266 представлены SEQ ID NO:73 и 74 соответственно. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности одноцепочечных полипептидов, составляющих биспецифические полипептидные гетеродимеры S0268, TSC020 и TSC021, имеют последовательность SEQ ID NOS:26 и 52 (нуклеотид), 30 и 72 (аминокислоты); 34 и 52 (нуклеотид), 54 и 72 (аминокислоты); и 35 и 52 (нуклеотид), 55 и 72 (аминокислоты) соответственно (см. также пример 4). Временная трансфекция клеток человека 293 привела к получению 6,9 мкг белка/мл культуры для S0266; 2,3 мкг/мл культуры для S0268; 3,0 мкг/мл культуры для TSC020; и 3,2 мкг/мл культуры для TSC021.

Из ATCC (Manassas, VA) были получены клетки карциномы молочной железы MDA-MB-453 (RON<sup>+</sup>), клетки лимфомы мантийной зоны Rec1 (CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>) и клетки Jurkat (CD3<sup>+</sup>) Т-клеточного лейкоза, которые затем были культивированы в соответствии с предоставленным протоколом. Т-клетки были выделены из МКПК донора с использованием набора Pan T-cell Isolation Kit II, предоставленного Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). Клетки, не являющиеся Т-клетками, были отделены от МКПК путем непрямого магнитного мечения с использованием биотин-конъюгированных моноклональных антител и антибиотинных магнитных микрогранул. Затем такие клетки были обеднены путем нахождения в колонке, окруженной магнитным полем. Т-клетки не сохранялись в колонке и были собраны в потоке.

Связывание оценивали путем инкубации  $5 \times 10^5$  Т-клеток или клеток-мишеней (MDA-MB-453, Rec1, Jurkat) в течение 30 мин при 4°C с использованием серийно разведенных биспецифических молекул S0266 ( $\alpha$  RON  $\times$   $\alpha$  CD3 SCORPION<sup>TM</sup> белок) или S0268 ( $\alpha$  RON  $\times$   $\alpha$  CD3 полипептидный гетеродимер) (для клеток MDA-MB-453 и выделенных Т-клеток); или TSC020 ( $\alpha$  CD19  $\times$   $\alpha$  CD3) или TSC021 ( $\alpha$  CD20  $\times$   $\alpha$  CD3) для клеток Rec1 и Jurkat в концентрациях от 100 до 0,1 нМ. Клетки были промыты трижды и затем инкубированы с антителом козы к IgG-FITC (разведение 1:200) в течение дополнительных 30 мин

при 4°C. Затем клетки были промыты снова трижды, фиксированы в 1% параформальдегиде и проанализированы с использованием инструмента FACS-Calibur.

Анализ FSC high, SSC high subset в программе FlowJo v7.5 (Tree Star, Inc, Ashland, OR) показал дозозависимое связывание биспецифических молекул S0266 и S0268 с MDA-MB-453 и изолированными Т-клетками (фиг. 8А и 8В). Неожиданным было то, что полипептидный гетеродимер S0268 связывался с похожей аффинностью с сопоставимой молекулой SCORPION™ (S0266) на клетках MDA-MB-453 и Т-клетках, однако у него отсутствовал какой-либо потенциал avidности. Для полипептидного гетеродимера также отмечалось более высокое насыщение в обоих типах клеток-мишеней, что может объяснять связывание полипептидного гетеродимера при большем стехиометрическом показателе (1:1 связывание полипептидного гетеродимера с поверхностным антигеном), чем эквивалентный белок SCORPION™ (потенциал связывания 1:2 двухвалентного белка Scorpion с поверхностными антигенами). Сравнение биспецифического гетеродимера, связывающегося с CD19 (TSC020; связывающие домены HD37 и G19-4), и биспецифического гетеродимера, связывающегося с CD20 (TSC021; связывающие домены 2H7 и G19-4), на клетках Rec1 и Jurkat выявило, что гетеродимер TSC020 обладает большей аффинностью относительно клеток Rec1, чем гетеродимер TSC021 (фиг. 9А). Однако оба гетеродимера TSC020 и TSC021 обладали подобным связыванием с клетками CD3<sup>+</sup> Jurkat, что и ожидалось, поскольку оба гетеродимера обладают одним и тем же связывающим доменом к антителу CD3 (G19-4) (фиг. 9В).

Пример 6. Дополнительные двухвалентные и трехвалентные полипептидные гетеродимеры с использованием одной пары доменов гетеродимеризации.

Были получены дополнительные мультиспецифические гетеродимеры: TSC046, TSC047, TSC048, TSC054, TSC055, TSC056, TSC057, TSC078, TSC079, TSC080, TSC099, TSC100, TSC101 и TSC102.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC046 включает одноцепочечные полипептиды TSC001 (HD37 CH2 CH3 CH1) и TSC039 (BMA031 CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC001 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC001 представлены SEQ ID NO:34 и 54 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC039 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: BMA031 (антитело к TCR) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC039 представлены SEQ ID NO:793 и 811 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC047 включает одноцепочечные полипептиды TSC001 (HD37 CH2 CH3 CH1) и TSC041 (CRIS7 CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC041 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: CRIS7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC041 представлены SEQ ID NO:794 и 812 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC048 включает одноцепочечные полипептиды TSC001 (HD37 CH2 CH3 CH1) и TSC043 (OKT3-М CH2 CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC043 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: OKT3-М (вариант Micromet антитела к CD3, см. также патент США 7635472) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC043 представлены SEQ ID NO:795 и 813 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC054 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC053 (G19-4 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC049 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека (т.е. CH2 IgG1 человека с заменами L234A, L235A, G237A, E318A, K320A и K322A), CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC049 представлены SEQ ID NO:796 и 814 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC053 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека (т.е. CH2 IgG1 человека с заменами L234A, L235A, G237A, E318A, K320A и K322A), CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC053 представлены SEQ ID NO:800 и 818 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC055 включает одноцепочечные полипептиды TSC050 (2H7 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC053 (G19-4 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC050 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 2H7 (антитело к CD20) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC050 представлены SEQ ID NO:797 и 815 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC056 включает одноцепочечные полипептиды TSC051 (P2C2 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC053 (G19-4 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC051 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: P2C2 (ан-

титело к CD79) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC051 представлены SEQ ID NO:798 и 816 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC057 включает одноцепочечные полипептиды TSC052 (5D5 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC053 (G19-4 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC052 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 5D5 (антитело к cMet) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC052 представлены SEQ ID NO:799 и 817 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC078 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC076 (OKT3 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC076 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: OKT3 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC076 представлены SEQ ID NO:802 и 820 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC079 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC077 (Nuvion CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC077 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: Nuvion (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC077 представлены SEQ ID NO:803 и 821 соответственно.

Трехвалентный полипептидный гетеродимер TSC080 включает одноцепочечные полипептиды TSC001 (HD37 CH2 CH3 CH1) и TSC064 (G19-4 CH2 CH3 Cκ(YAE) H75 Met021). Одноцепочечный полипептид TSC064 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: G19-4 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2 IgG1 человека, CH3 IgG1 человека, Cκ(YAE) человека, линкер H75 и Met021 (антитело к c-Met) scFv (с тремя удаленными остатками серина на C-конце). Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC064 представлены SEQ ID NO:801 и 819 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC099 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC097 (4C04 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC097 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: 4C04 (антитело к RON) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC097 представлены SEQ ID NO:808 и 826 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC100 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC093 (CRIS7 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC093 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: CRIS7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC093 представлены SEQ ID NO:804 и 822 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC101 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC094 (OKT3-M CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC094 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: OKT3-M (вариант Micromet антитела к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC094 представлены SEQ ID NO:805 и 823 соответственно.

