

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201391735** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2014.03.31

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2012.05.16

---

(54) **CD3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНЫЕ К СВЯЗЫВАНИЮ С CD3  
ЧЕЛОВЕКА И CD3, НЕ ЯВЛЯЮЩИМСЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ**

---

(31) 61/488,716; 61/530,353

(32) 2011.05.21; 2011.09.01

(33) US

(86) PCT/US2012/038219

(87) WO 2012/162067 2012.11.29

(88) 2013.01.31

(71) Заявитель:  
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Хуан Лин, Джонсон Лесли С. (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к CD3-связывающим молекулам, способным связываться с CD3 человека и CD3, не являющимся человеческим, и, в частности, к таким молекулам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также имеет отношение к применению таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для лечения злокачественного новообразования, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других состояний.

**201391735**  
**A1**

**201391735**  
**A1**

**CD3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СПОСОБНЫЕ К СВЯЗЫВАНИЮ С CD3 ЧЕЛОВЕКА  
И CD3, НЕ ЯВЛЯЮЩИМСЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ**

**Перекрестная ссылка на родственные заявки**

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент США № 61/488716 (поданной 21 мая 2011 г.; находящейся на рассмотрении) и заявки на патент США № 61/530353 (поданной 1 сентября 2011 г.; находящейся на рассмотрении), каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

**Ссылка на список последовательностей**

Заявка включает один или более списков последовательностей в соответствии в § 1.821 и далее раздела 37 свода федеральных правил, которые представлены как на бумажном носителе, так и на машиночитаемом носителе, и эти представления на бумажном и машиночитаемом носителях включены в настоящее описание в качестве ссылки в их полном объеме.

**Предпосылки создания изобретения**

**Область техники**

Настоящее изобретение относится к CD3-связывающим молекулам, способным связываться с CD3 человека и CD3, не являющимся человеческим, и, в частности, к таким молекулам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также относится к применению таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других состояний.

**Описание области техники**

Иммунная система организма служит защитой ряда состояний, в том числе, например, повреждения, инфекции и неоплазии, и ее медиаторами являются две отдельные, но взаимосвязанные системы: клеточная и гуморальная иммунные системы. В общем, медиаторами гуморальной системы являются растворимые продукты (антитела или

иммуноглобулины), которые обладают способностью к объединению с продуктами, распознаваемыми этой системой как чужеродные для организма, и к их нейтрализации. Напротив, клеточная иммунная система включает активацию определенных клеток, названных Т-клетками, которые исполняют ряд терапевтических ролей. Т-клетки представляют собой лимфоциты, которые происходят из вилочковой железы и циркулируют между тканями, лимфатической системой и сердечно-сосудистой системой. Они действуют против, или в ответ на, ряд(а) чужеродных структур (антигенов). Во многих случаях эти чужеродные антигены представлены на клетках-хозяевах в результате неоплазии или инфекции. Хотя сами Т-клетки не секретируют антитела, они обычно требуются для секреции антител вторым классом лимфоцитов, В-клетками (которые происходят из костного мозга). Немаловажно, что Т-клетки проявляют исключительную иммунологическую специфичность, чтобы быть способными отличить один антиген от другого.

Не подвергнутая воздействию Т-клетка, например, Т-клетка, которая еще не столкнулась со специфическим для нее антигеном, активируется, когда она впервые сталкивается с комплексом специфический пептид:МНС на антигенпрезентирующей клетке. Антигенпрезентирующей клеткой может быть В-клетка, макрофаг или дендритная клетка. Когда не подвергнутая воздействию Т-клетка сталкивается с комплексом специфический пептид:МНС на антигенпрезентирующей клетке, через Т-клеточный рецептор доставляется сигнал, который приводит к изменению конформации молекул связанных с функционированием лимфоцитов - Т-клеток антигенов (LFA) и увеличивает их сродство к молекулам межклеточной адгезии (ICAM), присутствующим на поверхности антигенпрезентирующей клетки. Сигнал, порождаемый при взаимодействии Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой, является необходимым, но недостаточным, для активации не подвергнутой воздействию Т-клетки. Необходим второй костимулирующий сигнал. Не подвергнутую воздействию Т-клетку может активировать только антигенпрезентирующая клетка, несущая как комплекс специфический пептид:МНС, так и костимулирующую молекулу на своей поверхности. Распознавание антигена не

подвергнутой воздействию Т-клеткой в отсутствие костимуляции приводит к тому, что Т-клетка становится анергической. Необходимость двух сигналов для активации Т-клеток и В-клеток, так что они достигают адаптивных иммунных ответов, может обеспечить механизм избегания реакций на аутоантигены, которые могут присутствовать на антигенпрезентирующей клетке в местах в системе, в которых она может быть распознана Т-клеткой. Если контактирование Т-клетки с антигенпрезентирующей клеткой приводит к порождению лишь одного из двух необходимых сигналов, Т-клетка не становится активированной, и адаптивный иммунный ответ не имеет место.

Эффективность, с которой у людей и других млекопитающих развивается иммунологическая реакция на патогены и чужеродные вещества, зависит от двух характеристик: высокой специфичности иммунной реакции в отношении распознавания антигена и иммунологической памяти, которая создает возможность для более быстрых и более сильных ответов после повторной активации с помощью того же антигена (Portoles, P. et al. (2009) "The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination," Current Pharmaceutical Design 15: 3290-3300; Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR: CD3 Complex," Immunol Rev. 232(1): 7-21). Специфичность реакции Т-клеток опосредуется распознаванием антигена (представленного на антигенпрезентирующих клетках (APC)) молекулярным комплексом, включающим Т-клеточный рецептор («TCR») и лиганд рецептора клеточной поверхности, CD3. TCR представляет собой ковалентно связанный гетеродимер из  $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей («TCR $\alpha\beta$ »). Эти цепи являются мембранными полипептидами класса I длиной 259 ( $\alpha$ ) и 296 ( $\beta$ ) аминокислот. Молекула CD3 представляет собой комплекс, содержащий  $\gamma$ -цепь CD3,  $\delta$ -цепь CD3 и две  $\epsilon$ -цепи CD3, связанных в виде трех димеров ( $\epsilon\gamma$ ,  $\epsilon\delta$ ,  $\zeta\zeta$ ) (Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," Immunol Rev. 232(1): 7-21; Call, M.E. et al. (2007) "Common Themes In The Assembly And Architecture Of Activating Immune Receptors," Nat. Rev. Immunol. 7: 841-850;

Weiss, A. (1993) "T Cell Antigen Receptor Signal Transduction: A Tale Of Tails And Cytoplasmic Protein-Tyrosine Kinases," *Cell* 73: 209-212). Комплекс TCR и CD3, наряду с дзета-цепью -  $\zeta$ -цепью CD3 (также известной как дзета-цепь T-клеточного рецептора T3 или CD247), включает TCR-комплекс (van der Merwe, P.A. etc. (epub Dec. 3, 2010) "Mechanisms For T Cell Receptor Triggering," *Nat. Rev. Immunol.* 11: 47-55; Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology of the T-cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, and Initiation of Signaling," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a005140). Этот комплекс особенно важен, поскольку он содержит большое число (десять) иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM).

В случае зрелых T-клеток активация TCR/CD3 с помощью чужеродных антигенных пептидов, связанных с молекулами собственного МНС, является первой стадией, необходимой для размножения антигенспецифических T-клеток и их дифференциации в эффекторные T-лимфоциты или T-клетки памяти. Эти процессы включают фосфорилирование иммунорецепторных тирозиновых активирующих мотивов (ITAM) TCR-комплекса. Поскольку TCR-комплекс содержит такое большое число ITAM (всего 10), и эти ITAM расположены последовательно один за другим (благодаря димеризации являющихся составными частями цепей), фосфорилирование соответствующих остатков тирозина в результате лигирования TCR создает спаренные места присоединения белков, которые содержат домены, гомологичные участкам Src-белка 2 (SH2), таких как связанный с  $\zeta$ -цепью белок с М.м. 70 кДа (ZAP-70), и тем самым инициирует усилительный каскад передачи сигналов, который приводит к активации T-клеток и их дифференциации (Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," *Immunol Rev.* 232(1): 7-21).

Результат этих процессов регулируется интенсивностью и качеством антигенного стимула, а также природой сопроводительных сигналов, передаваемых корецептором и

костимулирующими поверхностными молекулами, или рецепторами цитокинов (Portoles, P. et al. (2009) "The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination," *Current Pharmaceutical Design* 15: 3290-3300; Riha, P. et al. (2010) "CD28 Co-Signaling In The Adaptive Immune Response," *Self/Nonsel* 1(3): 231-240). Хотя стимуляция TCR является необходимым условием для активации T-клеток, общепризнано, что вхождение в контакт с костимулирующими молекулами, такими как CD28, необходимо для полной активации T-клеток и их дифференциации (Guy, C.S. et al. (2009) "Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex," *Immunol Rev.* 232(1): 7-21).

Вследствие фундаментальности CD3 в инициации ответов на антигены были предложены моноклональные антитела против этого рецептора, которые способны к блокированию или по крайней мере модулированию иммунного процесса, и, таким образом, в качестве средств для лечения воспалительного и/или аутоиммунного заболевания. В самом деле, антитела против CD3 были первым антителом, разрешенным для лечения людей (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity," *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657). Антитело против CD3 (продаваемое Janssen-Cilag как ORTHOCLONE™ ОКТЗ™) вводили для уменьшения острого отторжения у пациентов с трансплантатами органов и в качестве лечения лимфобластного лейкоза (Cosimi, A.B. et al. (1981) "Use Of Monoclonal Antibodies To T-Cell Subsets For Immunologic Monitoring And Treatment In Recipients Of Renal Allografts," *N. Engl. J. Med.* 305: 308-314; Kung, P. et al. (1979) "Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens," *Science* 206: 347-349; Vigeral, P. et al. (1986) "Prophylactic Use Of OKT3 Monoclonal Antibody In Cadaver Kidney Recipients. Utilization Of OKT3 As The Sole Immunosuppressive Agent," *Transplantation* 41: 730-733; Midtvedt, K. et al. (2003) "Individualized T Cell Monitored Administration Of ATG Versus OKT3 In Steroid-Resistant Kidney Graft Rejection," *Clin. Transplant.* 17(1): 69-74; Gramatzki, M. et al. (1995) "Therapy With OKT3 Monoclonal Antibody In

Refractory T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Induces Interleukin-2 Responsiveness," *Leukemia* 9(3): 382-390; Herold, K.C. et al. (2002) "Anti-CD3 Monoclonal Antibody In New-Onset Type I Diabetes Mellitus," *N. Engl. J. Med.* 346: 1692-1698; Cole, M.S. et al. (1997) "Human IgG2 Variants Of Chimeric Anti-CD3 Are Nonmitogenic to T cells," *J. Immunol.* 159(7): 3613-3621; Cole, M.S. et al. (1999) "Hum291, A Humanized Anti-CD3 Antibody, Is Immunosuppressive To T Cells While Exhibiting Reduced Mitogenicity in vitro," *Transplantation* 68: 563-571; патенты США №№ 6491916, 5585097 и 6706265).

Однако лечение такими антителами против CD3 не было признано в достаточной степени специфическим во избежание побочных эффектов (Ludvigsson, J. (2009) "The Role of Immunomodulation Therapy in Autoimmune Diabetes," *J. Diabetes Sci. Technol.* 3(2): 320-330). Многократное ежедневное введение ОКТ3 приводит к сильной иммуносупрессии и обеспечивает эффективное лечение отторжения после трансплантации почки. In vivo введение ОКТ3 приводит как к активации Т-клеток, так и к подавлению иммунных ответов. Однако применению ОКТ3 препятствовал синдром реакции на первую токсическую дозу, который связан с событиями первоначальной активации Т-клеток и с обеспечением выброса цитокинов, который имеет место до иммуносупрессии Т-клеточных реакций. Описанные в литературе побочные эффекты, которые следует за первой, а иногда второй инъекцией этого мышиного моноклонального антитела, включают «гриппоподобный» синдром, состоящий из высокой температуры, озноба, головной боли и желудочно-кишечных симптомов (рвоты и диареи), а в тяжелых случаях отмечается отек легких в пределах часов лечения (Thistlethwaite, J.R. Jr. et al. (1988) "Complications and Monitoring of ОКТ3 Therapy," *Am. J. Kidney Dis.* 11: 112-119). Этот синдром, как полагают, служит отражением ОКТ3-опосредуемого перекрестного сшивания комплекса TCR/CD3 на поверхности Т-клеток и результирующего выброса цитокинов (например, фактора альфа некроза опухолей (TNF $\alpha$ ), интерферона- $\gamma$ , интерлейкинов IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10 и

гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (Masharani, U.B. et al. (2010) "Teplizumab Therapy For Type I Diabetes," *Expert Opin. Biol. Ther.* 10(3): 459-465; Abramowicz, D. et al. (1989) "Release Of Tumor Necrosis Factor, Interleukin-2, And Gamma-Interferon In Serum After Injection Of OKT3 Monoclonal Antibody In Kidney Transplant Recipients," *Transplantation* 47: 606-608; Ferran, C. et al. (1990) "Cytokine-Related Syndrome Following Injection Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody: Further Evidence For Transient In Vivo T Cell Activation," *Eur. J. Immunol.* 20: 509-515; Hirsch, R. et al. (1989) "Effects Of In Vivo Administration Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody On T Cell Function In Mice. II. In Vivo Activation Of T Cells," *J. Immunol.* 142: 737-743)). Применение антител против CD3 описано в патентах США №№ 7883703, 7728114, 7635472, 7575923 и 7381903 и в публикациях заявок на патенты США №№ 2010/0150918, 2010/0209437, 2010/0183554, 2010/0015142, 2008/0095766, 2007/0077246 и публикации PCT-заявки № WO2008/119567.

Особым недостатком прежних антител является их специфичность в отношении только CD3 человека. Этот недостаток является значительной помехой в разработке таких антител, как терапевтические средства для лечения заболеваний у человека. Для получения разрешения на сбыт любое новое лекарственное средство-кандидат должно пройти тщательную проверку. Эту проверку можно подразделить на преклиническую и клиническую фазы. Тогда как клиническую проверку, дополнительно подразделяемую на общеизвестные клинические фазы I, II и III, выполняют на являющихся людьми пациентах, преклиническую проверку выполняют на животных. Целью преклинической проверки является подтверждение того, что лекарственное средство-кандидат обладает желаемой активностью и, самое важное, является безопасным. Только в случае установления при преклинической проверке безопасности для животных и возможной эффективности лекарственного средства-кандидата соответствующим регулирующим органом будет разрешена клиническая проверка на людях этого лекарственного средства-кандидата. Безопасность



лекарственных средств-кандидатов может быть проверена на животных тремя следующими путями: (i) на релевантном виде, т.е. виде, в котором лекарственные средства-кандидаты могут распознать ортологичные антигены, (ii) на трансгенном животном, содержащем антигены человека, и (iii) посредством использования заменителя лекарственного средства-кандидата, который может связываться с ортологичными антигенами, присутствующими у животного. Недостатками трансгенных животных является то, что эта технология типично приурочена к грызунам. Однако грызуны и люди имеют значительные различия в физиологии, которые могут затруднять экстраполяцию полученных на грызунах данных, относящихся к безопасности, для предсказания безопасности для людей. Недостатками заменителя лекарственного средства-кандидата является отличное химическое соединение по сравнению с фактическим лекарственным средством-кандидатом, и часто используемыми животными являются грызуны с обсуждавшимися выше недостатками. Следовательно, преклинические данные, полученные на грызунах, обладают ограниченной прогнозирующей способностью, что касается лекарственного средства-кандидата. Предпочтительным подходом к проверке безопасности является использование релевантного вида, предпочтительно низшего примата. Теперь недостатком CD3-связывающих молекул, подходящих для терапевтического воздействия на человека, описанных в данной области техники, является то, что релевантными видами являются высшие приматы, в частности, яванские макаки. Соответственно, в высокой степени желательным является антитело против CD3, способное связываться как с CD3 человека, так и CD3 примата. Такие антитела описаны в публикации заявки на патент США с № 20100150918 и в публикации PCT-заявки с № WO2008/119567.