Двухвалентный полипептидный гетеродимер TSC102 включает одноцепочечные полипептиды TSC049 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC095 (BMA031 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC095 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: BMA031 (антитело к TCR) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC095 представлены SEQ ID NO:806 и 824 соответственно.

Молекулы полипептидного гетеродимера были экспрессированы и очищены, как это описано в примере 1.

Пример 7. Мишень-опосредованная пролиферация Т-клеток с использованием полипептидных гетеродимеров.

Для сравнения эффективности различных молекул биспецифических полипептидных гетеродимеров на предмет индуцирования мишень-зависимой активации и пролиферации Т-клеток, были сопоставлены три разных биспецифических молекулы (TSC054, TSC078 и TSC079, как это описано в примере 6) с общим связывающим доменом антитела к CD19 (HD37) и тремя различными связывающими доменами антитела к CD3 (G19-4 для TSC054, OKT3 для TSC078, HuM291 для TSC079). В качестве положительного контроля также была приготовлена биспецифическая молекула, захватывающая Т-клетки (BiTE), из-

вестная как bsc19×3 (см. патент США 7635472). Последовательности нуклеотида и аминокислот bsc19×3 представлены SEQ ID NO:809 и 827 соответственно. Временная трансфекция клеток 293 человека привела к 2,33 мкг/мл белка для TSC054, 0,67 мкг/мл белка для TSC078 и 3,5 мкг/мл для TSC079.

Клетки Дауди лимфомы Беркитта (CD19<sup>+</sup>) и клетки карциномы молочной железы MDA-MB-453 (CD19<sup>-</sup>) были получены у ATCC (Manassas, VA) и культивированы согласно представленному протоколу. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) были выделены из крови человека с использованием стандартных фиколл-градиентов. Выделенные клетки были промыты в физиологическом буфере. Т-клетки были дополнительно изолированы с использованием набора для изоляции Т-клеток Pan T-cell Isolation Kit II производства Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) с использованием протокола производителя (для более детальной информации см. также пример 5).

Пролиферация была оценена путем мечения выделенных МКПК или популяций Т-клеток карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидиловым эфиром (CFSE). МКПК или Т-клетки, меченные CFSE, были помещены в U-образный 96-луночный планшет в концентрациях 150000 или 100000 клеток/луночка, соответственно, с различным количеством опухолевых клеток для достижения соотношения Т-клеток к опухолевым клеткам от 10:1 до 3:1. Концентрации исследуемых молекул, варьирующие от 8 нМ до 0,08 пМ, были добавлены к клеточным смесям в общем объеме 200 мкл/луночка в среде RPMI 1640, дополненной 10% сыворотки человека или крупного рогатого скота, натрия пирувата и неосновными аминокислотами. Планшеты были инкубированы при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> во влажных камерах. Спустя 3 дня клетки были мечены антителами для анализа способом проточной цитометрии. Клетки были помечены и промыты в оригинальных планшетах для сведения к минимуму потери клеток во время переносов, и все процедуры мечения проводили в физиологическом буфере с 0,2% альбумина бычьей сыворотки. Вначале клетки были предварительно инкубированы с 100 мкг/мл IgG человека при комнатной температуре в течение 15 мин. Впоследствии клетки были инкубированы со смесью (общий объем 50 мкл) следующих меченых красителем антител: CD5-PE, CD4-APC, CD8-Pacific Blue, CD25-PE-Cy7, а также 7-аминоактиномицин D (далее по тексту 7AAD) в течение 40 мин. Планшеты были дважды промыты, ресуспендированы в объемах от 80 до 120 мкл и немедленно пропущены через проточный цитометр BD LSR II для получения 80% содержания в каждой лунке. Файлы образцов были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo для расчета процентных показателей и количеств клеток, которые могут подлежать по меньшей мере одному делению клеток, согласно их профилю CFSE, путем последовательного пропуска через активированные, живые CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетки (7AAD-, CD5<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> или 7AAD-CD5<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> соответственно). Средние значения и стандартные отклонения были рассчитаны с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Графики были построены с использованием программ Microsoft Excel или Graphpad Prism.

Анализ живых популяций CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> из клеток Дауди или клеток MDA-MB-453, обработанных МКПК цельной крови (фиг. 10A-10D), выявил существенное увеличение общего количества клеток и процента пролиферирующих клеток в присутствии клеток Дауди, имеющих антиген-мишень CD19 (фиг. 10A, 10B), но и недостаточную пролиферацию в присутствии клеток MDA-MB-453 с отсутствием антигена CD19 (фиг. 10C, 10D). При пониженном уровне для клеток MDA-MB-453 и МКПК цельной крови отмечалась незначительная пролиферация, т.к. в МКПК присутствовали В-клетки (CD19<sup>+</sup>), однако при сравнении общая пролиферация была, по существу, снижена. Такая избирательность отмечалась также для выделенных Т-клеток. Пролиферация была выше для Т-клеток в сравнении с CD4<sup>+</sup> Т-клетками в присутствии клеток Дауди или клеток MDA-MB-453, обработанных МКПК (фиг. 10A -10D), и пролиферация, индуцированная TSC078 (HD37× OKT3) была обычно выше при всех концентрациях, чем ответ, индуцируемый TSC054 (HD37× G19-4) или TSC079 (HD37× HuM291) (фиг. 10A-10D). Индуцируемая пролиферация CD4<sup>+</sup> Т-клеток была ниже во всех случаях для TSC054, TSC078 и TSC079, чем BiTE bsc19×3 (фиг. 10A), однако TSC078 и TSC079 имели больший показатель индуцирования пролиферации CD8<sup>+</sup> клеток при низших концентрациях (например, 5 пМ), чем молекулы BiTE (фиг. 10B).

Пример 8. Перенаправленная цитотоксичность Т-клеток, обусловленная полипептидными гетеродимерами.

Для сравнения эффективности различных молекул биспецифических полипептидных гетеродимеров при индуцировании мишень-опосредованной Т-клеточной цитотоксичности, в ходе анализа высвобождения хрома (<sup>51</sup>Cr) было сопоставлено четыре разные биспецифические молекулы. Было протестировано три разных биспецифических молекулы (TSC054, TSC078, TSC079, как это описано в примере 6) с общим связывающим доменом антитела к CD19 (HD37) и тремя разными связывающими доменами антитела к CD3 (G19-4 для TSC054, OKT3 для TSC078, HuM291 для TSC079) вместе с четвертой биспецифической молекулой (S0268, описано в примере 4) со связывающим доменом антитела к RON (4C04) и связывающим доменом антитела к CD3 (G19-4). Временная трансфекция клеток 293 человека привела к примерно 2,33 мкг/мл белка для TSC054, примерно 0,67 мкг/мл белка для TSC078 и примерно 3,5 мкг/мл для TSC079.

Клетки Дауди лимфомы Беркитта (CD19<sup>+</sup>, RON<sup>-</sup>) и клетки ВхРС-3 (CD19<sup>-</sup>, RON<sup>+</sup>) были получены у ATCC (Manassas, VA) и культивированы согласно представленному протоколу. Мононуклеарные клет-

ки периферической крови человека (МКПК) были выделены из крови человека с использованием стандартных фиколл-градиентов. Выделенные клетки были промыты в физиологическом буфере. Т-клетки были дополнительно изолированы с использованием набора для изоляции Т-клеток Pan T-cell Isolation Kit II производства Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) с использованием протокола производителя (для более детальной информации см. также пример 5).

Цитотоксичность была оценена в ходе анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$ . Примерно  $5 \times 10^6$  клеток Дауди или клеток ВхРС-3 были обработаны 0,3 мКи  $^{51}\text{Cr}$  и инкубированы в течение 75 мин при 37°C. Спустя 75 минут клетки были промыты 3 раза с использованием среды (RPMI + 10% FBS) и ресуспендированы в 11,5 мл среды. Из этой суспензии в каждую лунку 96-луночного U-образного планшета было распределено 50 мкл (примерно 20000 клеток/лунка). Концентрации биспецифических молекул, варьирующие от 10 нМ до 0,1 пМ, были добавлены к клеткам-мишеням (Дауди, ВхРС-3), приводя общий объем к показателю 100 мкл/лунка. Клетки-мишени были инкубированы при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем 100 мкл выделенных Т-клеток (примерно 200000) было добавлено для приведения соотношения Т-клеток к клеткам-мишеням 10:1. 50 мкл 0,8% NP-40 было добавлено в контрольную лунку, содержащую клетки-мишени, оставлено на 15 мин, и затем для обеспечения контроля общего лизиса было добавлено 100 мкл среды.

Лунки были инкубированы в течение 4 ч, подвергнуты центрифугированию при 1500 об/мин в течение 3 мин, и 25 мкл супернатанта было перенесено из каждой лунки в соответствующую лунку 96-луночного планшета Luma с образцами. Планшеты с образцами были высушены на воздухе под химически безопасным колпаком в течение 18 ч, и затем с использованием счетчика сцинтилляции Topcount и стандартного протокола была оценена радиоактивность.

Анализ данных цитотоксичности показал отсутствующую цитотоксичность относительно мишеней на клетках Дауди (RON-) из направленной биспецифической молекулы S0268 антитела к RON (фиг. 11A). Подобным образом, отсутствовала прямая цитотоксичность, наблюдаемая при обработке клеток Дауди TSC054 в отсутствие Т-клеток (фиг. 11A). Однако для Дауди клеток в присутствии Т-клеток и биспецифической молекулы, направленной относительно антитела к CD19 (TSC054), отмечалась сильная и направленная относительно Т-клеток цитотоксичность, достигнув максимального лизиса в концентрации между 10 и 100 пМ (фиг. 11A). Подобным образом, с использованием второго донора Т-клеток (фиг. 11B), цитотоксичность относительно мишени для клеток ВхРС-3 (CD19-) отсутствовала в сравнении с биспецифическими молекулами TSC054, TSC078 или TSC079 к антителу CD19 или BiTE bsc19×3 к антителу CD19. Биспецифическая молекула S0268 относительно антитела к RON индуцировала цитотоксичность в клетках ВхРС-3 (RON+), достигнув максимума между 10 и 100 пМ (фиг. 11B).

Пример 9. Модуляция мишень-опосредованной пролиферации Т-клеток, вызванной полипептидными гетеродимерами с измененными последовательностями шарнирного участка.

Для сравнения эффективности различных биспецифических молекул полипептидных гетеродимеров с измененными последовательностями шарнирного участка при индуцировании мишень-опосредованной активации и пролиферации Т-клеток было сопоставлено шесть различных биспецифических гетеродимеров (TSC100, TSC127, TSC165, TSC166, TSC167 и TSC168 с общим связывающим доменом антитела к CD19 (HD37), общим связывающим доменом антитела к CD3 (Cris7) и пятью различными шарнирными участками (шарнирный участок SCC-P IgG1 для TSC100 и TSC127, шарнирный участок IgA2 для первого участка Вал, присоединенного к основному шарнирному участку человека IgG1 для TSC165, шарнирный участок SSS-P IgG1, присоединенный к основному шарнирному участку человека IgG1 для TSC166, участок мутированного шарнирного участка IgG3, присоединенного к основному шарнирному участку IgG1 для TSC167, и домен CH2 IgM без первого Вал, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 для TSC168).

Более специфически, биспецифический гетеродимер TSC100 описан в примере 6.

Биспецифический гетеродимер TSC127 включает одноцепочечные полипептиды TSC125 (Cris7 CH2(ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC096 (HD37 CH2(ADCC/CDC null) CH3 Ск(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC125 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC125 представлены SEQ ID NO:865 и 874 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC096 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC096 представлены SEQ ID NO:807 и 825 соответственно.

Биспецифический гетеродимер TSC165 включает одноцепочечные полипептиды TSC157 (Cris7 IgA2UH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC161 (HD37 IgA2UH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 Ск(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC157 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок IgA2 человека без первого Вал, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC157 пред-

ставлены SEQ ID NO:866 и 875 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC161 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок IgA2 человека без первого Вал, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC161 представлены SEQ ID NO:870 и 879 соответственно. Аминокислотная последовательность шарнирного участка, используемого в TSC157 и TSC161, представлена в SEQ ID NO:748.

Биспецифический гетеродимер TSC166 включает одноцепочечные полипептиды TSC158 (Cris7 IgG1miniUH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC162 (HD37 IgG1miniUH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC158 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SSC-P IgG1, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC158 представлены SEQ ID NO:867 и 876 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC162 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SSC-P IgG1, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC162 представлены SEQ ID NO:871 и 880. Аминокислотная последовательность шарнирного участка, используемого в TSC158 и TSC162, представлена в SEQ ID NO:750.

Биспецифический гетеродимер TSC167 включает одноцепочечные полипептиды TSC159 (Cris7 IgG3UH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC163 (HD37 IgG3UH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC159 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, участок мутированного шарнирного участка IgG3, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC159 представлены SEQ ID NO:868 и 877 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC163 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, участок мутированного шарнирного участка IgG3 человека, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC163 представлены SEQ ID NO:872 и 881. Аминокислотная последовательность шарнирного участка, используемого в TSC159 и TSC163, представлена в SEQ ID NO:751.

Биспецифический гетеродимер TSC168 включает одноцепочечные полипептиды TSC160 (Cris7 IgMCH2UH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 CH1) и TSC164 (HD37 IgMCH2UH CH2 (ADCC/CDC null) CH3 Cκ(YAE)). Одноцепочечный полипептид TSC160 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок CH2 IgM человека без первого Вал, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и CH1 IgG1 человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC160 представлены SEQ ID NO:869 и 878 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC163 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок CH2 IgM человека без первого Вал, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека, CH2 (ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 IgG1 человека и Cκ(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC164 представлены SEQ ID NO:873 и 882. Аминокислотная последовательность шарнирного участка, используемого в TSC160 и TSC164, представлена в SEQ ID NO:759.

В качестве положительного контроля также была приготовлена биспецифическая молекула, захватывающая Т-клетки (BiTE), известная как bsc19×3 (см. патент США 7635472). Последовательности нуклеотида и аминокислот bsc19×3 представлены SEQ ID NO:809 и 827 соответственно.

Временная трансфекция клеток 293 человека привела к образованию 3,2 мкг белка/мл культуры для TSC100, 6,1 мкг белка/мл культуры для TSC127, 4,8 мкг белка/мл культуры для TSC165, 6,2 мкг белка/мл культуры для TSC166, 6,4 мкг белка/мл культуры для TSC167 и 6,4 мкг белка/мл культуры для TSC168.

Клетки Дауди лимфомы Беркитта (CD19<sup>+</sup>) и C4-2 (CD19<sup>-</sup>) клетки карциномы предстательной железы были получены у ATCC (Manassas, VA) и MD Anderson Cancer Center (Houston, TX) и культивированы согласно представленному протоколу. Т-клетки были изолированы с использованием набора для изоляции Т-клеток Pan T-cell Isolation Kit II производства Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) с использованием протокола производителя (для более детальной информации см. также пример 5).