Несмотря на такие успехи, сохраняется потребность в антителах против CD3 человека и их антигенсвязывающих фрагментах, которые способны перекрестно реагировать с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность и потребность в улучшенных терапевтических средствах от

злокачественного новообразования, аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

### **Краткое изложение сущности изобретения**

Настоящее изобретение относится к CD3-связывающим молекулам, способным к связыванию с CD3 человека и CD3, не являющимся человеческим, и, в частности, к таким молекулам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также имеет отношение к применениям таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других состояний.

Подробно, настоящим изобретением обеспечивается CD3-связывающая молекула, включающая антигенсвязывающий фрагмент антитела, причем антигенсвязывающий фрагмент включает CD3-специфический VL-домен антитела и CD3-специфический VH-домен антитела, причем CD3-специфический VL-домен и CD3-специфический VH-домен образуют антигенсвязывающий домен, способный к иммуноспецифическому связыванию как с эпитопом CD3 человека, так и с эпитопом CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, причем:

(I) CD3-специфический VL-домен выбирают из группы, состоящей из VL-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 16), VL-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 18), VL-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 20), VL-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 22), VL-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 24), VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26), VL-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 28), VL-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 30), VL-9 h-mab2 (SEQ ID NO: 32) и VL-10 h-mab2 (SEQ ID NO: 34), а указанный CD3-специфический VH-домен выбирают из группы, состоящей из VH-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 36), VH-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 38), VH-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 40), VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42), VH-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 44), VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46), VH-6L h-mab2 (SEQ ID NO: 54), VH-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 48), VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50), VH-8L h-mab2 (SEQ ID NO: 55), VH-8 di-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 56), VH-8 di-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 57), VH-6M h-mab2 (SEQ ID NO: 72), VH-8M h-mab2 (SEQ ID NO: 74), VH-2k h-mab2 (SEQ ID NO: 87) и VH-5k h-mab2 (SEQ ID NO: 88); или

(II) CD3-специфический VL-домен выбирают из группы, состоящей из VL-1 h-mab1 (SEQ ID NO: 10) и VL-2 h-mab1 (SEQ ID NO: 12), а CD3-специфическим VH-доменом является VH h-mab1 SEQ ID NO: 14).

Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к варианту осуществления описанной выше CD3-связывающей молекулы, в котором CD3-специфическим VL-доменом является VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26).

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанной выше CD3-связывающей молекулы, в котором CD3-специфическим VH-доменом является VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50), VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46) или VH-2k h-mab2 (SEQ ID NO: 87).

Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к варианту осуществления описанной выше CD3-связывающей молекулы, в которой молекулой является антитело и, в частности, в котором в антителе отсутствует Fc-область, или оно включает Fc-область, которая:

(A) испытывает недостаток эффекторной функции или обладает уменьшенной эффекторной функцией; или

(B) подвергнута модифицированию, которое ослабляет способность Fc-области антитела к связыванию с Fc-рецептором; причем уменьшение эффекторной функции и ослабление связывающей способности имеет место относительно таковой Fc-области дикого типа.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул, в котором молекулой является CD3-связывающее диатело, которое включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом цепи ковалентно связаны друг с другом, причем:

I. первая полипептидная цепь включает амино-конец и карбоксильный конец и от N-конца к C-концу:

(i) домен (A), включающий CD3-специфический VL-домен;

(ii) домен (B), включающий связывающую область переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2); и

(iii) домен (С);

причем домены (А) и (В) не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта; и

(II) вторая полипептидная цепь включает amino-конец и карбоксильный конец и от N-конца к С-концу:

(i) домен (D), включающий связывающую область переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2);

(ii) домен (E), включающий CD3-специфический VH-домен; и

(iii) домен (F);

причем домены (D) и (E) не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта; и

причем:

(1) домены (А) и (E) ассоциируются с образованием антигенсвязывающего домена, который способен к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком;

(2) домены (В) и (D) ассоциируются с образованием сайта связывания, который иммуноспецифически связывается со вторым эпитопом, при этом второй эпитоп отличен от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие ассоциации доменов (А) и (E); и

(3) домены (С) и (F) ковалентно связаны вместе.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул, в котором вторым эпитопом не является эпитоп CD3.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул, в котором вторым эпитопом является эпитоп CD3, который отличен от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие ассоциации доменов (А) и (E).

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или антител или диател, в котором такая молекула является гуманизированной.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул

или антител или диател, в котором такая молекула способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и флуоресцеином.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором такая молекула способна к иммуноспецифическому связыванию как с (i) CD3, так и с (ii) (a) опухолеспецифическим антигеном, или (ii) (b) антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором молекула или диатело способны к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и опухолеспецифическим антигеном, представленным на опухолевой клетке, причем опухолевой клеткой является клетка злокачественного новообразования, выбираемого из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы и лейкоза.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором молекула или диатело способны к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности, причем антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности является HER2/neu, V7-H3, CD20, PSMA, IGF-1R, Ep-CAM, или является молекула, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, которая приводит к активации Т-клетки или В-клетки в ходе адаптивного иммунного ответа.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к

варианту осуществления описанных выше CD3-связывающих молекул или диател, в котором молекула или диатело способны к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и с молекулой, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, и молекулу, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD32B, CD38, CD40, CD79a, CD79b, CD80, CD86, LFA-I, LFA-3 и CFA-I.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к фармацевтической композиции, включающей любую из описанных выше CD3-связывающих молекул, антител или диател и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции для применения для лечения злокачественного новообразования или аутоиммунного или воспалительного заболевания.

Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции для применения для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, выбираемого из группы, состоящей из инсулинозависимого диабета типа I, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника, злокачественной миастении, глютеновой болезни, синдрома Гужеро-Шегрена, болезни Грейвса, болезни Крона, аутоиммунного гепатита, псориаза, псориатического артрита, астмы, аллергического ринита, эффектов вследствие трансплантации органа или гомологичной болезни (GVHD). Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к описанной выше фармацевтической композиции для применения для лечения инсулинозависимого диабета типа I.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1A-1B представлены результаты ELISA с захватом, в случае которого способность антитела против CD3 mAb1 (фиг. 1A) или химерного производного антитела mAb1 (ch-mAb1) (фиг. 1B) оценивали, используя растворимый CD3 человека («shCD3»).

На фиг. 2A-2B представлены результаты ELISA с захватом, в случае которого способность антитела против CD3 mAb2 (фиг. 2A)

или химерного производного антитела mAb2 (ch-mAb2) (фиг. 2B) оценивали, используя растворимый CD3 человека («shCD3») или растворимый CD3 яванского макака («scCD3»).

На фиг. 3 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 41-46 каркасных областей легкой цепи mAb2.

На фиг. 4 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 36, 38, 44 и 46 каркасных областей легкой цепи mAb2.

На фиг. 5 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 36, 38 и 46 каркасных областей легкой цепи mAb2.

На фиг. 6 представлены результаты анализов для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 30, 49 и 93 каркасных областей тяжелой цепи mAb2.

На фиг. 7 представлены результаты дополнительных анализов, проведенных для определения эффекта вариаций пронумерованных согласно Kabat остатков 30, 49 и 93 каркасных областей тяжелой цепи mAb2.

На фиг. 8A-8B представлены результаты анализов, проведенных для определения способности химерного и гуманизированного mAb2 к связыванию с CD3, не являющимся человеческим.

На фиг. 9A-9D представлены записи сенсограмм анализов BIACORE™, выполненных для определения кинетики связывания ch-mAb2 или h-mAb2 с scCD3 или scCD3.

На фиг. 10A-10D представлены результаты ELISA с захватом, выполненных на диателах DART™, содержащих способный к связыванию с CD3 первый эпитопсвязывающий сайт и второй эпитопсвязывающий сайт, который связывается с или Her2/neu, или CD19, или EGFR, или B7-H3.

На фиг. 11A-11B показана способность B7H3 x CD3-биспецифических диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих B7H3.

На фиг. 12A-12E показана способность A33 x CD3-биспецифических диател DART™ к опосредованию перенаправленного

уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих A33.

На фиг. 13А и 13В представлены результаты сравнения способности диатела DART™ CD19-h-mAb2 и CD19 х CD3-биспецифического диатела к вызову перенаправленного, опосредованного Т-клетками уничтожения. Диатело DART™ CD19-h-mAb2 проявляет специфичность в отношении CD3 человека, а также CD3, не являющимся человеческим; CD19 х CD3-биспецифическое диатело DART проявляет специфичность в отношении только CD3 человека. Фиг. 13А: перенаправленное уничтожение клеток В-клеточной лимфомы человека Raji; фиг. 13В: перенаправленное уничтожение клеток лимфомы из клеток ткани JeKo-1.

На фиг. 14А и 14В показано, что диатело DART™ CD19-h-mAb2 по настоящему изобретению было способно к опосредованию цитолиза в присутствии Т-клеток-эффекторов или человека, или яванского макака.

На фиг. 15А и 15В показана способность диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2 по настоящему изобретению или (ERBITUX™-Т-клеточный рецептор)-биспецифического диатела DART™ к опосредованию увеличения MFI CD69 после инкубации с CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетками. Контрольное диатело ERBITUX™-CD3 FN18 DART™ (способное к связыванию с EGFR и с CD3 яванского макака) не вызывало увеличение MFI CD69.

На фиг. 16А-16D представлены результаты исследований в отношении связывания или диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2, диатела DART™ ERBITUX™-m-mAb2, или диатела DART™ 4420-h-mAb2 (в качестве отрицательно контроля) или контрольного второго антитела с клетками A498 или A431 (фиг. 16А и 16С, соответственно) и в отношении опосредования перенаправленного уничтожения таких клеток (фиг. 16В и 16D, соответственно).

#### **Подробное описание настоящего изобретения**

Настоящее изобретение относится к антителам против CD3 человека и их антигенсвязывающим фрагментам и, в частности, к таким антителам, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака). Настоящее изобретение также имеет отношение к применениям таких антител и антигенсвязывающих фрагментов для



лечения злокачественных новообразований, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других состояний.

### **I. Определения**

Используемый здесь термин «CD3-связывающая молекула» означает молекулу, способную к иммуноспецифическому связыванию как CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, благодаря по крайней мере одному сайту распознавания антигена (например, антигенсвязывающему домену антитела), находящемуся в вариабельной области молекулы. Как здесь используется, такая способность к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком, как предполагается, не означает способность одного антигенсвязывающего домена к одновременному связыванию обеих таких молекул CD3, а точнее означает, что такой антигенсвязывающий домен проявляет перекрестную реактивность, так что он будет иммуноспецифически связываться с CD3 человека при инкубации в присутствии CD3 человека и будет иммуноспецифически связываться с CD3 не являющегося человеком млекопитающего при инкубации в присутствии такого CD3 не являющегося человеком млекопитающего.

Используемый здесь термин «CD3-связывающая молекула» охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), одиночную цепь (ScFv), их мутанты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, включающие часть белка с сайтом распознавания антигена требуемой специфичности, гуманизированные антитела, химерные антитела, «ViTE®», молекулы диател «DART™» и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена требуемой специфичности. Термин «ViTE» (биспецифические рекрутеры T-клеток) относится к одноцепочечной полипептидной молекуле, которая имеет два антигенсвязывающих домена, один из которых связывается с T-клеточным антигеном, а второй из которых связывается с антигеном, присутствующим на поверхности мишени (WO 05/061547;

Baeuerle, P. et al. (2008) "BiTE®: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells," *Drugs of the Future* 33: 137-147; Bargou, et al. (2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody *Science* 321: 974-977).

Термин диатело «DART™» (перенаправляющий реагент с двумя аффинностями) относится к молекуле иммуноглобулина, которая включает по крайней мере две полипептидных цепи, которые ассоциируются (главным образом посредством ковалентной взаимосвязи) с образованием по крайней мере двух эпитопсвязывающих сайтов, которые могут распознавать один и тот же эпитоп или отличные эпитопы. Каждая из полипептидных цепей диатела DART™ включает переменную область легкой цепи иммуноглобулина и переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, но эти области не взаимодействуют с образованием эпитопсвязывающего сайта. Точнее, переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина одной (например, первой) из полипептидных цепей диатела DART™ взаимодействует с переменной областью легкой цепи иммуноглобулина отличной (например, второй) полипептидной цепи DART™ с образованием эпитопсвязывающего сайта. Аналогично, переменная область легкой цепи иммуноглобулина одной (например, первой) из полипептидных цепей диатела DART™ взаимодействует с переменной областью тяжелой цепи иммуноглобулина отличной (например, второй) полипептидной цепи DART™ с образованием эпитопсвязывающего сайта. Диатела DART™ могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими и т.д., таким образом, обладая способностью к одновременному связыванию одного, двух, трех или более различных эпитопов (которые могут быть из одинаковых или различных антигенов). Диатела DART™ могут быть, кроме того, одновалентными, двухвалентными, трехвалентными, четырехвалентными, пятивалентными, шестивалентными и т.д., таким образом, обладая способностью к одновременному связыванию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более молекул. Эти две характеристики диател DART™ (т.е. степень специфичности и валентности) могут быть

объединены, например, с получение биспецифических антител (т.е. способных к связыванию двух эпитопов), которые являются четырехвалентными (т.е. способными к связыванию четырех рядов эпитопов), и т.д. Молекулы диател DART™ описаны в публикациях РСТ-заявок №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379 и WO 2010/080538.