Пролиферация была оценена путем мечения выделенных популяций Т-клеток карбоксифлуоресцеин диацетат сукцинимидиловым эфиром (CFSE). CFSE-меченые Т-клетки были высеваны в U-образные 96-луночные планшеты в концентрации 100000 клеток/луночка в присутствии 10000 опухолевых клеток/луночка для достижения соотношения Т-клеток к опухолевым клеткам 10:1. Концентрации исследуемых молекул, варьирующие от 5 нМ до 0,005 пМ, были добавлены к клеточным смесям в общем объеме 200 мкл/луночка в среде RPMI 1640, дополненной 10% сыворотки человека или крупного рогатого скота, натрия пирувата и неосновными аминокислотами. Планшеты были инкубированы при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> во влажных камерах. Спустя 3 дня клетки были мечены антителами для анализа способом проточной цито-



метрии. Клетки были помечены и промыты в оригинальных планшетах для сведения к минимуму потери клеток во время переносов, и все процедуры мечения проводили в физиологичном буфере с 0,2% альбумина бычьей сыворотки. Вначале клетки были предварительно инкубированы с 100 мкг/мл IgG человека при комнатной температуре в течение 15 мин. Впоследствии клетки были инкубированы со смесью (общий объем 50 мкл) следующих меченых красителем антител: CD5-PE, CD4-APC, CD8-Pacific Blue, CD25-PE-Cy7, а также 7-аминоактиномицин D (далее по тексту 7AAD) в течение 40 мин. Планшеты были дважды промыты, ресуспендированы в объемах от 80 до 120 мкл и немедленно пропущены через точный цитометр BD LSRII для получения 80% содержания в каждой лунке. Файлы образцов были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo для расчета процентных показателей и количеств клеток, которые могут подлежать по меньшей мере одному делению клеток, согласно их профилю CFSE, путем последовательного пропуска через активированные, живые CD4+ или CD8+ Т-клетки (7AAD-, CD5+ CD25+ CD4+ или 7AAD- CD5+ CD25+ CD8+ соответственно). Средние значения и стандартные отклонения были рассчитаны с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Графики были построены с использованием программ Microsoft Excel или Graphpad Prism.

Анализ живых популяций CD4+ и CD8+ из клеток Дауди или клеток C4-2, обработанных выделенными Т-клетками, выявил существенное увеличение общего количества клеток и процента пролиферирующих клеток в присутствии клеток Дауди, имеющих антиген-мишень CD19, но и недостаточную пролиферацию в присутствии клеток C4-2 с отсутствием антигена CD19 (фиг. 12). Пролиферация CD8+ клеток была очень подобна таковой для биспецифических молекул с шарнирным участком IgG1 по умолчанию (TSC100), а также с более длинными шарнирными участками (TSC166, TSC167, TSC168). Незначительно повышенная пролиферация при низких концентрациях отмечалась для биспецифических молекул с более коротким верхним шарнирным участком IgA2 (TSC165). Подобная, но более значимая разница отмечалась относительно пролиферации CD4+ клеток, при этом молекула, содержащая более короткий шарнирный участок IgA2 (TSC165), имела большую пролиферацию при большинстве концентраций, чем стандартный шарнирный участок IgG1 (TSC100), а молекулы с более длинными шарнирными участками (TSC166, TSC167, TSC168) имели более низкую пролиферацию.

Для подтверждения различной активности шарнирного участка IgA2 был проведен второй эксперимент по пролиферации с титрацией более низких концентраций белка (фиг. 13), сравнивая биспецифическую молекулу с шарнирным участком IgA2 (TSC165) относительно разных промышленных партий биспецифических молекул с шарнирным участком IgG1 по умолчанию (TSC127) и молекулой bsc19×3 BiTE. Подобно предыдущему эксперименту, относительно пролиферации CD8+ клеток отмечалось меньшее варьирование, при этом TSC165 характеризовался сопоставимой или большей индукцией пролиферации относительно bsc19×3, что, в свою очередь, было незначительно выше или сопоставимо с пролиферацией TSC127. Опять-таки, подобно предыдущему эксперименту, такие тенденции повторялись в повышающемся порядке относительно пролиферации CD4+ клеток, при этом для TSC165 и bsc19×3 отмечалась сопоставимая пролиферация, которая, в свою очередь, была заметно больше, чем для TSC127.

Пример 10. Модуляция повторной мишень-опосредованной цитотоксичности Т-клеток, вызванной вызванной полипептидными гетеродимерами с измененными последовательностями шарнирного участка.

Для сравнения эффективности изменения композиции шарнирных участков молекул биспецифических полипептидных гетеродимеров при индуцировании мишень-опосредованной Т-клеточной цитотоксичности, в ходе анализа высвобождения хрома ( $^{51}\text{Cr}$ ) было сопоставлено пять разных биспецифических молекул. Было сопоставлено пять разных биспецифических молекул (TSC100, TSC165, TSC166, TSC167 и TSC168, как это описано в примере 9) с общим связывающим доменом антитела к CD19 (HD37), общим связывающим доменом антитела к CD3 (Cris7) и пятью различными шарнирными участками (шарнирный участок SCC-P IgG1 для TSC100 и TSC127, шарнирный участок IgA2 без первого Вал, присоединенного к основному шарнирному участку человека IgG1 для TSC165, шарнирный участок SSS-P IgG1, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 человека для TSC166, участок мутированного шарнирного участка IgG3, присоединенного к основному шарнирному участку IgG1 для TSC167, и домен CH2 IgM без первого Вал, присоединенный к основному шарнирному участку IgG1 для TSC168).

Клетки Дауди лимфомы Беркитта (CD19+, RON-) были получены у ATCC (Manassas, VA) и культивированы согласно представленному протоколу. Т-клетки были изолированы с использованием набора для изоляции Т-клеток Pan T-cell Isolation Kit II производства Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) с использованием протокола производителя (для более детальной информации см. также пример 5).

Цитотоксичность была оценена в ходе анализа высвобождения  $^{51}\text{Cr}$ . Примерно  $5 \times 10^6$  клеток Дауди были обработаны 0,3 мКи  $^{51}\text{Cr}$  и инкубированы в течение 75 мин при 37°C. Спустя 75 мин клетки были промыты 3 раза с использованием среды (RPMI + 10% FBS) и ресуспендированы в 11,5 мл среды. Из этой суспензии в каждую лунку 96-луночного U-образного планшета было распределено 50 мкл (примерно 20000 клеток/лунка). Концентрации биспецифических молекул, варьирующие от 10 нМ до 0,1 пМ, были добавлены к клеткам-мишеням (Дауди), приведя общий объем к показателю 100 мкл/лунка. Клет-

ки-мишени были инкубированы при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем 100 мкл выделенных Т-клеток (примерно 200000) были добавлены для приведения соотношения Т-клеток к клеткам-мишеням 10:1. 50 мкл 0,8% NP-40 было добавлено в контрольную лунку, содержащую клетки-мишени, оставлено на 15 мин и затем для обеспечения контроля общего лизиса было добавлено 100 мкл среды.

Лунки были инкубированы в течение 4 ч, подвергнуты центрифугированию при 1500 об/мин в течение 3 мин и 25 мкл супернатанта было перенесено из каждой лунки в соответствующую лунку 96-луночного планшета Luma с образцами. Планшеты с образцами были высушены на воздухе под химически безопасным колпаком в течение 18 ч, и затем с использованием счетчика сцинтилляции Topcount и стандартного протокола была оценена радиоактивность.

Анализ данных цитотоксичности показал сильную и направленную цитотоксичность Т-клеток относительно клеток Дауди в присутствии Т-клеток и биспецифических молекул относительно антитела к CD19 (TSC100-TSC168), достигнув максимального лизиса в концентрации между 5 и 50 пМ (фиг. 14). Подобно тенденциям, наблюдаемым в примере 9, биспецифическая молекула с более коротким верхним шарнирным участком IgA2 (TSC165) обладала сопоставимой или большей цитотоксичностью относительно молекулы со стандартным верхним шарнирным участком IgG1 (TSC100), в то время как молекулы с более длинными верхними шарнирными участками (TSC166, TSC167, TSC168) обладали меньшей потенцией при индуцировании цитотоксичности.

Пример 11. Биспецифические гетеродимеры с вариациями линкера CH3-CH1 и CH3-Ск.

Были получены следующие биспецифические гетеродимеры с линкерными вариациями CH3-CH1 и CH3-Ск.

Биспецифический гетеродимер TSC151 включает одноцепочечные полипептиды TSC145 и TSC148. Одноцепочечный полипептид TSC145 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека CH2(ADCC/CDC null), IgG1 человека, CH3 человека и CH1 IgG1 человека. CH3 человека и CH1 IgG1 человека присоединены линкером с последовательностью GGGSS (SEQ ID NO:847). Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC145 представлены SEQ ID NO:853 и 859 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC148 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) человека, CH3 человека и Ск(YAE) человека. CH3 человека и Ск(YAE) человека присоединены посредством линкера с последовательностью GGGSR (SEQ ID NO:850), в которой R может в некоторых случаях быть представлен первым аргинином Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC148 представлены SEQ ID NO:856 и 862 соответственно.

Биспецифический гетеродимер TSC152 включает одноцепочечные полипептиды TSC146 и TSC149. Одноцепочечный полипептид TSC146 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) IgG1 человека, CH3 человека и CH1 IgG1 человека. CH3 человека и CH1 IgG1 человека присоединены линкером с последовательностью SYSPNS (SEQ ID NO:848). Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC146 представлены SEQ ID NO:854 и 860 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC149 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) человека, CH3 человека и Ск(YAE) человека. CH3 человека и Ск(YAE) человека присоединены посредством линкера с последовательностью SYSPNSR (SEQ ID NO:851), в которой R может в некоторых случаях быть представлен первым аргинином Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC149 представлены SEQ ID NO:857 и 863 соответственно.

Биспецифический гетеродимер TSC153 включает одноцепочечные полипептиды TSC147 и TSC150. Одноцепочечный полипептид TSC147 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: гуманизированный Cris7 (антитело к CD3) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) человека, CH3 человека и CH1 IgG1 человека. CH3 человека и CH1 IgG1 человека присоединены линкером с последовательностью SSLNTPNS (SEQ ID NO:849). Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC147 представлены SEQ ID NO:855 и 861 соответственно. Одноцепочечный полипептид TSC150 включает, начиная от amino- до карбоксильного конца: HD37 (антитело к CD19) scFv, шарнирный участок SCC-P IgG1 человека, CH2(ADCC/CDC null) человека, CH3 человека и Ск(YAE) человека. CH3 человека и Ск(YAE) человека присоединены посредством линкера с последовательностью SSLNTPNSR (SEQ ID NO:852), в которой R может в некоторых случаях быть представлен первым аргинином Ск(YAE) человека. Последовательности нуклеотида и аминокислот TSC150 представлены SEQ ID NO:858 и 864 соответственно.

Биспецифические гетеродимеры были экспрессированы, как это описано в примере 1. Были получены следующие уровни экспрессии: 9,2 мкг белка/мл культуры для TSC151, 11,2 мкг белка/мл культуры для TSC152 и 14,7 мкг белка/мл культуры для TSC153. В сравнении с этим, примерно 6 мкг белка/мл культуры было получено для гетеродимеров с линкером CH3-CH1 и CH3-Ск с аминокислотной последовательностью KSR (SEQ ID NO:846).

Описанные выше различные варианты воплощения изобретения могут быть скомбинированы для получения дополнительных вариантов воплощения изобретения. Все патенты США, публикации заявок на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, заявки на иностранные патенты и непатентные заявки, указанные в тексте данной заявки и/или перечисленные в инструкции по применению, включены сюда во всей своей полноте посредством ссылок. Аспекты вариантов воплощения изобретения могут быть модифицированы, если это необходимо для концепций применения различных патентов, заявок и публикаций для обеспечения дополнительных вариантов воплощения изобретения.

Эти и другие изменения могут быть введены в варианты воплощения изобретения в свете указанных выше подробных описаний. В целом, в представленной ниже формуле изобретения используемые термины не предназначены для ограничения формулы изобретения специфическими вариантами воплощения изобретения, описанными в тексте заявки и формуле изобретения, однако должны включать все возможные варианты воплощения изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, к которым применимы отдельные формулы изобретения. В соответствии с этим, формула изобретения не ограничивается текстом данной заявки.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Полипептидный гетеродимер, включающий:

(а) первый одноцепочечный полипептид (SCP-I), включающий от одного до четырех связывающих доменов, которые специфически связываются с 0-4 мишенями, шарнирный участок (H-I), домен гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-I), и домен CH2 иммуноглобулина, и домен CH3 иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD или любую их комбинацию (CH2CH3-I); и

(б) второй одноцепочечный полипептид (SCP-II), включающий от нуля до четырех связывающих доменов, которые специфически связываются с 0-4 мишенями, шарнирный участок (H-II), домен гетеродимеризации иммуноглобулина (HD-II), и домен CH2 иммуноглобулина, и домен CH3 иммуноглобулина IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD или любую их комбинацию (CH2CH3-II); где

(i) домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) преимущественно связываются друг с другом с образованием полипептидного гетеродимера, состоящего из первого одноцепочечного полипептида (SCP-I) и второго одноцепочечного полипептида (SCP-II), и

(1) домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок CH1 иммуноглобулина, и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок CL иммуноглобулина, или

(2) домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок CL иммуноглобулина, и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок иммуноглобулина CH1; и

(ii) при этом первый участок CL представляет собой участок Ск, который представляет собой измененный участок Ск иммуноглобулина человека, в котором одна или более аминокислот участка Ск человека дикого типа заменены в положениях N29, N30, Q52, V55, T56, S68 или T70,

при условии, что полипептидный гетеродимер включает по меньшей мере два связывающих домена (BD1 и BD2), которые специфически связываются по меньшей мере с двумя различными мишенями.

2. Полипептидный гетеродимер по п.1, отличающийся тем, что связывающие домены представляют собой одноцепочечные полипептиды Fv (scFv).

3. Полипептидный гетеродимер по п.1, отличающийся тем, что указанный полипептидный гетеродимер включает три связывающих домена (BD1, BD2 и BD3), четыре связывающих домена (BD1, BD2, BD3 и BD4) или от пяти до восьми связывающих доменов.

4. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере один связывающий домен представляет собой агонист ИЛ-10, HLA-G, HGF, ИЛ-35, PD-1, BTLA, TNFR1, TNFR2, DR4, DR5, TWEAKR или FAS.

5. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере один связывающий домен специфически связывается с комплексом TCR или его компонентом и по меньшей мере один другой связывающий домен специфически связывается с PCMA, CD79b, CD19, HLA-DR, CD20, RON, c-Met или CEACAM-6.

6. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере один связывающий домен специфически связывается с CD28 и по меньшей мере другой связывающий домен специфически связывается с или является антагонистом CD79b, гиперИЛ-6, PDL2, моноИЛ-10, CD86, LIGHT, GITRL, CD40, PDL1, HVEM или LTBR.

7. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что по меньшей мере один связывающий домен специфически связывается с CD28 и по меньшей мере другой связывающий домен является агонистом ИЛ-10, HLA-G, ГФР, ИЛ-35, PD-1 или BTLA.

8. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок имму-

ноглобулина CH1 и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок CL иммуноглобулина.

9. Полипептидный гетеродимер по п.8, отличающийся тем, что первый одноцепочечный полипептид дополнительно включает второй участок CH1 и второй одноцепочечный полипептид дополнительно включает второй участок CL, и при этом второй участок CH1 первого одноцепочечного полипептида и второй участок CL второго одноцепочечного полипептида ассоциируют друг с другом в полипептидном гетеродимере.

10. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что домен гетеродимеризации иммуноглобулина первого одноцепочечного полипептида (HD-I) включает первый участок CL иммуноглобулина и домен гетеродимеризации иммуноглобулина второго одноцепочечного полипептида (HD-II) включает первый участок CH1 иммуноглобулина.

11. Полипептидный гетеродимер по п.10, отличающийся тем, что первый одноцепочечный полипептид дополнительно включает второй участок CL и второй одноцепочечный полипептид дополнительно включает второй участок CH1, и при этом второй участок CL первого одноцепочечного полипептида и второй участок CH1 второго одноцепочечного полипептида ассоциируют друг с другом в полипептидном гетеродимере.

12. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.9 и 11, отличающийся тем, что второй участок CL представляет собой участок Ск или участок Сλ.

13. Полипептидный гетеродимер по п.12, отличающийся тем, что второй участок CL представляет собой участок Ск иммуноглобулина человека дикого типа.

14. Полипептидный гетеродимер по п.12, отличающийся тем, что второй участок CL представляет собой измененный участок Ск иммуноглобулина человека, в котором одна или более аминокислот участка Ск человека дикого типа заменены в положениях N29, N30, Q52, V55, T56, S68 или T70.

15. Полипептидный гетеродимер по п.1 или 12, отличающийся тем, что участок CH1 представляет собой измененный участок CH1 иммуноглобулина человека, включающий аминокислотную замену, в результате которой Вал (V) в положении 68 заменен на Лиз (K), Арг (R) или Гис (H), и при этом участок Ск представляет собой измененный участок Ск иммуноглобулина человека, включающий аминокислотную замену, в результате которой Лей (L) в положении 27 заменен на Асп (D) или Глу (E).

16. Полипептидный гетеродимер по п.1 или 12, отличающийся тем, что участок CH1 представляет собой измененный участок CH1 иммуноглобулина человека, включающий аминокислотную замену, в результате которой Вал (V) в положении 68 заменен на Асп (D) или Глу (E), и при этом участок Ск представляет собой измененный участок Ск иммуноглобулина человека, включающий аминокислотную замену, в результате которой Лей (L) в положении 27 заменен на Лиз (K), Арг (R) или Гис (H).

17. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что первый участок CH1 или второй участок CH1, если присутствует, представляет собой измененный участок CH1 иммуноглобулина человека, при этом цистеин участка CH1 иммуноглобулина человека дикого типа, участвующий в образовании дисульфидной связи с участком CL иммуноглобулина человека дикого типа, удален или заменен.

18. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-17, отличающийся тем, что первый участок CH1 и второй участок CH1, если присутствует, представляет собой полипептид, включающий SEQ ID NO:114, 844 или 845.

19. Полипептидный гетеродимер по п.1, отличающийся тем, что участок Ск выбран из любого полипептида, включающего SEQ ID NO:142-178, 202 и 838-843.

20. Полипептидный гетеродимер по п.12, отличающийся тем, что участок Сλ представляет собой полипептид, включающий SEQ ID NO:140.

21. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-20, отличающийся тем, что шарнирный участок как первого, так и второго одноцепочечных полипептидов представлен шарнирным участком иммуноглобулина.

22. Полипептидный гетеродимер по п.21, отличающийся тем, что шарнирный участок:

- (а) расположен ближе к аминоконцу относительно домена CH2 и CH3,
- (б) расположен между связывающим доменом и доменом гетеродимеризации иммуноглобулина,
- (в) расположен между доменом гетеродимеризации иммуноглобулина и доменом CH2 и CH3 или
- (г) расположен на аминоконце первого или второго одноцепочечного полипептида.

23. Полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-22, отличающийся тем, что шарнирные участки первого и второго одноцепочечных полипептидов идентичны или различны.

24. Гетеродимер по п.1, отличающийся тем, что первый и второй одноцепочечные полипептиды включают SEQ ID NO:10 и 12, SEQ ID NO:14 и 16, SEQ ID NO:18 и 20, SEQ ID NO:20 и 22, SEQ ID NO:30 и 32, SEQ ID NO:29 и 31, SEQ ID NO:29 и 32, SEQ ID NO:30 и 72, SEQ ID NO:53 и 72, SEQ ID NO:54 и 72, SEQ ID NO:55 и 72, SEQ ID NO:70 и 72, SEQ ID NO:71 и 72, SEQ ID NO:63 и 56, SEQ ID NO:64 и 57, SEQ ID NO:65 и 60, SEQ ID NO:66 и 58, SEQ ID NO:67 и 59, SEQ ID NO:68 и 61, SEQ ID NO:69 и 62, SEQ ID NO:54 и 811, SEQ ID NO:54 и 812, SEQ ID NO:54 и 813, SEQ ID NO:814 и 818, SEQ

ID NO:815 и 818, SEQ ID NO:816 и 818, SEQ ID NO:817 и 818, SEQ ID NO:814 и 820, SEQ ID NO:814 и 821, SEQ ID NO:54 и 819, SEQ ID NO:814 и 826, SEQ ID NO:814 и 822, SEQ ID NO:814 и 823, SEQ ID NO:814 и 824, SEQ ID NO:859 и 862, SEQ ID NO:860 и 863, SEQ ID NO:861 и 864, SEQ ID NO:874 и 825, SEQ ID NO:875 и 879, SEQ ID NO:876 и 880, SEQ ID NO:877 и 881 или SEQ ID NO:878 и 882.

25. Композиция, включающая полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-24 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

26. Вектор экспрессии, способный экспрессировать полипептидный гетеродимер по любому из пп.1-24, включающий первый полинуклеотид, кодирующий первый одноцепочечный полипептид, и второй полинуклеотид, кодирующий второй одноцепочечный полипептид.

27. Клетка-хозяин, включающая вектор экспрессии по п.26.

28. Клетка-хозяин, включающая первый и второй векторы экспрессии, способные экспрессировать первый и второй одноцепочечные полипептиды соответственно полипептидного гетеродимера по любому из пп.1-24.

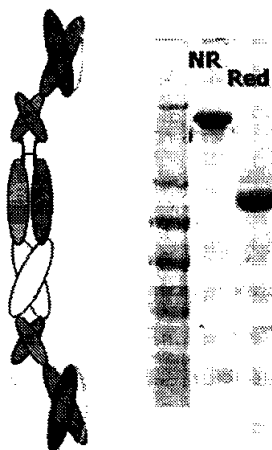
29. Способ получения полипептидного гетеродимера, включающий (а) культивирование клетки-хозяина по п.27 или 28 в условиях, подходящих для экспрессии первого и второго одноцепочечных полипептидов, и (б) необязательно, выделение или очистку гетеродимеров, образованных из первого и второго одноцепочечных полипептидов из культуры.

30. Способ направления активации Т-клеток, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что полипептидный гетеродимер включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или их комбинацию, и второй связывающий домен, который специфически связывает другую мишень.

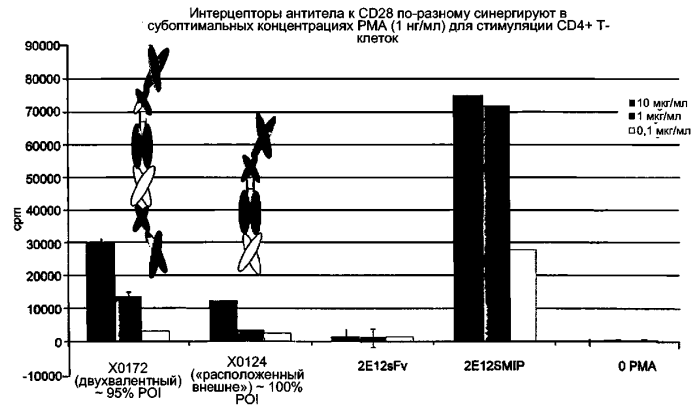
31. Способ ингибирования роста метастазов или метастатического роста злокачественного новообразования, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что полипептидный гетеродимер включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , c-Met или Ron.