Биспецифические (или триспецифические, или полиспецифические) молекулы по настоящему изобретению будут способны к связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака), а также со вторым (или дополнительным) и отличным антигеном(ами) и эпитопом(ами). Вторым антигеном или эпитопом предпочтительно является опухолеспецифический антиген, представленный на опухолевой клетке. Такие опухолевые клетки могут быть из злокачественных новообразований, например, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы или лейкоза. Дополнительными антигенами или эпитопами предпочтительно являются опухолеспецифические антигены или эпитопы на клеточной поверхности (такие как 17-1A, A33, основной антиген I эндодермального происхождения на эритроцитах взрослого человека, альфа-фетопроtein, антиген оболочки РНК-вируса опухоли, онкоэмбриональный антиген, специфический для опухоли мочевого пузыря, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, специфический для лимфомы Беркитта антиген-38.13, CA125, CD18, CD19, специфический для В-клеточной лимфомы человека антиген-CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CO17-1A, СТА-1, CTLA-4, рецептор эпидермального фактора роста, Ер-SAM, ЕрhA2, антиген I на эритроцитах новорожденного, антиген фибросаркомы, ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2, ганглиозид GM3, GICA 19-9, gp IIIb/IIIa, gp72, HER1, HER-2/neu, HER3, HER4, специфический для меланомы антиген с большой молекулярной

массой, антиген HLA-DR, специфический для лейкоза человека Т-клеточный антиген-Gp37, специфический для карциномы легкого человека антиген L20, специфический для карциномы легкого человека антиген L6, антиген в виде глобулярной частицы молочного жира человека, IgE, специфический для карциномы K5 1/4 рап антиген, LEA, специфический для аденокарциномы антиген F3, специфический для злокачественных лимфоцитов человека антиген-AP0-1, специфический для меланомы антиген gp75, связанный с меланомой антиген p97, неогликопротеин, nuC242, специфический для полиморфного эпителия антиген муцинового типа, специфический для предстательной железы антиген, специфический для предстательной железы мембранный антиген, специфический для предстательной железы кислый фосфат, антиген SK-1, TAG-72, Т-антиген, опухолеспецифический антиген CA125, опухолеспецифический антиген MUC1, опухолеспецифический трансплантационный антиген клеточной поверхности, фактор роста сосудистого эндотелия, рецептор фактора роста сосудистого эндотелия и  $\alpha v \beta 3$ ). Альтернативно, такие дополнительные антигены или эпитопы могут быть связаны с патогеном, таким как вирус гепатита типа А, вирус гепатита типа В, вирус гепатита типа С, вирус гриппа, вирус ветряной оспы, аденовирус, вирус простого герпеса типа I (HSV-I), вирус простого герпеса типа II (HSV-II), возбудитель чумы рогатого скота, риновирус, ЕСНО-вирус, ротавирус, респираторно-синцитиальный вирус, папилломавирус, паповавирус, цитомегаловирус, эхиновирус, арбовирус, хантавирус, коксаки-вирус, вирус эпидемического паротита, вирус кори, вирус краснухи, полиовирус, возбудитель натуральной оспы, вирус Эпштейна-Барра, вирус иммунодефицита человека типа I (HIV-I), вирус иммунодефицита человека типа II (HIV-II), возбудитель вирусного менингита, возбудитель вирусного энцефалита, возбудитель денге, возбудитель натуральной оспы; микобактерии, рикеттсии, микоплазма, нейссерии, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, возбудитель столбняка, возбудитель коклюша, возбудитель холеры, возбудитель чумы,

возбудитель дифтерии, хламидии и легионеллы; лейшмания, возбудитель кокцидиоза, трипаносома или возбудитель малярии; хламидии и рикеттсии.

Термин «моноклональное антитело» относится к гомогенной совокупности антител, причем моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе и не встречающихся в природе), которые участвуют в избирательном связывании антигена. Моноклональные антитела являются в высокой степени специфическими, будучи направленными против одной области детерминанты. Термин «моноклональное антитело» охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), одиночную цепь (ScFv), их мутанты, слитые белки, включающие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт распознавания антигена требуемой специфичности и со способностью связываться с антигеном. Оно, как предполагается, не ограничивается источником антитела или способом, которым его получают (например, с использованием гибридомы, отбора фагов, экспрессии рекомбинантных молекул, трансгенных животных и т.д.). Термин включает полные иммуноглобулины, а также фрагменты и т.д., описанные выше при определении «антитела».

Термин «гуманизированное антитело» относится к химерной молекуле, обычно приготовленной, используя методы с использованием рекомбинантных ДНК, имеющей антигенсвязывающий сайт, происходящий из иммуноглобулина не являющегося человеком вида, а остальная структура молекулы иммуноглобулина основана на структуре и/или последовательности иммуноглобулина человека. Антигенсвязывающий сайт может включать или целые переменные домены, вставленные в константные домены, или лишь определяющие комплементарность участки (CDR), пересаженные в соответствующие каркасные области переменных доменов. Антигенсвязывающие сайты могут быть дикого типа или быть модифицированными в результате одной или более аминокислотных замен. Это исключает

функционирование константной области в качестве иммуногена у являющихся людьми индивидуумов, но сохраняется возможность иммунного ответа на чужеродную переменную область (LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224). Другой подход сосредоточен не только на обеспечении происходящих от человека константных областей, но также на модификации переменных областей, чтобы придать им новую форму, по возможности близкую к человеческой форме. Известно, что переменные области как тяжелой, так и легкой цепей содержат три определяющих комплементарность участка (CDR), которые варьируют в ответ на соответствующие антигены и определяют способность к связыванию, фланкированных четырьмя каркасными областями (FR), которые являются относительно консервативными у конкретного вида и которые предположительно обеспечивают каркас для CDR. При приготовлении нечеловеческих антител к конкретному антигену переменным областям можно «придать новую форму» или «подвергнуть их гуманизации» посредством пересадки CDR, происходящих из нечеловеческого антитела, в FR, присутствующие в антителе человека, которые модифицируют. О применении этого подхода к различным антителам было сообщено в Sato, K. et al. (1993) Cancer Res 53: 851-856; Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332: 323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239: 1534-1536; Kettleborough, C.A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4: 773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2: 124-134; Gorman, S.D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9: 266-271; Co, M.S. et al. (1991)

"Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88: 2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89: 4285-4289; и Co, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148: 1149-1154.

В некоторых вариантах осуществления в гуманизованных антителах сохранены все последовательности CDR (например, в гуманизованном мышинном антителе, которое содержит все шесть CDR из мышинных антител). В других вариантах осуществления гуманизованные антитела содержат один или более CDR (один, два, три, четыре, пять, шесть), которые изменены относительно исходного антитела, которые также называют одним или более CDR, «происходящих от» одного или более CDR исходного антитела. Как описано ниже, предпочтительные антитела по настоящему изобретению содержат специфические идентифицированные CDR. В настоящем изобретении, однако, предусматриваются эквивалентные антитела, содержащие измененные CDR.

Говорят, что антитело или полипептид, как здесь используется, «иммуноспецифически» или, что эквивалентно, «специфически» связывается с участком другой молекулы (т.е. эпитопом), если оно реагирует или ассоциируется более часто, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с этим эпитопом, чем с альтернативными эпитопами. Например, антителом, которое специфически связывается с эпитопом CD3, является антитело, которое связывается с этим эпитопом CD3 с большей аффинностью, авидностью, быстрее и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими эпитопами CD3 или не относящимися к CD3 эпитопами. Под интерпретацией этого определения также подразумевается, что, например, антитело (или составляющая или эпитоп), которое иммуноспецифически связывается с первой мишенью, может связываться или может не связываться специфически или предпочтительно со второй мишенью. По существу, «иммуноспецифическое связывание» не подразумевает обязательно (хотя оно может включать) «исключительное» связывание. Как

правило, но необязательно, ссылка на связывание означает «иммуноспецифическое» связывание.

Используемый здесь термин «иммунологически активный» в отношении эпитопа, являющегося или «остающегося иммунологически активным», относится к способности антитела (например, антитела против CD3) к связыванию с эпитопом в различных условиях, например, после подвергания эпитопа воздействию восстанавливающих и денатурирующих условий. Например, если антитело больше не способно связываться с денатурированным эпитопом, говорят, что этот эпитоп сделался иммунологически неактивным.

Различные биологические функции связаны с антителами против CD3 по настоящему изобретению, и такие антитела могут проявлять любое или все из следующих характерных свойств, или могут испытывать недостаток одного, двух, трех или более таких характерных свойств: способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности нормальной Т-клетки человека; способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности лейкозной Т-клетки человека; способность к специфическому связыванию с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака), который эндогенно представлен на поверхности нормальной Т-клетки не являющегося человеком млекопитающего; способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим, который эндогенно представлен на поверхности нормальной нечеловеческой Т-клетки; способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим, который эндогенно представлен на поверхности нечеловеческой лейкозной Т-клетки; способность нейтрализовать (т.е. блокировать или препятствовать связыванию) образование комплекса с CD3; способность нейтрализовать образование комплекса с TCR; способность к модулированию (или антагонистически, или агонистически) передачи сигнала TCR-комплексом; способность к связыванию с Fc-рецептором; способность к конкурентному ингибированию предпочтительного связывания известного антитела против CD3 с CD3, включая



способность к предпочтительному связыванию с тем же эпитопом CD3, с которым предпочтительно связывается исходное антитело; способность к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой клетки *in vitro* или *in vivo*; способность к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой раковой клетки; способность к доставке химиотерапевтического средства в раковую Т-клетку; и/или способность к доставке терапевтического средства, токсина или выявляемого маркера в Т-клетку. Как здесь обсуждалось, полипептиды (в том числе антитела) по настоящему изобретению могут обладать любым одним или более из этих характерных свойств.

Используемый здесь термин «средство (агент)» относится к биологическому, фармацевтическому или химическому соединению. Неограничивающие примеры включают простую или сложную органическую или неорганическую молекулу, пептид, белок, олигонуклеотид, антитело, производное антитела, фрагмент антитела, производное витамина, углеводов, токсинов или химиотерапевтического соединения. Можно синтезировать различные соединения, например, небольшие молекулы и олигомеры (например, олигопептиды и олигонуклеотиды), и синтетические органические соединения, основанные на различных базовых структурах. Кроме того, различные природные источники, такие как экстракты из растений или животных и т.п., могут предоставить соединения для отбора. Агенты, используемые в способах по этому изобретению, могут быть отобраны случайно или отобраны рационально или сконструированы. Говорят, что агент, как здесь используется, отобран случайно, если агент выбран без предварительного рассмотрения специфических аминокислотных или других химических составляющих, участвующих в ассоциации молекулы с ее природным партнером(ами) по связыванию или известными антителами, или без знания о них. Примером случайно отобранного агента является агент, который идентифицирован благодаря использованию химической библиотеки или пептидной комбинаторной библиотеки или ее скринингу. Говорят, что агент, как здесь используется, отобран рационально или сконструирован, если агент выбран на

неслучайной основе, учитывающей последовательность центра мишени и/или его конформацию в связи с действием этого агента. Агент можно отобрать рационально или сконструировать рационально посредством использования пептидных последовательностей, которые образуют места контактов в комплексе рецептор/лиганд и/или CD3/антитело против CD3. Например, рационально отобранным агентом в виде пептида может быть пептид, аминокислотная последовательность которого идентична эпитопу, появляющемуся в CD3, когда он выставлен на поверхности живой клетки в ее природном окружении. Такой агент будет уменьшать или блокировать ассоциацию антитела против CD3 с CD3, или ассоциацию CD3 с его природным лигандом, по желанию, при связывании с антителом против CD3 или с его природным лигандом.

Используемый здесь термин «меченое», что касается антитела, как предполагается, охватывает прямое мечение антитела посредством соединения (т.е. физической связи) выявляемого вещества, такого как радиоактивный агент или флуорофор (например, фикоэритрин (PE) или флуоресцеин изотиоцианат (также известный как фторизотиоцианат или FITC) с антителом, а также непрямое мечение зонда или антитела в результате реактивности с выявляемым веществом.

Используемый здесь термин «ассоциация», что касается антитела, включает ковалентное или нековалентное присоединение или связывание агента (например, химиотерапевтического средства) к (с) антителу(ом). Ассоциацию антитела с агентом (например, химиотерапевтическим средством) можно осуществить посредством прямого связывания или непрямого связывания через присоединение к общей платформе, так что антитело определяет локализацию агента в раковой клетке, с которой связывается антитело, и причем антитело и агент не подвергаются в значительной степени диссоциации при физиологических условиях, так что агент не направлен на ту же раковую клетку, с которой связывается антитело, или так что эффективность агента не уменьшается.

Термин «биологический образец» охватывает множество типов

образцов, которые получают от индивидуума и могут использоваться в исследовании с целью диагностики или контроля. Определение охватывает слюну, кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, твердые образцы тканей, такие как биопсийный образец, или культуры тканей или клетки, происходящие из них, и их потомство, например, клетки, полученные из образца ткани, взятого у индивидуума с подозрением на наличие у него рака, в предпочтительных вариантах осуществления ткани яичника, легкого, предстательной железы, поджелудочной железы, ободочной кишки и молочной железы. Определение также включает образцы, которыми манипулировали после их получения любым образом, например, посредством обработки реагентами, солюбилизации или обогащения в отношении определенных компонентов, таких как белки или полинуклеотиды, или заделки в полутвердую или твердую матрицу с целью изготовления срезов. Термин «биологический образец» охватывает клинический образец, а также включает клетки в культуре, клеточные супернатанты, клеточные лизаты, сыворотку, плазму, биологическую жидкость и образцы тканей.

Термин «клетка-хозяин» включает отдельную клетку или культуру клеток, которая может быть или была реципиентом вектора(ов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство одной клетки-хозяина, и это потомство может необязательно быть полностью идентичным (по морфологии или набору геномных ДНК) исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или неслучайной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные *in vivo* полинуклеотидом(ами) по этому изобретению.

Как здесь используется, «эффективное количество» фармацевтической композиции, в одном варианте осуществления, является количеством, достаточным для обеспечения благотворных или желательных результатов, включающих, но без ограничения, клинические результаты, такие как уменьшение размера или скорости роста опухоли, отсрочка или ослабление воспалительной реакции, улучшение качества жизни тех, кто страдает заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств,

необходимых для лечения такого заболевания, усиление эффекта другого лекарственного средства, например, посредством направленной доставки и/или интернализации, отсрочка прогрессирования заболевания и/или увеличение продолжительности жизни индивидуумов. Такое эффективное количество может вводиться при одном или более введениях. Применительно к целям этого изобретения, эффективным количеством лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции является количество, достаточное для улучшения клинического наблюдаемого состояния.

В некоторых вариантах осуществления эффективного количества лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции можно достичь или можно не достичь вместе с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» может рассматриваться в рамках введения одного или более дополнительных средств, и можно считать, что одно средство назначено в эффективном количестве, если, вместе с одним или более других средств, может быть достигнут или достигается желаемый результат. Хотя индивидуальные потребности варьируют, определение оптимальных диапазонов эффективных количеств каждого соединения является частью профессиональных знаний данной области техники. Типичная доза, вводимая пациенту, обычно составляет от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг веса тела пациента. Предпочтительно, вводимая пациенту доза находится между 0,0001 мг/кг и 20 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 10 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 5 мг/кг, 0,0001 и 2 мг/кг, 0,0001 и 1 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,75 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,5 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0.25 мг/кг, 0,0001 и 0,15 мг/кг, 0,0001 и 0,10 мг/кг, 0,001 и 0,5 мг/кг, 0,01 и 0,25 мг/кг или 0,01 и 0,10 мг/кг веса тела пациента. Дозу и частоту введения молекул по настоящему изобретению можно уменьшить или изменить с помощью увеличения поглощения и проникновения в ткани молекул по настоящему изобретению посредством модификаций, таких как, например, липидизация.

Говорят, что молекула нуклеиновой кислоты или агент,

антитело, композиция или клетка и т.д., как здесь используется, является «выделенной», если эта молекула нуклеиновой кислоты, агент, антитело, композиция или клетка и т.д. отделена в значительной степени от примесных молекул нуклеиновых кислот, антител, агентов, композиций или клеток и т.д., которые присутствуют в природе в ее первоначальном источнике.

Термин «индивидуум» относится к позвоночному животному, предпочтительно млекопитающему. Млекопитающие включают, но без ограничения, людей, сельскохозяйственных животных, животных для спортивных мероприятий, любимых домашних животных, приматов, мышей и крыс. В наиболее предпочтительном варианте осуществления термин «индивидуум» означает человека.