32. Способ лечения аутоиммунного или воспалительного состояния, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что полипептидный гетеродимер включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  или CD28.

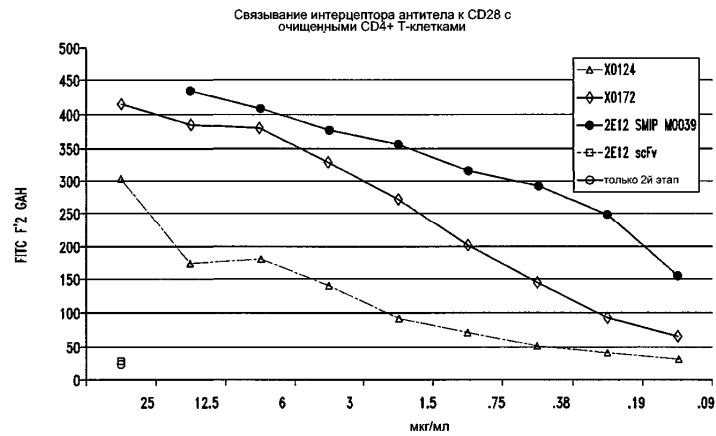
33. Способ лечения ассоциированного с В-клетками нарушения или заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества полипептидного гетеродимера по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что полипептидный гетеродимер включает связывающий домен, который специфически связывает TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$  или CD3 $\epsilon$ , и второй связывающий домен, который специфически связывает CD19, CD20, CD79b или HLA-DR.



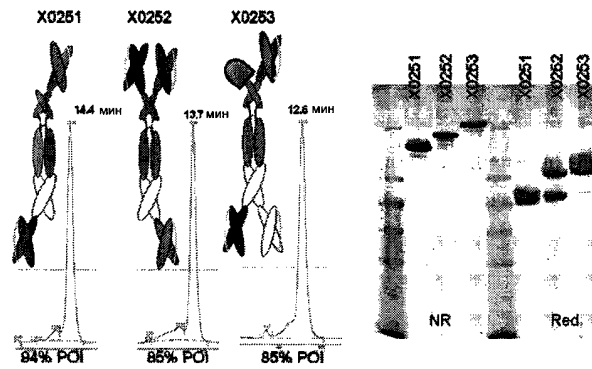
Фиг. 1



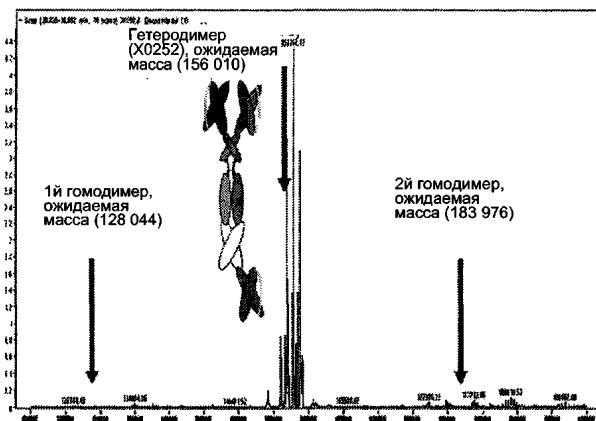
Фиг. 2



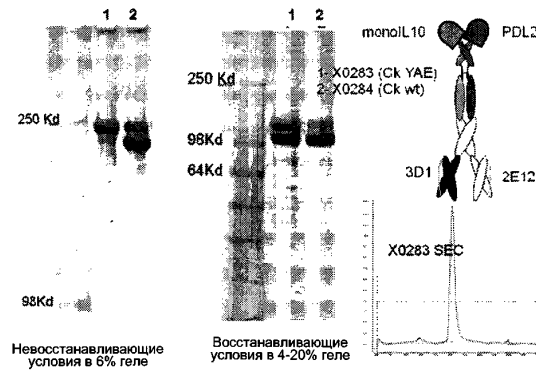
Фиг. 3



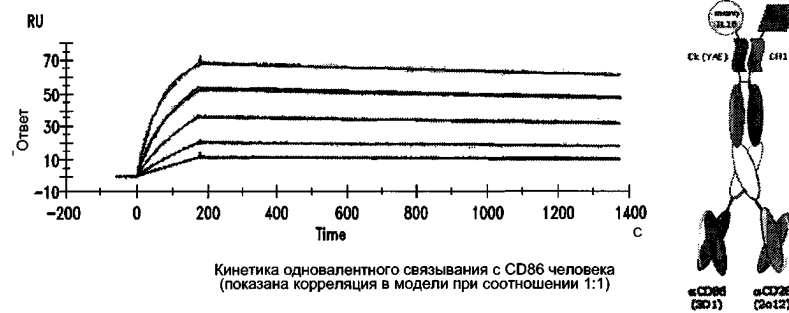
Фиг. 4



Фиг. 5

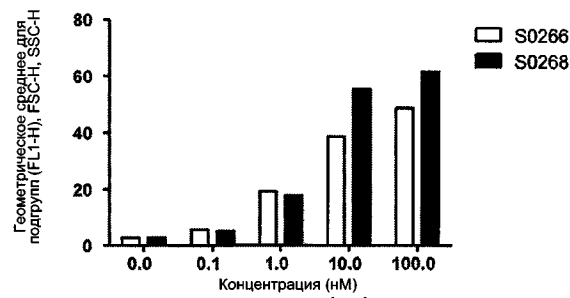


Фиг. 6



Фиг. 7

Связывание биспецифических антител к  $\alpha$ RON x  $\alpha$ CD3 с клетками MDA-MB-453

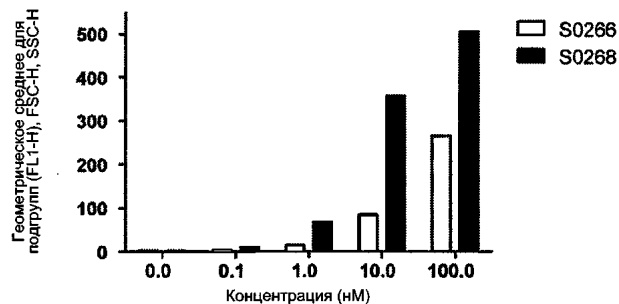


S0266 =  $\alpha$ RON x  $\alpha$ CD3 Scorpion

S0268 =  $\alpha$ RON x  $\alpha$ CD3 Interceptor

Фиг. 8А

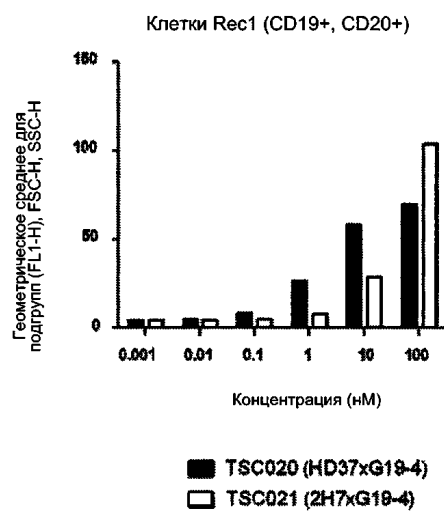
Связывание биспецифических антител к  $\alpha$ RON x  $\alpha$ CD3 с изолированными Т-клетками