Термины «полипептид», «олигопептид», «пептид» и «белок» используются здесь взаимозаменяемо для ссылки на полимеры из аминокислот любой длины. Полимер может быть неразветвленным или разветвленным, он может включать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован в природе или в результате вмешательства, например, образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или модификации, такой как конъюгация с компонентом-меткой. В это определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включая, например, неприродные аминокислоты и т.д.), а также другие модификации, известные в данной области техники. Понятно, что, поскольку полипептиды по этому изобретению основаны на антителе, могут встречаться полипептиды в виде одиночных цепей или в виде соединенных цепей.

Используемый здесь термин «в значительной степени чистый» относится к материалу с по крайней мере 50% степенью чистоты (т.е. без примесей), более предпочтительно с по крайней мере 90% степенью чистоты, более предпочтительно с по крайней мере 95% степенью чистоты, более предпочтительно с по крайней мере 98% степенью чистоты, более предпочтительно с по крайней мере 99% степенью чистоты и наиболее предпочтительно с превышающей

99% степенью чистоты.

Используемый здесь термин «токсин» относится к любому веществу, которое обеспечивает отрицательную реакцию в клетке. Например, токсин, направленный на раковую клетку, будет оказывать отрицательное, иногда вредное воздействие на раковую клетку. Примеры токсинов включают, но без ограничения, таксан, майтансиноид, ауристати́н (например, монометилауристати́н (ММАЕ), монометилауристати́н F (ММАF), ауристати́н E (АЕ) и т.д.) (например, те, которые описаны в патентах США №№ 5208020, 5416064, 6333410, 6340701, 6372738, 6436931, 6441163, 6596757, 7276497, 7585857 или 7851432), калихеамицин, антрациклин (например, доксорубицин), аналог СС-1065, доцетаксел, катепсин В или Е, рицин, гелонин, *Pseudomonas* экзотоксин, дифтерийный токсин и РНКазу; меченные радиоактивными изотопами антитела (например, конъюгированные с тиуксетаном или меченные токсичным радиоизотопом (например,  $^{90}\text{Y}$ ;  $^{13}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  и т.д.)).

Используемый здесь термин «лечение» означает способ получения благотворного или желаемого результата, в том числе и предпочтительно благотворного или желаемого клинического результата. Такие благотворные или желаемые клинические результаты включают, но без ограничения, одно или более из следующего: уменьшение воспаления или аутоиммунной реакции, уменьшение пролиферации (или уничтожение) раковых клеток или других нездоровых клеток, уменьшение метастазирования раковых клеток, обнаруживаемого при злокачественных новообразованиях, сокращение размера опухоли, ослабление симптомов, являющихся следствием заболевания, улучшение качества жизни тех, кто страдает этим заболеванием, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения этого заболевания, отсрочку прогрессирования заболевания и/или увеличение продолжительности жизни индивидуумов.

## **II. Способы создания антител и полипептидов по настоящему изобретению**

Способы создания моноклональных антител известны в данной области техники. Одним способом, который может использоваться,

является способ Kohler, G. и др. ((1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256: 495-497) или его модификация. Типично моноклональные антитела создают в не являющихся людьми видах, таких как мыши. Обычно мышь или крысу используют для иммунизации, но могут также использоваться другие животные. Антитела вырабатываются при иммунизации мышей иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат CD3 человека. Иммуногеном могут быть, но без ограничения, эмбриональные клетки, линии культивируемых клеток, раковые клетки, нуклеиновые кислоты или ткань.

В одном варианте осуществления моноклональные антитела, которые связываются с CD3, получают, используя клетки-хозяева, которые сверхэкспрессируют CD3, в качестве иммуногена. Такие клетки включают, в качестве примера, а не ограничения, Т-клетки человека.

Для контролирования образования антител небольшой биологический образец (например, кровь) может быть получен от животного и проверен в отношении титра антител против иммуногена. Селезенка и/или несколько больших лимфатических узлов могут быть извлечены и подвергнуты диссоциации до отдельных клеток. Если желательно, клетки селезенки могут быть подвергнуты скринингу (после удаления неспецифически присоединенных клеток) посредством внесения клеточной суспензии в планшет или лунку, покрытый(ую) антигеном. В-клетки, экспрессирующие связанный с мембраной иммуноглобулин, специфический в отношении антигена, будут связываться с планшетом и не смываются вместе с остальной частью суспензии. Получаемые в результате В-клетки, или все диссоциированные клетки селезенки, можно затем слить с миеломными клетками (например, X63-Ag8.653 и клетками из Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, CA). Полиэтиленгликоль (ПЭГ) может использоваться для слияния клеток селезенки или лимфоцитов с миеломными клетками для образования гибридомы. Затем гибридоме подвергают культивированию в селективной среде

(например, содержащей гипоксантин, аминоптерин, тимидин среде, по-другому известной как «среда HAT»). Получающиеся гибридомы затем высевают методом серийных разведений и исследуют в отношении продукции антител, которые специфически связываются с иммуногеном, используя, например, FACS (клеточный сортинг с возбуждением флуоресценции) или отбор с использованием иммуногистохимического исследования (ИНС). Отобранные гибридомы, секретирующие моноклональные антитела, затем культивируют или *in vitro* (например, в матрасах для культур тканей или половолоконных реакторах), или *in vivo* (например, в виде асцитических жидкостей у мышей).

В качестве другой альтернативы методу слияния клеток, могут использоваться В-клетки, иммортализованные с помощью вируса Эпштейна-Барра (EBV), для продукции моноклональных антител по рассматриваемому изобретению. Гибридомы наращивают и субклонируют, если желательно, и супернатанты исследуют в отношении антииммуногенной активности с помощью обычных процедур исследования (например, FACS, ИНС, радиоиммуноанализа, иммуноферментного анализа, флуоресцентного иммуноанализа и т.д.).

В случае другой альтернативы, моноклональное антитело против CD3 или любые другие эквивалентные антитела можно секвенировать и продуцировать рекомбинантно с помощью любого способа, известного в данной области техники (например, гуманизации, использования трансгенных мышей для продуцирования полностью человеческих антител, технологии фагового дисплея и т.д.). В одном варианте осуществления моноклональное антитело против CD3 секвенируют, а затем полинуклеотидную последовательность клонируют в вектор для экспрессии или наращивания. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, и клетку-хозяина можно затем нарастить и заморозить для дальнейшего использования.

Полинуклеотидная последовательность моноклонального антитела против CD3 и любых других эквивалентных антител может использоваться для генетической манипуляции с целью создания



«гуманизированного» антитела, увеличения аффинности или улучшения других характеристик антитела. Общий принцип при гуманизации антитела включает в себя сохранение основной последовательности антигенсвязывающей части антитела, при замене нечеловеческой оставшейся части антитела последовательностями антитела человека. Существуют четыре общих стадии с целью гуманизации моноклонального антитела. Этими стадиями являются: (1) определение нуклеотидной и предсказываемой аминокислотной последовательности переменных доменов легкой и тяжелой цепей исходного антитела; (2) конструирование гуманизированного антитела, т.е. решение, какую каркасную область антитела использовать во время процесса гуманизации; (3) методологии/методы фактической гуманизации; и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. Смотрите, например, патенты США №№ 4816567, 5807715, 5866692 и 6331415.

Был описан ряд молекул «гуманизированных» антител, включающих антигенсвязывающий сайт, происходящий из нечеловеческого иммуноглобулина, в том числе химерные антитела, содержащие происходящие от грызунов или модифицированные, происходящие от грызунов V-области и связанные с ними определяющие комплементарность участки (CDR), слитые с константными доменами человека (смотрите, например, Winter et al. (1991) "Man-made Antibodies," Nature 349: 293-299; Lobuglio et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) "Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen," J. Immunol. 138: 4534-4538, и Brown et al. (1987) "Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody," Cancer Res. 47: 3577-3583). В других ссылочных документах описываются происходящие от грызунов CDR, пересаженные в человеческую поддерживающую каркасную область (FR) до слияния с соответствующим константным доменом антитела человека (смотрите, например, Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping

Human Antibodies for Therapy," Nature 332: 323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239: 1534-1536; и Jones et al. (1986) "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse," Nature 321: 522-525). В другом ссылочном документе описываются происходящие от грызунов CDR, поддерживаемые рекомбинантно венерованными каркасными областями, происходящими от грызунов. Смотрите, например, публикацию Европейского патента № 519596. Эти «гуманизированные» молекулы разработаны для минимизации нежелательной иммунологической реакции по отношению к молекулам античеловеческих антител грызунов, которая ограничивает продолжительность и эффективность терапевтических применений этих составляющих у являющихся людьми реципиентов. Другие способы гуманизации антител, которые также могут использоваться, описаны в Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19: 2471-2476 и в патентах США №№ 6180377, 6054297, 5997867 и 5866692.

Настоящим изобретением также охватываются одноцепочечные Fv-фрагменты («scFv») антител по этому изобретению, такие как мышинный анти-CD3. Одноцепочечные Fv-фрагменты создают посредством связывания переменных областей легкой и/или тяжелой цепи, используя короткий пептид-линкер. Bird и др. ((1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242: 423-426) приводят пример пептидов-линкеров, которые образуют перемычку размером приблизительно 3,5 нм между карбоксильным концом одной переменной области и амино-концом другой переменной области. Были разработаны и использовались линкеры с другими последовательностями (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242: 423-426). Линкеры могут быть в свою очередь модифицированы ради дополнительных функций, таких как присоединение лекарственных средств или присоединение к твердым подложкам. Одноцепочечные варианты

можно продуцировать или рекомбинантно, или синтетически. Для синтетического получения scFv может использоваться автоматический синтезатор. Для рекомбинантной продукции scFv подходящая плаزمид, содержащая полинуклеотид, который кодирует scFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяина, или эукариотическую, такую как дрожжи, клетки растений, насекомых или млекопитающих, или прокариотическую, такую как *E. coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес scFv, можно создать с помощью обычных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Результирующий scFv можно выделить, используя стандартные методы очистки белков, известные в данной области техники.

Настоящее изобретение включает модификации по отношению к антителам против CD3 и их связывающим фрагментам. Модифицирование полипептидов является обычной практической деятельностью в данной области техники, и его подробное описание здесь не требуется. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или более делеций или добавлений аминокислот, которые не приводят в значительной степени к вредным изменениям функциональной активности, или использованием химическим аналогов. Аминокислотные остатки, которые могут быть консервативно заменены один другим, включают, но без ограничения: глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновую кислоту/глутаминовую кислоту; серин/треонин; лизин/аргинин и фенилаланин/тирозин. Эти полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование с использованием различных сахаров, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно, если бы аминокислотные замены были консервативными, т.е. замененная аминокислота обладала бы химическими свойствами, схожими с таковыми исходной аминокислоты. Такие консервативные замены известны в данной области техники, и выше представлены примеры. Аминокислотные модификации могут простирались от

изменения или модификации одной или более аминокислот до полной реконструкции области, такой как переменная область. Изменения переменной области могут привести к изменению аффинности и/или специфичности. Другие способы модифицирования включают использование методов соединения, известных в данной области техники, включающих, но без ограничения, ферментативный способ, окислительное замещение и хелатирование. Модификации могут использоваться, например, для присоединения меток в случае иммуноанализа, например, присоединения радиоактивных составляющих в случае радиоиммуноанализа. Модифицированные полипептиды создают, используя процедуры, широко известные в данной области техники, и могут быть подвергнуты скринингу, используя стандартные исследования, известные в данной области техники.

То обстоятельство, что изменение одного аминокислотного остатка в CDR может привести к утрате функционального связывания (Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6): 1979-1983), обеспечивает способ методичной идентификации альтернативных функциональных последовательностей CDR. В одном предпочтительном способе получения таких вариантов CDR, полинуклеотид, кодирующий CDR, мутируют (например, посредством неспецифического мутагенеза или метода сайт-специфического мутагенеза (например, амплификации с использованием полимеразной цепной реакции, используя праймеры, которые кодируют мутированный локус)) для получения CDR, содержащего замещенный аминокислотный остаток. Посредством сравнения идентификатора соответствующего остатка в исходной (функциональной) последовательности CDR с идентификатором варианта последовательности CDR с заменой (нефункциональной, можно определить бальную оценку этой замены BLOSUM62.iiij. Система BLOSUM обеспечивает матрицу аминокислотных замен, созданную в результате анализа базы данных, касающихся последовательностей, ради надежных совмещений (Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8): 1035-1036; Henikoff, J.G. (1992)

"Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87: 2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565). В настоящее время самой развитой базой данных BLOSUM является база данных BLOSUM62 (BLOSUM62.iiij). В таблице 1 представлены бальные оценки замен BLOSUM62.iiij (чем выше бальная оценка, тем более консервативной является замена, и, соответственно, более вероятно, что замена не будет оказывать влияние на функцию). Если антигенсвязывающий фрагмент, включающий результирующий CDR, не связывается с CD3, то считают, что бальная оценка замены BLOSUM62.iiij является недостаточно консервативной, и выбирают и осуществляют новую возможную замену, имеющую более высокую бальную оценку. Таким образом, например, если исходным остатком был глутамат (E), а нефункциональным замещающим остатком был гистидин (H), то бальная оценка замены BLOSUM62.iiij будет равна 0, и предпочтительными являются более консервативные замены (например, на аспаратат, аспарагин, глутамин или лизин).

Таблица 1																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Таким образом, в настоящем изобретении предусматривается использование неспецифического мутагенеза для идентификации улучшенных CDR. Альтернативно, для увеличения (или уменьшения) аффинности CDR может использоваться технология фагового дисплея. В случае этой технологии, называемой созреванием аффинности, используется мутагенез или «прогулка по CDR», а при повторном отборе используется антиген-мишень или его антигенный фрагмент для идентификации антител, содержащих CDR, которые связываются с большей (или меньшей) аффинностью с антигеном, чем исходное или родительское антитело (смотрите, например, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149: 3903). Мутирование целых кодонов, а не отдельных нуклеотидов приводит к получению полуслучайного набора мутаций аминокислот. Можно создать библиотеки, состоящие из совокупности вариантов клонов, каждый из которых отличается изменением одной аминокислоты в одном CDR, и содержащие варианты, отражающие каждую возможную аминокислотную замену для каждого остатка CDR. Мутанты с увеличенной (или уменьшенной) аффинностью к антигену можно отобрать посредством приведения подвергнутых иммобилизации мутантов в контакт с меченым антигеном. Любой способ скрининга, известный в данной области техники, может использоваться для идентификации мутантных антител с увеличенной или уменьшенной аффинностью к антигену (например, ELISA) (смотрите Wu et al. 1998, *Proc Natl. Acad Sci. USA* 95: 6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155: 1994). Можно использовать прогулку по CDR, в случае которой случайный характер придается легкой цепи (смотрите Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263: 551).

Способы осуществления такого созревания аффинности описаны, например, в Krause, J.C. et al. (2011) "An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody," *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) "Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas," *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) "Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder

Functionality Landscapes," J. Mol. Biol. 401(1): 84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) "Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41," MAbs 1(5): 462-474; Gustchina, E. et al. (2009) "Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naive Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth," Virology 393(1): 112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) "Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions," J. Mol. Biol. 388(3): 541-558; Bostrom, J. et al. (2009) "Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development," Methods Mol. Biol. 525: 353-376; Steidl, S. et al. (2008) "In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification," Mol. Immunol. 46(1): 135-144; и Barderas, R. et al. (2008) "Affinity maturation of antibodies assisted by in silico modeling," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 105(26): 9029-9034. В предпочтительном варианте осуществления многолуночные планшеты можно покрыть выбранным антителом против CD3 (например, 100 нг/лунку в карбонатном буфере при комнатной температуре в течение 2 ч) и впоследствии инкубировать с растворимым CD3, добавляемым в разведении 1/10, и инкубировать при комнатной температуре в течение 16 ч, или развести до концентрации 50 нг/мл в PBS-T-BSA (0,05 мл добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение по крайней мере 2 ч при комнатной температуре). Затем планшет промывают, и разведения рекомбинантных антител, начиная с 0,5 мкг/мл в PBS-T-BSA, затем добавляют и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Связывание рекомбинантных антител с захваченным антигеном затем измеряют, используя, например, конъюгат античеловеческий IgG-HRP и субстрат TMB. После остановки развития окраски, используя разбавленную серную кислоту, планшет считывают при 450 нм, и идентифицируют антитела с большей аффинностью (смотрите,

например, патент США № 7351803).

Настоящее изобретение включает полипептиды, включающие аминокислотную последовательность антител по этому изобретению. Полипептиды по этому изобретению можно создать с помощью процедур, известных в данной области техники. Полипептиды можно получить посредством протеолитического или иного расщепления антител, с помощью способов с использованием рекомбинантных молекул (т.е. отдельные или слитые полипептиды), как описано выше, или с помощью химического синтеза. С помощью химического синтеза без труда создают полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды вплоть до приблизительно 50 аминокислот. Способы химического синтеза известны в данной области техники и имеются на рынке. Например, полипептид против CD3 можно было получить с помощью автоматического синтезатора полипептидов, используя твердофазный метод.

Настоящее изобретение также включает слитые белки, включающие один или более фрагментов или районов из полипептидов и антител по этому изобретению. В одном варианте осуществления обеспечивается слитый полипептид, включающий по крайней мере 10 следующих друг за другом аминокислот переменной области легкой цепи и по крайней мере 10 аминокислот переменной области тяжелой цепи. В другом варианте осуществления слитый полипептид содержит гетерологичную константную область иммуноглобулина. В другом варианте осуществления слитый полипептид содержит переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи антитела, продуцируемого депонированной с открытым использованием гибридомой. Применительно к целям этого изобретения являющийся антителом слитый белок содержит один или более полипептидных доменов, которые специфически связываются с CD3, и другую аминокислотную последовательность, к которой он не присоединен в природной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другого района.

Анти-CD3 полипептиды и другие агонисты, антагонисты и модуляторы CD3 можно создать с помощью способов, известных в



данной области техники, например, синтетически или рекомбинантно. Один способ получения таких молекул включает химический синтез полипептида с последующей обработкой в условиях окисления, подходящих для получения природной конформации, т.е. соответствующих соединений с помощью дисульфидных связей. Это можно осуществить, используя методологии, хорошо известные квалифицированным в данной области техники специалистам (смотрите, например, Kelley, R.F. et al. (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M. et al. (1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; смотрите также патенты США №№ 4105603, 3972859, 3842067 и 3862925).

Полипептиды по настоящему изобретению можно без труда приготовить, используя твердофазный синтез пептидов (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748): 341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15): 5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1): 3-10).

Тем не менее, в другом варианте полностью человеческие антитела можно получить посредством использования имеющихся в продаже мышей, которые были созданы для экспрессии белков - специфических иммуноглобулинов человека. Трансгенных животных, которых создают для вызова более желательного (например, образования полностью человеческих антител) или более сильного иммунного ответа, можно также использовать для выработки гуманизированных или человеческих антител. Примерами такой технологии являются XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc., Fremont, CA) и HUMAB-MOUSE(R) и TC MOUSE™ (обе от Medarex, Inc., Princeton, NJ).

В варианте антитела можно создать рекомбинантно и экспрессировать, используя любой способ, известный в данной области техники. Антитела можно создать рекомбинантно

посредством сначала выделения выработанных антител из животных-хозяев, получения последовательности гена и использования последовательности гена для экспрессии антитела рекомбинантно в клетках-хозяевах (например, клетках CHO). Другим способом, который может использоваться, является экспрессия последовательности антитела в растениях (например, табаке) или трансгенном молоке. Подходящие способы экспрессии антител рекомбинантно в растениях или молоке были описаны (смотрите, например, Peeters et al. (2001) *Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*, "Vaccine 19: 2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Int. Rev. Immunol* 13: 65-93; и Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," *J. Immunol Methods* 231: 147-157). Подходящие способы получения производных антител, например, гуманизированных, одноцепочечных и т.д., известны в данной области техники. В другом варианте антитела можно создать рекомбинантно с помощью технологии фагового дисплея (смотрите, например, патенты США №№ 5565332, 5580717, 5733743, 6265150, и Winter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455).

Представляющие интерес антитела или белок можно подвергнуть секвенированию посредством расщепления белков по Эдману, которое хорошо известно квалифицированным в данной области техники специалистам. Информацию о пептидах, полученную от масс-спектрометрии или расщепления белков по Эдману, можно использовать для конструирования зондов или праймеров, которые используются для клонирования представляющего интерес белка.

Альтернативный способ клонирования представляющего интерес белка осуществляют с помощью «пэннинга», используя очищенный CD3 или его части для клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело или белок. Процедуру «пэннинга» можно проводить посредством получения библиотеки кДНК на основе тканей или клеток, которые экспрессируют CD3, сверхэкспрессии кДНК во втором типе клеток и скрининга трансфицированных клеток второго типа клеток в отношении специфического связывания с

CD3. Подробные описания способов, используемых при клонировании генов млекопитающих, кодирующих белки клеточной поверхности, с помощью «пэннинга», можно найти в данной области техники (смотрите, например, Aruffo, A. et al. (1987) "Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84: 8573-8577 и Stephan, J. et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation," Endocrinol. 140: 5841-5854).

кДНК, кодирующие антитела против CD3 и другие пептидные агонисты, антагонисты и модуляторы CD3 можно получить посредством обратного транскрибирования мРНК из конкретного типа клеток в соответствии со стандартными способами в данной области техники. В частности, мРНК можно выделить, используя различные литические ферменты или химические растворы в соответствии с процедурами, изложенными, например, в MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Third Edition (Sambrook et al. Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), или экстрагировать, используя имеющиеся в продаже связывающие нуклеиновые кислоты смолы, следуя сопроводительным инструкциям, предоставляемым производителями (например, Qiagen, Invitrogen, Promega). Синтезированные кДНК можно затем встроить в экспрессионный вектор для продукции представляющего интерес антитела или белка в клетках второго типа. Предполагается, что экспрессионный вектор должен быть реплицируемым в клетках-хозяевах или в виде эписомы, или в виде интегральной части хромосомной ДНК. Подходящие экспрессионные векторы включают, но без ограничения, плазмиды, вирусные векторы, в том числе аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, и космиды.

Векторы, содержащие представляющие интерес полинуклеотиды, можно ввести в клетку-хозяина с помощью любого из ряда соответствующих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировку

микрочастицами; липофекцию и инфицирование (например, если вектором является инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор введения векторов или полинуклеотидов будет часто зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Любые клетки-хозяева, способные к сверхэкспрессии гетерологичных ДНК, можно использовать с целью выделения генов, кодирующих представляющее интерес антитело, полипептид или белок. Неограничивающие примеры подходящих клеток млекопитающих-хозяев включают, но без ограничения, клетки COS, HeLa и CHO. Предпочтительно, когда клетки-хозяева экспрессируют кДНК на уровне, который выше приблизительно в 5 раз, более предпочтительно выше в 10 раз, даже более предпочтительно выше в 20 раз такового соответствующего эндогенного антитела или белка, представляющего интерес, в случае его наличия, в клетках-хозяевах. Скрининг клеток-хозяев в отношении специфического связывания с CD3 осуществляют с помощью иммуноанализа или FACS. Клетку, сверхэкспрессирующую представляющее интерес антитело или белок, можно идентифицировать.

### **III. Способы скрининга полипептидов и моноклональных антител**

Несколько способов могут использоваться для скрининга полипептидов и моноклональных антител, которые связываются с CD3. Понятно, что «связывание» относится к биологически или иммунологически соответствующему специфическому связыванию и не относится к неспецифическому связыванию, которое может иметь место, например, при использовании иммуноглобулина в очень высокой концентрации против неспецифической мишени. В одном варианте осуществления моноклональные антитела подвергают скринингу на предмет связывания с CD3, используя стандартные методы скрининга. Таким образом можно получить моноклональное антитело против CD3. Предпочтительными гибридами по настоящему изобретению являются те, которые продуцируют антитела mAb1 и mAb2, или их химерные или гуманизированные производные. Однако можно идентифицировать дополнительные моноклональные антитела, которые связываются с CD3. С этой

целью моноклональные антитела подвергают скринингу на предмет их дифференциальной способности к связыванию с CD3 человека, а также CD3 примата.

Любую из нескольких различных систем детектирования можно использовать для обнаружения связывания антител со срезом ткани. Типично иммуногистохимическое исследование включает связывание первого антитела с тканью, а затем второго антитела, направленного против вида, от которого первое антитело было получено, и конъюгированного с обнаруживаемым маркером (например, пероксидазой хрена (HRP) или диаминобензидином (DAB)). Одним альтернативным способом, который может использоваться, являются поликлональные, являющиеся зеркальным отображением антигенной структуры антитела или polyMICA™ (поликлональные Mirror Image Complementary Antibodies; The Binding Site Limited, Birmingham, UK; Mangham, D.C. et al. (1999) "A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies (MICA)," *Histopathology* 35(2): 129-33). Способ PolyMICA™ может использоваться для проверки связывания первых антител (например, антител против CD3) с нормальной и раковой тканью. В продаже имеется несколько видов наборов для детектирования polyMICA™: продукт № НК004.D является набором для детектирования polyMICA™, в котором используется хромоген DAB; продукт № НК004.A является набором для детектирования polyMICA™, в котором используется хромоген АЕС. Альтернативно, первое антитело можно непосредственно пометить обнаруживаемым маркером.

#### **IV. Способы получения характеристик антител против CD3**

Любой из нескольких способов может использоваться для получения характеристик антител против CD3. Одним способом является идентификация эпитопа, с которым оно связывается. Картирование эпитопов имеется на рынке от различных поставщиков, например, Pepscan Systems (Lelystad, Нидерланды). Картирование эпитопов может использоваться для определения последовательности, с которой связывается антитело против CD3. Эпитоп может быть линейным эпитопом, т.е. содержащимся в одном фрагменте аминокислот, или конформационным эпитопом,

образованным в результате пространственного взаимодействия аминокислот, которые могут необязательно содержаться в одном фрагменте.

Пептиды различных длин (например, предпочтительно длиной по крайней мере 4–6 аминокислот) можно выделить или синтезировать (например, рекомбинантно) и использовать для анализов связывания с антителом против CD3. Эпитоп, с которым связывается антитело против CD3, можно определить при методичном скрининге, используя перекрывающиеся пептиды, происходящие из экстраклеточной последовательности и определяя связывание антителом против CD3.

Тем не менее, другим способом, который может использоваться для получения характеристик антитела против CD3, является использование анализов конкуренции с другими антителами, которые, как известно, связываются с тем же антигеном, т.е. CD3, для определения того, связываются ли антитела против CD3 с тем же эпитопом, что и другие антитела. Примеры имеющихся в продаже антител против CD3 могут иметься в распоряжении и могут быть идентифицированы, используя анализы связывания, изложенные здесь. Анализы конкуренции хорошо известны квалифицированным в данной области техники специалистам, и такие процедуры и пояснительные данные детализированы далее в разделе «Примеры». Антитела против CD3 можно, кроме того, охарактеризовать в соответствии с тканями, типом рака или типом опухоли, с которыми они связываются.

#### **V. Предпочтительные композиции по настоящему изобретению**

Настоящим изобретением охватываются композиции, в том числе фармацевтические композиции, включающие антитела против CD3, полипептиды, происходящие из антител против CD3, полинуклеотиды, включающие последовательность, кодирующую антитела против CD3, и другие агенты, описываемые здесь. В настоящем изобретении, кроме того, предусматриваются конъюгаты любого пептидного агониста, антагониста или модулятора CD3 и дополнительных химических структур, которые реализуют предполагаемую функцию или функции конкретного пептидного агониста, антагониста или модулятора CD3. Эти конъюгаты

включают пептидный агонист, антагонист или модулятор CD3, ковалентно связанный с макромолекулой, такой как любая нерастворимая, являющаяся твердой подложкой матрица, используемая в способах диагностирования, скрининга или очистки, обсуждаемых здесь. Подходящие материалы матрицы включают любое вещество, которое является химически инертным, характеризуется высокой степенью пористости и имеет большое число функциональных групп, способных к образованию ковалентных связей с пептидными лигандами. Примеры материалов матриц и способов приготовления конъюгатов матрица-лиганд приведены в Dean et al. (Eds) AFFINITY CHROMATOGRAPHY: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1985); Lowe, "An Introduction to Affinity Chromatography", in Work et al. (eds) LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 7, Part II, North-Holland (1979); Porath et al., "Biospecific Affinity Chromatography", in Neurath, H. et al. (eds), THE PROTEINS, 3rd ed., Vol. 1, pp. 95-178 (1975); и Schott, H. AFFINITY CHROMATOGRAPHY, Macel Dekker, Inc. NY (1984).

Здесь также обеспечиваются конъюгаты пептидного агониста, антагониста или модулятора CD3 и любой репортерной составляющей, используемой в диагностических процедурах, описываемых здесь. Являющиеся пептидными агонистами, антагонистами или модуляторами CD3 агенты, полипептиды и белки по этому изобретению, в том числе антитела против CD3, кроме того, идентифицируют и характеризуют в соответствии с любым (одним или более) из следующих критериев:

(1) способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности нормальной Т-клетки человека;

(2) способность к специфическому связыванию с CD3 человека, который эндогенно представлен на поверхности лейкозной Т-клетки человека;

(3) способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим (например, CD3 яванского макака), который эндогенно представлен на поверхности нормальной нечеловеческой Т-клетки;

(4) способность к специфическому связыванию с CD3, не являющимся человеческим, который эндогенно представлен на поверхности нечеловеческой лейкозной Т-клетки;

(5) способность нейтрализовать (т.е. блокировать или препятствовать связыванию) образование комплекса с CD3; способность нейтрализовать образование комплекса с TCR;

(6) способность к модулированию (или антагонистически, или агонистически) передачи сигнала TCR-комплексом;

(7) способность к связыванию с Fc-рецептором;

(8) способность к конкурентному ингибированию предпочтительного связывания известного антитела против CD3 с CD3, включая способность к предпочтительному связыванию с тем же эпитопом CD3, с которым предпочтительно связывается исходное антитело;

(9) способность к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой клетки *in vitro* или *in vivo*; способностью к связыванию с частью CD3, которая представлена на поверхности живой раковой клетки;

(10) способность к доставке химиотерапевтического средства в раковую Т-клетку; и/или

(11) способность к доставке терапевтического средства, токсина или выявляемого маркера в Т-клетку.