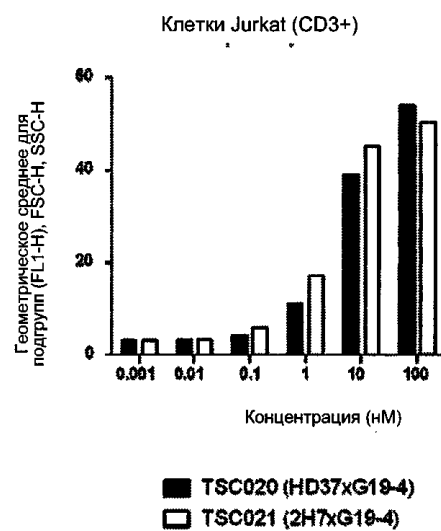
S0266 =  $\alpha$ RON x  $\alpha$ CD3 Scorpion

S0268 =  $\alpha$ RON x  $\alpha$ CD3 Interceptor

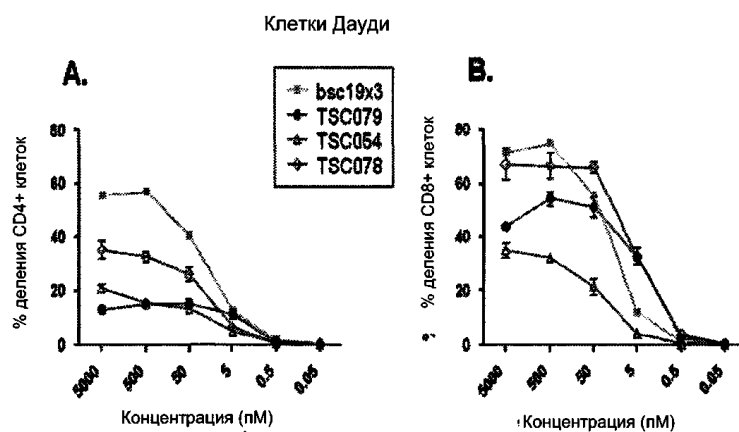
Фиг. 8В



Фиг. 9А



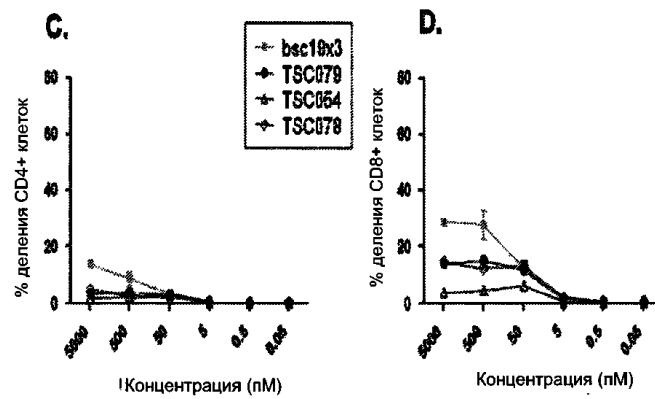
Фиг. 9В



Фиг. 10А, В

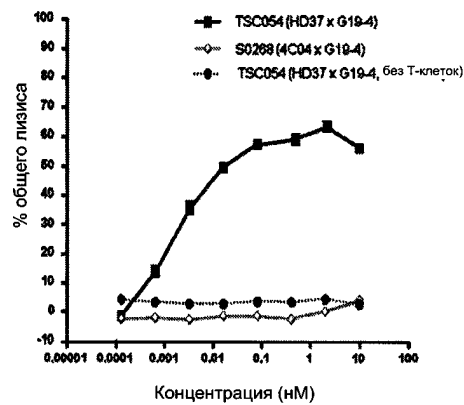


Клетки MDA-MB-453;



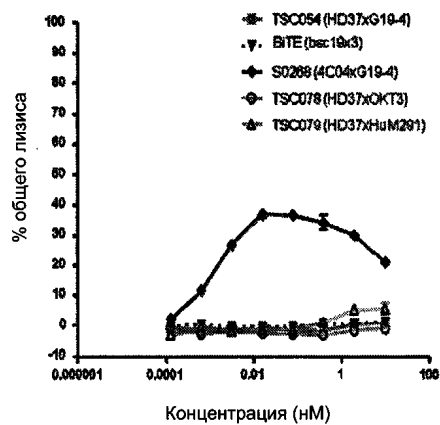
Фиг. 10C, D

Направленная цитотоксичность Т-клеток относительно клеток Дауди (4 ч)

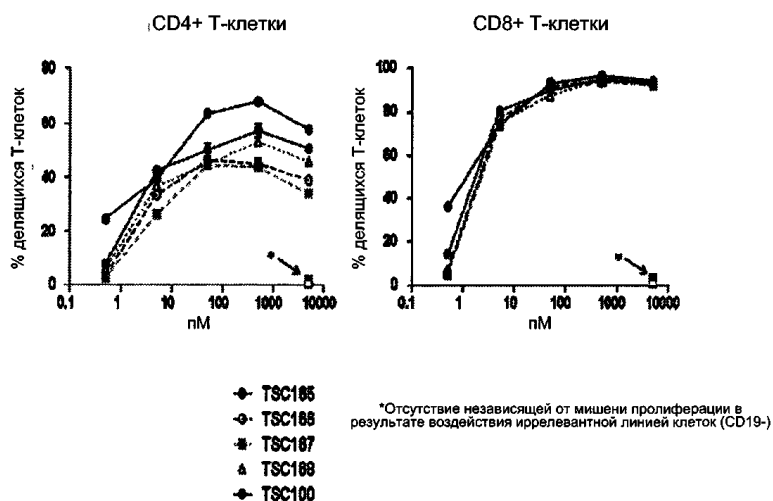


Фиг. 11А

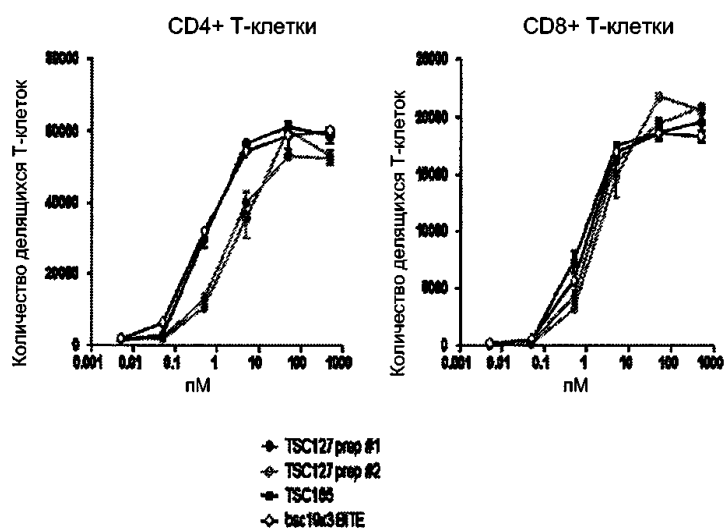
Направленная цитотоксичность Т-клеток относительно клеток ВхРС-3 (4 ч)



Фиг. 11В

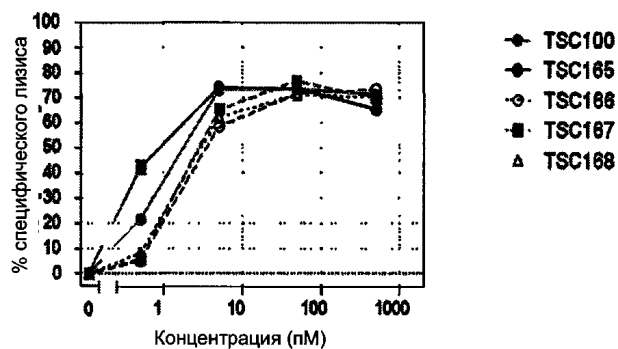


Фиг. 12



Фиг. 13

Цитотоксичность, измеренная в ходе 4-  
часового высвобождения Cg  
Соотношение Т-клеток к клеткам Дауди 10:1



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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