Предпочтительное антитело по настоящему изобретению будет демонстрировать дифференциальное ИНС окрашивание опухолевой ткани по отношению к нормальной, нераковой ткани и будет, кроме того, способно к проверке в моделях на примате (и особенно яванском макаке) эффективности антитела. Предпочтительные антитела по настоящему изобретению будут, кроме того, проявлять желаемые уровни аффинности и антигенной специфичности. Предпочтительные антитела по настоящему изобретению будут, кроме того, проявлять желаемые уровни иммуномодулирующей активности и интернализации в клетки.

В некоторых вариантах осуществления антителом по настоящему изобретению является антитело, которое продуцирует гибридома mAb1 или гибридома mAb2, которые соответственно экспрессируют мышиное антитело mAb1 и мышиное антитело mAb2,



или ее потомство. Настоящим изобретением также охватываются различные препараты антител, продуцируемых этими гибридомами, и эквивалентные антитела или полипептидные фрагменты (например, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv, Fc и т.д.), химерные антитела, одиночная цепь (ScFv), их мутанты, слитые белки, включающие часть антитела, гуманизированные антитела и любая другая модифицированная конфигурация любого из этих или эквивалентных антител, которая включает сайт распознавания антигена (CD3) требуемой специфичности. Настоящим изобретением также обеспечиваются антитела человека, демонстрирующие одну или более из биологических характеристик члена анти-CD3 семейства. Эквивалентные антитела анти-CD3 семейства (в том числе гуманизированные антитела и антитела человека), полипептидные фрагменты и полипептиды, включающие любой из этих фрагментов, идентифицируют и характеризуют в соответствии с любым (одним или более) из описанных выше критериев.

Соответственно, настоящим изобретением обеспечивается любое из следующего (или композиции, в том числе фармацевтические композиции, включающие любое из следующего): (a) антитело, продуцированное клеткой-хозяином или ее потомством; (b) гуманизированная форма такого антитела; (c) антитело, включающее одну или более переменных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи такого антитела; (d) химерное антитело, включающее переменные области, гомологичные переменным областям тяжелой цепи и легкой цепи такого антитела или происходящие от них, и константные области, гомологичные константным областям тяжелой цепи и легкой цепи антитела человека или происходящие от них; (e) антитело, включающее один или более CDR (по крайней мере один, два, три, четыре, пять или шесть) легкой цепи и/или тяжелой цепи такого антитела; (f) антитело, включающее тяжелую и/или легкую цепь такого антитела; (g) антитело человека, которое эквивалентно такому антителу. Гуманизированная форма антитела может содержать или может не содержать CDR, идентичные таковым исходного антитела, или антитела, продуцированного клеткой-хозяином, определенного выше. Определение CDR-участков

полностью является частью профессиональных знаний данной области техники. Другие варианты осуществления включают антитела, которые содержат по крайней мере два, три, четыре, пять или шесть CDR, которые в значительной степени гомологичны по крайней мере двум, трем, четырем, пяти или шести CDR антитела, продуцируемого депонированной гибридомой, определенной здесь, или происходят из такого антитела. Понятно, что в контексте этого изобретения специфичность связывания и/или общая активность, как правило, сохраняется, хотя степень активности может отличаться по сравнению с антителом, продуцируемым депонированной гибридомой (может быть выше или ниже). Настоящим изобретением также обеспечиваются способы создания любых из этих антител. Способы создания антител известны в данной области техники и описаны здесь.

Настоящим изобретением также обеспечиваются полипептиды, включающие аминокислотную последовательность антител по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления полипептиды включают одну или более переменных областей легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления полипептиды включают один или более CDR легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления полипептиды включают три CDR легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления полипептид включает аминокислотную последовательность антитела, которая содержит любое из следующего: по крайней мере 5 следующих друг за другом аминокислот последовательности исходного антитела, по крайней мере 8 следующих друг за другом аминокислот, по крайней мере приблизительно 10 следующих друг за другом аминокислот, по крайней мере приблизительно 15 следующих друг за другом аминокислот, по крайней мере приблизительно 20 следующих друг за другом аминокислот, по крайней мере приблизительно 25 следующих друг за другом аминокислот, по крайней мере приблизительно 30 следующих друг за другом аминокислот, причем по крайней мере 3 из аминокислот происходят из переменной области антитела. В одном варианте осуществления переменная область происходит из легкой цепи

исходного антитела. В другом варианте осуществления переменная область происходит из тяжелой цепи антитела. В другом варианте осуществления 5 (или более) следующих друг за другом аминокислот происходят из определяющего комплементарность участка (CDR) антитела.

В некоторых вариантах осуществления этого изобретения клетки по этому изобретению, которые экспрессируют CD3, часть CD3, антитела против CD3 и другие CD3-связывающие полипептиды по этому изобретению, вводят непосредственно индивидууму для модулирования *in vivo* биологической активности CD3.

Предпочтительными антителами против CD3 по настоящему изобретению являются mAb1 и mAb2, и их гуманизированные или химерные производные и антигенсвязывающие фрагменты, которые реагируют с молекулой CD3 человека и яванского макака. Ниже представлены аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи мышинных антител mAb1 и mAb2 и кодирующие их полинуклеотидные последовательности. Последовательности CDR приводимых в качестве примера антител (mAb1 и mAb2) начертаны полужирно и подчеркнуты.

#### **A. Последовательности переменных областей мышинного моноклонального антитела mAb1**

Аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи мышинного моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 1):

QVVLTSQSPAI MSAFPGEKVT MTC**SASSSVS** **YMNWYQQKSG** TSPKRWIY**DS**  
**SKLAS**GVVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMETE DAATYYC**QQW** **SRNPPT**FGGG  
 TKLQITR

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи мышинного моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 2):

caggtggtgc tgaccagtc ccccgccatc atgtccgcct tccccggcga  
 gaaagtgaca atgacctgct ccgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact  
 ggtatcagca gaagtccggc acctccccca agcgggtggat ctacgactcc  
 tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga ttctctggct ccggctccgg  
 caccagctac tccctgacca tctcctccat ggaaccgag gacgccgcca  
 cctactactg ccagcagtgg tcccggaacc ccctacctt cggcggaggc  
 accaagctgc agatcaccag a

Аминокислотная последовательность вариательной области тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 3):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT **RSTMHWVKQR** PGQGLEWIGY  
**INPSSAYTNY** **NQKFKDKATL** TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAS**PQ**  
**VHYDYNQFPY** WGQGTLVTVS S

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариательную область тяжелой цепи мышинового моноклонального антитела mAb1 (SEQ ID NO: 4):

caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgctc  
 cgtgaagatg tcttgcaagg cctccggcta caccttcacc cggtcacca  
 tgcactgggt gaaacagcgg cctggacagg gcctggaatg gatcggctac  
 atcaaccctt ccagcgcta caccaactac aaccagaagt tcaaggacaa  
 ggccaccctg accgccgaca agtcctccag caccgcctac atgcagctgt  
 cctccctgac ctccgaggac tccgccgtgt actactgcgc ctccccccag  
 gtgcaactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt  
 gacagtgtcc tcc

#### **В. Последовательности вариательных областей мышинового моноклонального антитела mAb2**

Аминокислотная последовательность вариательной области легкой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 5):

QAVVTQESAL TTSPGETVTL TCR**SSTGAVT** **TSNYAN**WVQE KPDHLFTGLI  
**GGTNKRAP**GV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAIYFC **ALWYSNLWVF**  
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариательную область легкой цепи мышинового моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 6):

caggccgtgg tgacacagga gtcagctctg accacatccc caggcgaaac  
 agtgactctg acctgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact  
 acgctaattg ggtgcaggag aagcccgacc acctgttcac tgggctgac  
 ggcggaacca acaaaagggc acccgggtgtg cctgcccggg tttctggcag  
 tctgatcgga gacaaggccg ctctgacaat tactggcgcc cagacagagg  
 atgaagctat ttacttctgt gcaactgtgg atagcaatct gtgggtgttt  
 gggggtggca ccaactgac agtgctggga

Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 7):

**EVKLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYCYVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA**

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая варибельную область тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 8):

gaggtgaagc tgctggaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc  
 actgaaactg tcctgcgccg cctccggctt cacctttaac acatacgcta  
 tgaattgggt gcgacaggca cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg  
 atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa  
 ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt ctgtatctgc  
 agatgaaca tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg  
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attgggggaca  
 ggggacactg gtgactgtgt cttcc

Положение 40 тяжелой цепи является положением якорного остатка связывающего пептида с высокой аффинностью класса II МНС. Положения 44, 48, 54, 94, 99 и 108 тяжелой цепи являются положениями якорных остатков связывающего пептида со средней аффинностью класса II МНС. Положение 69 легкой цепи является положением якорного остатка связывающего пептида с высокой аффинностью класса II МНС. Положение 59 легкой цепи является положением якорного остатка связывающего пептида со средней аффинностью класса II МНС. Эти остатки можно заменить, используя стандартные методы молекулярной биологии, на какой-либо остаток для ослабления или исключения сайта распознавания МНС класса II.

### **С. Антитела против CD3 со сконструированным Fc**

При обычном функционировании иммунной системы

взаимодействие комплексов антитело-антиген с клетками иммунной системы приводит к широкому ряду реакций, распространяющихся от эффекторных функций, таких как антителозависимая цитотоксичность, дегрануляция тучных клеток и фагоцитоз, до иммуномодулирующих сигналов, таких как пролиферация регулирующих лимфоцитов и секреция антител. Любые из этих взаимодействий инициируются благодаря связыванию Fc-домена антител или иммунных комплексов со специализированными рецепторами клеточной поверхности гемопоэтических клеток. Разнообразие клеточных реакций, запускаемых антителами и иммунными комплексами, является следствием структурной гетерогенности трех Fc-рецепторов: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) и FcγRIII (CD16) являются активирующими (т.е. усиливающими иммунную систему) рецепторами; FcγRIIB (CD32B) является ингибирующим (т.е. успокаивающим иммунную систему) рецептором. Аминокислотная последовательность Fc-области IgG1 представлена ниже (как SEQ ID NO: 9, с нумерацией в соответствии с Kabat и др. (SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, NIH, MD (1991), который включен в настоящее описание в словесной форме посредством ссылки, ниже называемой «Kabat EU»). Остатки 230–341 являются CH2-областью Fc. Остатки 342–447 являются CH3-областью Fc.

PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV
230	240	250	260	270
DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP
280	290	300	310	320
APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV
330	340	350	360	370
EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCSVMH
380	390	400	410	420
EALHNHYTQK	SLSLSPGK			
430	440			

Поскольку не связывающиеся с Fc-рецептором (FcR) CD3-специфические антитела являются в минимальной степени истощающими, было выдвинуто предположение, что они могут изменять сигналы от TCR так, что могла бы индуцироваться

иммунологическая толерантность (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity," *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657). Таким образом, такая терапия имеет потенциальное применение при лечении аутоиммунного заболевания и отторжения вследствие реакции «хозяин против трансплантата». Не связывающиеся с FcR CD3-специфические антитела, как также было постулировано, индуцируют толерантность в виде ремиссии сахарного диабета типа 1 (St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity," *Curr. Opin. Immunol.* 21(6): 648-657; Masharani, U.B. et al. (2010) "Teplizumab Therapy For Type 1 Diabetes," *Expert Opin. Biol. Ther.* 10(3): 459-465).

Таким образом, настоящее изобретение включает специфически связывающиеся с CD3 антитела, которые включают вариант Fc-области, имеющие Fc-области, которые модифицированы (например, содержат замены, делеции, вставки в одной или более частей), чтобы быть неспособными или менее способными к связыванию с Fc-рецептором (по сравнению с антителом, содержащим те же CDR, но Fc-область дикого типа).

В одном варианте осуществления такие антитела будут неспособны к связыванию с любым Fc-рецептором. Альтернативно, Fc-область антитела будет модифицирована так, чтобы дать ей возможность связываться с такими Fc-рецепторами, как FcγRIIB, которые являются ингибиторными, но не с такими Fc-рецепторами, как FcγRIIA, FcγRIIIA или FcγRIIIB, которые стимулируют активацию иммунной системы.

Предпочтительно, способности к связыванию молекул по настоящему изобретению определяют с помощью *in vitro* функциональных анализов для определения одной или более FcγR-опосредуемых функций клеток-эффекторов. Аффинности и способности к связыванию молекул, например антител, по настоящему изобретению к (с) FcγR можно определить, используя *in vitro* анализы (биохимические или иммунологические анализы), известные в данной области техники для определения взаимодействий антитело-антиген или Fc-FcγR, т.е. специфического связывания антигена с антителом или

специфического связывания Fc-области с FcγR, соответственно, включающие, но без ограничения, анализ ELISA, анализ с использованием поверхностного плазмонного резонанса, анализ методом иммунопреципитации. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению обладают способностями к связыванию в *in vivo* моделях (таких как те, которые описаны и раскрыты здесь), схожими с таковыми в *in vitro* анализах. Однако настоящее изобретение не исключает молекулы по настоящему изобретению, которые не демонстрируют желаемый фенотип в *in vitro* анализах, но демонстрируют желаемый фенотип *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению, включающие вариант Fc-области, включают по крайней мере одну модификацию аминокислоты (например, имея 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более модификаций аминокислот) в CN3-домене Fc-области, который определяют как домен, расположенный от аминокислоты 342 до аминокислоты 447. В других вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению, включающие вариант Fc-области, включают по крайней мере одну модификацию аминокислоты (например, имея 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более модификаций аминокислот) в CN2-домене Fc-области, который определяют как домен, расположенный от аминокислоты 231 до аминокислоты 341. В некоторых вариантах осуществления молекулы по настоящему изобретению включают по крайней мере две модификации аминокислот (например, имея 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более модификаций аминокислот), причем по крайней мере одна такая модификация находится в CN3-области, и по крайней мере одна такая модификация находится в CN2-области. Настоящим изобретением, кроме того, охватывается модификация аминокислоты в шарнирной области. В отдельном варианте осуществления настоящим изобретением охватывается модификация аминокислоты в CN1-домене Fc-области, который определяют как домен, расположенный от аминокислоты 216 до аминокислоты 230.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящим изобретением охватываются молекулы, включающие



вариант Fc-области, причем указанный вариант придает им уменьшенную ADCC активность и/или уменьшенное связывание с FcγRIIA (CD32A) или обладает ими, как определено, используя способы, известные квалифицированному в данной области техники специалисту и приведенные здесь в качестве примера. Анализы ADCC, используемые в соответствии со способами по настоящему изобретению, могут быть NK-зависимыми или макрофагозависимыми.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящим изобретением охватываются молекулы, включающие вариант Fc-области, причем указанный вариант придает им уменьшенную ADCC активность и/или уменьшенное связывание с FcγRIIIA (CD16A) или обладает ими, как определено, используя способы, известные квалифицированному в данной области техники специалисту и приведенные здесь в качестве примера. Анализы ADCC, используемые в соответствии со способами по настоящему изобретению, могут быть NK-зависимыми или макрофагозависимыми.

Варианты Fc по настоящему изобретению могут быть в комбинации с другими модификациями Fc, такие как те, которые описаны в патентах США № 7632497, 7521542, 7425619, 7416727, 7371826, 7355008, 7335742, 7332581, 7183387, 7122637 и 6737056; в публикациях PCT-заявок с № WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269 и WO 04/063351; и в Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering therapeutic antibodies for improved function," *Biochem. Soc. Trans.* 30(4): 487-490; Shields, R.L. et al. (2002) "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity," *J. Biol. Chem.* 276(30): 26733-26740, и Shields, R.L. et al. (2001) "High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγRI," *J. Biol. Chem.* 276(9): 6591-6604). Настоящим изобретением охватывается комбинация варианта Fc по настоящему изобретению с другими модификациями Fc для придания модифицированному

антителу аддитивных, синергетических или новых свойств.

В других вариантах осуществления настоящим изобретением охватывается использование любого варианта Fc, известного в данной области техники, такого как те, которые описаны в Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For Fcγ<sub>1</sub>R: Current Models," *Immunol. Lett.* 82: 57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function," *Biochem. Soc. Trans.* 30: 487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," *J. Immunol.* 166: 2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc γ<sub>1</sub>R, Fc γ<sub>2</sub>R, Fc γ<sub>3</sub>R, And Fcγ<sub>4</sub>R And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc γ<sub>1</sub>R," *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The Clq Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc," *J. Immunol.* 164: 4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," *J. Immunol.* 164: 1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," *Cell. Immunol.* 200: 16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking Fcγ<sub>1</sub>R Binding And Monocyte Triggering Activities," *Eur. J. Immunol.* 29: 2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(γ<sub>1</sub>)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," *Immunol. Lett.* 54: 101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc γ<sub>1</sub>R And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," *J. Immunol.* 157: 4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A γ<sub>4</sub> Variant Of Campath-1H," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92: 11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc γ<sub>1</sub>R: The Role Of Glycosylation," *Immunol. Lett.*

44: 111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors," *FASEB J.* 9: 115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," *Transplantation* 57: 1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma RII," *Mol. Immunol.* 29: 53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," *J. Immunol.* 147: 2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," *Nature* 332: 563-564; в патентах США №№ 5624821, 5885573, 6194551, 7276586 и 7317091; и публикациях РСТ-заявок с № WO 00/42072 и WO 99/58572.

В некоторых вариантах осуществления антитело настоящего изобретения включает вариант Fc-области (в том числе Fc, происходящую из любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или класса (например, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgA<sub>1</sub> и IgA<sub>2</sub>) или подкласса иммуноглобулинов человека), причем указанный вариант Fc-области включает по крайней мере одну модификацию аминокислоты по сравнению с Fc-областью дикого типа, который (вариант Fc-области) демонстрирует уменьшенное или аннулированное связывание с одним или более лигандов-эффекторов, как определено с помощью стандартных исследований, известных в данной области техники и описанных здесь, относительно сравнимой молекулы, включающей Fc-область дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант Fc-домена антитела по настоящему изобретению включает модификацию аминокислоты (т.е. вставку, замену, делецию) в одном или более из положений остатков 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 270, 297, 298, 299. В конкретном варианте осуществления одной или более модификаций аминокислот, которые уменьшают или аннулируют связывание с одним или более лигандов-эффекторов, является замена фенилаланином или пролином в положении 233; замена аланином в положении 234; замена аланином или глутаминовой кислотой в положении 235; замена аланином в положении 236,

замена аланином в положении 237, замена аргинином в положении 238; замена аланином или глутаминовой кислотой в положении 265; замена аланином или аспарагином в положении 270; замена аланином или глутамином в положении 297; замена фенилаланином, аспарагином или пролином в положении 298; замена любой аминокислотой, отличной от серина или треонина, в положении 299 или комбинация из двух или более вышеперечисленных замен. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий замену аланином в положении 265 и в положении 297; замену аланином в положении 265 и глутамином в положении 297; замену глутаминовой кислотой в положении 265 и аланином в положении 297; или замену глутаминовой кислотой в положении 265 и глутамином в положении 297. В предпочтительных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий модификацию (например, замену, вставку, делецию) в положении 234 и в положении 235 Fc-области. В конкретном примере в соответствии с этим вариантом осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий замену аланином в положении 234 и замену глутаминовой кислотой в положении 235. Тем не менее, в более предпочтительном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc, содержащий замену аланином в положении 234 и замену аланином в положении 235.

В других вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает вариант Fc-области, который демонстрирует уменьшенное или аннулированное связывание с одним или более лигандами-эффекторами, как определено с помощью стандартных исследований, известных в данной области техники и описанных здесь, относительно сравнимой контрольной молекулы. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению имеет Fc-область, демонстрирующую уменьшенное или аннулированное связывание с одним или более лигандами-эффекторами, которая включает фенилаланин или пролин в положении 233; аланин в положении 234; аланин или глутаминовую кислоту в положении 235; аланин в положении 236, аланин в

положении 237, аргинин в положении 238; аланин или глутаминовую кислоту в положении 265; аланин или аспарагин в положении 270; аланин или глутамин в положении 297; фенилаланин, аспарагин или пролин в положении 298; любую аминокислоту, отличную от серина или треонина, в положении 299 или комбинацию из двух или более вышеперечисленных замен. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий аланин в положении 265 и в положении 297; аланин в положении 265 и глутамин в положении 297; глутаминовую кислоту в положении 265 и аланин в положении 297; или глутаминовую кислоту в положении 265 и глутамин в положении 297. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc-домен, содержащий аланин в положении 234 и глутаминовую кислоту в положении 235. В предпочтительных вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению включает Fc, содержащий аланин в положении 234 и аланин в положении 235.

Антитела по настоящему изобретению, которые включают Fc-домен, содержащий аланин в положениях, соответствующих 234 и 235 согласно системе нумерации по Kabat, известны как «ala-ala» антитела. В некоторых вариантах осуществления использование «ala-ala» Fc-доменов и/или других комбинаций из комбинаций аминокислот, описываемых здесь (в том числе комбинаций, включающих «ala-ala» Fc-домены), может аннулировать связывание Fc-домена со всеми FcγR. Связывание Fc-домена с одним или более FcγR можно определить с помощью любого способа, описанного здесь и/или известного в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления одна или более модификаций аминокислот, которые аннулируют связывание со всеми FcγR или уменьшают или аннулируют связывание с одним или более лигандами-эффекторами, включают комбинации модификаций, перечисленные здесь, или комбинации модификаций, перечисленные здесь, с любой из тех, которые могут обеспечить связывание нулевого порядка с любым FcR (например, FcγRIIIA, FcγRIIIB, FcγRIIA), как определено с помощью способов, описанных здесь

или известных квалифицированному в данной области техники специалисту. Как это будет без труда понятно квалифицированному в данной области техники специалисту, такие антитела по настоящему изобретению могут найти конкретное применение при лечении аутоиммунного заболевания, в случае которого антитела против CD3 и антигенсвязывающие фрагменты служат для модулирования функции иммунной системы без связанной реакции на первую дозу, характерной для антител против иммуноцитов.

В некоторых вариантах осуществления антитела против CD3 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, характеризуются уменьшенным (например, но без ограничения, меньше 50%, меньше 40%, меньше 30%, меньше 20%, меньше 10%, меньше 5% или меньше 1% по сравнению со связыванием белком, включающим контрольный Fc-домен) или, более предпочтительно, не обнаруживаемым связыванием с одним или более из любых FcγR (например, FcγRI, FcγRII или FcγRIII) благодаря своему Fc-домену, как определено с помощью обычных в данной области техники анализов. Дополнительно или альтернативно, антитела против CD3 и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, или их антигенсвязывающие фрагменты, могут характеризоваться уменьшенным (например, но без ограничения, меньше 50%, меньше 40%, меньше 30%, меньше 20%, меньше 10%, меньше 5% или меньше 1% по сравнению со связыванием контрольным белком, включающим контрольный Fc-домен) или, более предпочтительно, не обнаруживаемым связыванием с любыми рецепторами комплемента, такими как C1q, как определено в обычно используемых анализах. В отдельных вариантах осуществления антитело является негликозилированным. В других вариантах осуществления в антителе отсутствует Fc-домен (например, оно представляет собой Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub> или одноцепочечное антитело).

Таким образом, антитела по настоящему изобретению являются, в частности, полезными, поскольку они характеризуются уменьшенной *in vivo* токсичностью, причиной которой является продукция лимфокинов или выброс цитокинов, или ее отсутствием.

Способы определения продукции лимфокинов и выброса цитокинов известны и являются обычными в данной области техники и включены в настоящее описание. Например, выброс цитокинов можно определить посредством измерения секреции цитокинов, включающих, но без ограничения, интерлейкин-2 (IL-2), интерлейкин-4 (IL-4), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-12 (IL-12), интерлейкин-16 (IL-16), PDGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , GCSF, GM-CSF, MCSF, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , TNF- $\gamma$ , IGF-I, IGF-II. Например, смотрите Isaacs et al., 2001, Rheumatology, 40: 724-738; Soubrane et al., 1993, Blood, 81(1): 15-19; все из которых включены сюда посредством ссылки в их полном объеме.

#### **D. CD3-специфические диатела DART™**

Как обсуждалось выше, настоящим изобретением, кроме того, охватываются биспецифические, триспецифические и полиспецифические антитела. Особенно предпочтительный пример таких антител включает молекулы диател «DART™», которые включают по крайней мере две полипептидных цепи, которые образуют по крайней мере два эпитопсвязывающих сайта, по крайней мере один из которых специфически связывается с CD3. Приводимые в качестве примера молекулы диател «DART™» представлены в US20100174053, US20090060910, US20070004909, EP2158221, EP1868650, WO2010080538, WO2008157379 и WO2006113665.

В предпочтительных вариантах осуществления первая полипептидная цепь диатела DART™ включает:

(i) домен (A), включающий связывающую область переменного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), специфическую в отношении эпитопа (1);

(ii) домен (B), включающий связывающую область переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), специфическую в отношении эпитопа (2); и

(iii) домен (C);

вторая полипептидная цепь диатела DART™ включает:

(i) домен (D), включающий связывающую область переменного домена легкой цепи второго иммуноглобулина (VL2),

специфическую в отношении эпитопа (2);

(ii) домен (E), включающий связывающую область переменного домена тяжелой цепи первого иммуноглобулина (VH1), специфическую в отношении эпитопа (1); и

(iii) домен (F).

Домены (A) и (B) диатела DART™ не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта. Так же домены (D) и (E) диатела DART™ не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта. Точнее, домены (A) и (E) диатела DART™ ассоциируются с образованием связывающего сайта, который связывает эпитоп (1); указанные домены (B) и (D) диатела DART™ ассоциируются с образованием связывающего сайта, который связывает указанный эпитоп (2). Домены (C) и (F) ковалентно связаны вместе.

Каждая полипептидная цепь молекулы диатела DART™ включает VL-домен и VH-домен, которые ковалентно связаны, так что самосборка доменов затруднена. Взаимодействие двух из полипептидных цепей будет приводить к двум спариваниям VL-VH, образуя два эпитопсвязывающих сайта, т.е. двухвалентную молекулу. Ни VH-домен, ни VL-домен не ограничивается каким-либо положением в полипептидной цепи, т.е. не ограничивается амино (N) концом или карбоксильным (C) концом, также домены не ограничиваются их положениями относительно друг друга, т.е. VL-домен может быть N-концевым по отношению к VH-домену и наоборот. Единственным ограничением является то, чтобы в распоряжении имелась комплементарная полипептидная цепь для образования функциональных диател DART™. Если VL- и VH-домены происходят из одного и того же антитела, две комплементарных полипептидных цепи могут быть идентичными. Например, если связывающие домены происходят из антитела, специфического в отношении эпитопа A (т.е. связывающий домен образован, исходя из взаимодействия VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>), каждый полипептид будет включать VH<sub>A</sub> и VL<sub>A</sub>. Гомодимеризация двух полипептидных цепей антитела будет приводить к образованию двух связывающих сайтов VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>, приводя к двухвалентному моносpezifическому антителу. Если VL- и VH-домены происходят из антител, специфических в отношении



различных антигенов, для образования функционального биспецифического диатела DART™ требуется взаимодействие двух различных полипептидных цепей, т.е. образование гетеродимера. Например, в случае биспецифического диатела DART™, одна полипептидная цепь будет включать VL<sub>A</sub> и VL<sub>B</sub>; гомодимеризация указанной цепи будет приводить к образованию двух связывающих сайтов VL<sub>A</sub>-VH<sub>B</sub>, или не связывающих, или непредсказуемо связывающих. В отличие от этого, если две отличающихся полипептидных цепи могут взаимодействовать, например, в рекомбинантной экспрессионной системе, одна, включающая VL<sub>A</sub> и VH<sub>B</sub>, а другая, включающая VL<sub>B</sub> и VH<sub>A</sub>, будут образовываться два отличающихся связывающих сайта: VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub> и VL<sub>B</sub>-VH<sub>B</sub>. В случае всех пар полипептидных цепей диател DART™ существует вероятность неправильного совмещения или неправильного связывания двух цепей, т.е. взаимодействие доменов VL-VL или VH-VH; однако легко осуществить очистку функциональных антител на основе иммуноспецифичности правильно димеризованных связывающих сайтов, используя любой аффинный способ, известный в данной области техники или приведенный здесь в качестве примера, например, аффинную хроматографию.

Одна или более из полипептидных цепей диатела DART™ может необязательно включать Fc-домен или его часть (например, CH2-домен или CH3-домен). Fc-домен или его часть может происходить из любого изотипа или аллотипа иммуноглобулинов, в том числе, но без ограничения, IgA, IgD, IgG, IgE и IgM. В предпочтительных вариантах осуществления Fc-домен (или его часть) происходит из IgG. В конкретных вариантах осуществления изотипом IgG является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или его аллотип. В одном варианте осуществления молекула диатела включает Fc-домен, включающий CH2-домен и CH3-домен, которые независимо выбирают из любого изотипа иммуноглобулинов (т.е. Fc-домен, включающий CH2-домен, происходящий из IgG, и CH3-домен, происходящий из IgE, или CH2-домен, происходящий из IgG1, и CH3-домен, происходящий из IgG2, и т.д.). Fc-домен можно спроектировать в полипептидной цепи, включающей молекулу диатела по настоящему изобретению, в любом положении

относительно других доменов или частей указанной полипептидной цепи (например, Fc-домен, или его часть, может быть C-концевым по отношению к обоим VL- и VH-доменам полипептидной цепи; может быть N-концевым по отношению к обоим VL- и VH-доменам; или может быть N-концевым по отношению к одному домену и C-концевым по отношению к другому (т.е. находиться между двумя доменами полипептидной цепи)).

Fc-домены в полипептидных цепях молекул диател DART™ предпочтительно подвергаются димеризации, приводящей к образованию молекулы DART™, которая демонстрирует свойства, подобные таковым иммуноглобулинов, например, взаимодействия Fc-Fcγ. Fc-включающие диатела могут быть димерами, например, состоящими из двух полипептидных цепей, каждая из которых включает VH-домен, VL-домен и Fc-домен. Димеризация указанных полипептидных цепей приводит к образованию двухвалентного диатела DART™, включающего Fc-домен, хоть и со структурой, отличной от таковой не модифицированного двухвалентного антитела. Такие молекулы диател DART™ будут проявлять измененные фенотипы по сравнению с иммуноглобулином дикого типа, например, измененный полупериод существования в сыворотке, способности к связыванию и т.д. В других вариантах осуществления молекулы диател DART™, включающие Fc-домены, могут быть тетрамерами. Такие тетрамеры включают две «более тяжелые» полипептидные цепи, т.е. полипептидную цепь, включающую VL, VH и Fc-домен, и две «более легкие» полипептидные цепи, т.е. полипептидную цепь, включающую VL и VH. Более легкие и более тяжелые цепи взаимодействуют с образованием мономера, и указанные мономеры взаимодействуют благодаря их неспаренным Fc-доменам с образованием Ig-подобной молекулы. Такое Ig-подобное диатело DART™ является четырехвалентным и может быть моноспецифическим, биспецифическим или тетраспецифическим.

#### **VI. Терапевтические способы применения антител против CD3 по настоящему изобретению**

Антитела против CD3 по настоящему изобретению и их

антигенсвязывающие фрагменты, в частности, применимы для лечения злокачественных новообразований, связанных с экспрессией CD3, и для лечения аутоиммунного заболевания и других воспалительных нарушений.

Эти применения могут приводить к образованию комплекса между CD3 и антителом, которое специфически связывается с CD3. Примеры таких антител включают, но без ограничения, моноклональные антитела против CD3 mAb1 и mAb2 или, более предпочтительно, их гуманизированные производные. Образование такого комплекса может происходить *in vitro* или *in vivo*. Без ограничения этой теорией, антитело против CD3 может связываться с CD3 благодаря экстраклеточному домену CD3 и может затем подвергаться интернализации в живую нормальную или раковую клетку.

#### **А. Лечение рака**

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с CD3, присутствующим на поверхности Т-клеток. Антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут использоваться в случае биспецифической (или триспецифической, или полиспецифической) молекулы, такой как молекула DART или ViTE, для перенаправления Т-клеток на опухолевую клетку. Т-клетка может затем уничтожать опухолевую клетку. Биспецифические (или триспецифические, или полиспецифические) молекулы по настоящему изобретению способны к связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком (например, яванского макака), а также со вторым (или дополнительным) и отличным антигеном(ами) и эпитопом(ами). Вторым антигеном или эпитопом предпочтительно является опухолеспецифический антиген, представленный на опухолевой клетке. Такие опухолевые клетки могут быть из злокачественных новообразований, например, рака молочной железы, рака предстательной железы, рака желудка, рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого

пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы и лейкоза. Такими дополнительными антигенами или эпитопами предпочтительно являются опухолеспецифические антигены или эпитопы на клеточной поверхности (такие как: 17-1A, A33, основной антиген I эндодермального происхождения на эритроцитах взрослого человека, альфа-фетопроtein, антиген оболочки РНК-вируса опухоли, онкоэмбриональный антиген, специфический для опухоли мочевого пузыря, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, специфический для лимфомы Беркитта антиген-38.13, CA125, CD18, CD19, специфический для В-клеточной лимфомы человека антиген-CD20, CD22, CD33, CD44, CD52, CEA, CO17-1A, СТА-1, СТЛА-4, рецептор эпидермального фактора роста, Ер-САМ, ЕрhA2, антиген I на эритроцитах новорожденного, антиген фибросаркомы, ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2, ганглиозид GM3, GICA 19-9, гр IIIb/IIIa, гр72, HER1, HER-2/neu, HER3, HER4, специфический для меланомы антиген с большой молекулярной массой, антиген HLA-DR, специфический для лейкоза человека Т-клеточный антиген-Gr37, специфический для карциномы легкого человека антиген L20, специфический для карциномы легкого человека антиген L6, антиген в виде глобулярной частицы молочного жира человека, IgE, специфический для карциномы KS 1/4 рап антиген, LEA, специфический для аденокарциномы антиген F3, специфический для злокачественных лимфоцитов человека антиген-AP0-1, специфический для меланомы антиген гр75, связанный с меланомой антиген p97, неогликопротеин, nuC242, специфический для полиморфного эпителия антиген муцинового типа, специфический для предстательной железы антиген, специфический для предстательной железы мембранный антиген, специфический для предстательной железы кислый фосфат, антиген SK-1, TAG-72, T-антиген, опухолеспецифический антиген CA125, опухолеспецифический антиген MUC1, опухолеспецифический трансплантационный антиген клеточной поверхности, фактор роста сосудистого эндотелия, рецептор фактора роста сосудистого эндотелия и  $\alpha\nu\beta3$ ). Альтернативно, такие дополнительные антигены

или эпитопы могут быть связаны с патогеном (таким как: вирус гепатита типа А, вирус гепатита типа В, вирус гепатита типа С, вирус гриппа, вирус ветряной оспы, аденовирус, вирус простого герпеса типа I (HSV-I), вирус простого герпеса типа II (HSV-II), возбудитель чумы рогатого скота, риновирус, ЕСНО-вирус, ротавирус, респираторно-синцитиальный вирус, папилломавирус, паповавирус, цитомегаловирус, эхиновирус, арбовирус, хантавирус, коксаки-вирус, вирус эпидемического паротита, вирус кори, вирус краснухи, полиовирус, возбудитель натуральной оспы, вирус Эпштейна-Барра, вирус иммунодефицита человека типа I (HIV-I), вирус иммунодефицита человека типа II (HIV-II), возбудитель вирусного менингита, возбудитель вирусного энцефалита, возбудитель денге, возбудитель натуральной оспы; микобактерии, рикеттсии, микоплазма, нейссерии, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, возбудитель столбняка, возбудитель коклюша, возбудитель холеры, возбудитель чумы, возбудитель дифтерии, хламидии и легионеллы; лейшмания, возбудитель кокцидиоза, трипаносома или возбудитель малярии; хламидии и рикеттсии).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связываются с CD3, присутствующим на поверхности Т-клеток. Используя обычные способы, такие антитела можно пометить флуоресцеином, как описано выше. При инкубации таких меченых молекул в присутствии биспецифической молекулы (такой как, например, диатело UDART<sup>TM</sup>, содержащее эпитопсвязывающий домен, который связывается с Т-клеточным рецептором, и эпитопсвязывающий домен, который связывается с флуоресцеином («TCR-UDART<sup>TM</sup>»)), они могут связываться с меткой - флуоресцеином - и таким образом сами локализоваться на поверхности клеток, которые экспрессируют CD3, и приводить к перенаправленному уничтожению таких клеток.

В альтернативном варианте осуществления CD19 может использоваться в качестве «второго» эпитопа, так что биспецифическое антитело, или более предпочтительно, диатело DART<sup>TM</sup>, распознающее CD3 и CD19, используется для уничтожения В-

клеточной лимфомы благодаря вхождению в контакт и со специфическим для В-клеток антигеном (CD19), и с комплексом Т-клеточный рецептор/CD3 на Т-клетках-эффекторах. Как обсуждалось в Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 2011 blood-2010-09-306449, CD3/CD19-специфическое диатело DART™ использовалось для уничтожения В-клеточной лимфомы благодаря вхождению в контакт и со специфическим для В-клеток антигеном (CD19), и с комплексом Т-клеточный рецептор/CD3 на Т-клетках-эффекторах. В результате сравнения бок о бок с одноцепочечным биспецифическим антителом, содержащим последовательности Fv антитела против CD19 и CD3, выявлено, что DART является более эффективным в наведении на лизис В-клеток. Увеличенная активность при использовании CD19xCD3-биспецифического DART отмечалась в отношении всех CD19-экспрессирующих В-клеток-мишеней при оценке, используя покоящиеся и предварительно подвергнутые стимуляции PBMC человека или очищенные популяции Т-клеток-эффекторов. В результате определения характеристик CD19xTCR-биспецифического DART выявлена эффективность, эквивалентная таковой CD19xCD3 DART, что указывает на гибкость структуры DART в поддержании ассоциаций Т-клетка/В-клетка в случае применений для перенаправленного, опосредуемого Т-клетками уничтожения. Важно отметить, что увеличенный уровень уничтожения, опосредуемого молекулами DART, не сопровождался каким-либо увеличением активации неспецифических Т-клеток или лизиса негативных по CD19 клеток. Исследования клеточных ассоциаций указывают на то, что структура DART хорошо подходит для сохранения межклеточных контактов, несомненно, вносящих вклад в высокий уровень уничтожения клеток-мишеней. Наконец, способность CD19xTCR-биспецифического DART к ингибированию В-клеточной лимфомы у мышей NOD/SCID при совместном введении с PBMC человека, кроме того, демонстрирует ценность молекул DART для лечения В-клеточных злокачественностей. Обладающие перекрестной реактивностью антитела против CD3 по настоящему изобретению могли бы использоваться таким же образом, как антитела против

CD3 Moore, P.A. и др. Таким образом, настоящим изобретением обеспечивается терапия для раков (особенно лимфом и лейкозов), включающих CD3-экспрессирующие раковые клетки.

Биспецифические (или триспецифические, или полиспецифические) молекулы по настоящему изобретению предпочтительно вводят пациенту в одной или более стандартных доз, типично составляющих от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг веса тела пациента. Предпочтительно, когда вводимая пациенту доза находится между 0,0001 мг/кг и 20 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 10 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 5 мг/кг, 0,0001 и 2 мг/кг, 0,0001 и 1 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,75 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,5 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,25 мг/кг, 0,0001 и 0,15 мг/кг, 0,0001 и 0,10 мг/кг, 0,001 и 0,5 мг/кг, 0,01 и 0,25 мг/кг или 0,01 и 0,10 мг/кг веса тела пациента.

#### **В. Лечение аутоиммунного заболевания и воспаления**

Настоящим изобретением также обеспечиваются способы лечения, предотвращения, замедления прогрессирования и/или уменьшение интенсивности симптомов опосредованных Т-клетками заболеваний или нарушений, включающих отторжение трансплантата, гомологичную болезнь, нежелательные реакции гиперчувствительности замедленного типа (такие как аллергические реакции замедленного типа), опосредованные Т-клетками заболевания легких и аутоиммунные заболевания. Опосредованные Т-клетками заболевания легких включают саркоидоз, аллергический альвеолит, острый интерстициальный пневмонит, альвеолит, фиброз легких, идиопатический фиброз легких и другие заболевания, характеризующиеся воспалительным поражением легких. Опосредованные Т-клетками аутоиммунные заболевания включают рассеянный склероз, неврит, полимиозит, псориаз, витилиго, синдром Гужеро-Шегрена, ревматоидный артрит, диабет типа I, аутоиммунный панкреатит, воспалительные заболевания кишечника (например, болезнь Крона и неспецифический язвенный колит), глютеновую болезнь, гломерулонефрит, склеродермию, саркоидоз, аутоиммунные заболевания щитовидной железы (например, зоб Хасимото и болезнь Грейвса), злокачественную миастению, болезнь Аддисона,

аутоиммунный увеоретинит, обыкновенную пузырчатку, первичный билиарный цирроз, злокачественную анемию и системную красную волчанку (в частности, кожную форму), эффекты вследствие трансплантации органа, гомологичную болезнь (GVHD) и т.д. В частности, способы по настоящему изобретению полезны для субъектов с заболеванием на ранней стадии для замедления или уменьшения нарушения вследствие аутоиммунитета и сохранения высокого уровня функционирования и/или уменьшения необходимости в другой терапии (например, при лечении или профилактике сахарного диабета типа I способы настоящего изобретения могут уменьшить необходимость во введении экзогенного инсулина у субъекта). Кроме того, способы по настоящему изобретению могут преимущественно уменьшить частоту или привести к отсутствию частоты случаев синдрома выброса цитокинов, ранее связанного с введением терапевтических антител и, в частности, анти-T-клеточного антитела (например, против CD3) или антигенсвязывающих фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления курс лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами в соответствии со способами по настоящему изобретению повторяют с интервалами в 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев или 36 месяцев. В конкретных вариантах осуществления эффективность лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами по настоящему изобретению определяют, как описано здесь или как известно в данной области техники, через 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев, 24 месяца, 30 месяцев или 36 месяцев после предшествующего лечения.

В другом варианте осуществления субъекту вводят одну или более стандартных доз, составляющих приблизительно 0,5-50 мкг/кг, приблизительно 0,5-40 мкг/кг, приблизительно 0,5-30 мкг/кг, приблизительно 0,5-20 мкг/кг, приблизительно 0,5-15 мкг/кг, приблизительно 0,5-10 мкг/кг, приблизительно 0,5-5 мкг/кг, приблизительно 1-5 мкг/кг, приблизительно 1-10 мкг/кг, приблизительно 20-40 мкг/кг, приблизительно 20-30 мкг/кг,



приблизительно 22-28 мкг/кг или приблизительно 25-26 мкг/кг одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности. В другом варианте осуществления субъекту вводят одну или более стандартных доз, составляющих 200 мкг/кг, 178 мкг/кг, 180 мкг/кг, 128 мкг/кг, 100 мкг/кг, 95 мкг/кг, 90 мкг/кг, 85 мкг/кг, 80 мкг/кг, 75 мкг/кг, 70 мкг/кг, 65 мкг/кг, 60 мкг/кг, 55 мкг/кг, 50 мкг/кг, 45 мкг/кг, 40 мкг/кг, 35 мкг/кг, 30 мкг/кг, 26 мкг/кг, 25 мкг/кг, 20 мкг/кг, 15 мкг/кг, 13 мкг/кг, 10 мкг/кг, 6,5 мкг/кг, 5 мкг/кг, 3,2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 2,5 мкг/кг, 2 мкг/кг, 1,6 мкг/кг, 1,5 мкг/кг, 1 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 0,25 мкг/кг, 0,1 мкг/кг или 0,05 мкг/кг одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В одном варианте осуществления субъекту вводят одну или более доз, составляющих 200 мкг/кг или меньше, 175 мкг/кг или меньше, 150 мкг/кг или меньше, 128 мкг/кг или меньше, 100 мкг/кг или меньше, 95 мкг/кг или меньше, 90 мкг/кг или меньше, 85 мкг/кг или меньше, 80 мкг/кг или меньше, 75 мкг/кг или меньше, 70 мкг/кг или меньше, 65 мкг/кг или меньше, 60 мкг/кг или меньше, 55 мкг/кг или меньше, 50 мкг/кг или меньше, 45 мкг/кг или меньше, 40 мкг/кг или меньше, 35 мкг/кг или меньше, 30 мкг/кг или меньше, 25 мкг/кг или меньше, 20 мкг/кг или меньше, 15 мкг/кг или меньше, 10 мкг/кг или меньше, 5 мкг/кг или меньше, 2,5 мкг/кг или меньше, 2 мкг/кг или меньше, 1,5 мкг/кг или меньше, 1 мкг/кг или меньше, 0,5 мкг/кг или меньше, 0,25 мкг/кг или меньше, 0,1 мкг/кг или меньше или 0,05 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В отдельных вариантах осуществления субъекту вводят одну или более доз, составляющих приблизительно 5-1200 мкг/м<sup>2</sup>,

предпочтительно 51-826 мкг/м<sup>2</sup>. В другом варианте осуществления субъекту вводят одну или более стандартных доз, составляющих 1200 мкг/м<sup>2</sup>, 1150 мкг/м<sup>2</sup>, 1100 мкг/м<sup>2</sup>, 1050 мкг/м<sup>2</sup>, 1000 мкг/м<sup>2</sup>, 950 мкг/м<sup>2</sup>, 900 мкг/м<sup>2</sup>, 850 мкг/м<sup>2</sup>, 800 мкг/м<sup>2</sup>, 750 мкг/м<sup>2</sup>, 700 мкг/м<sup>2</sup>, 650 мкг/м<sup>2</sup>, 600 мкг/м<sup>2</sup>, 550 мкг/м<sup>2</sup>, 500 мкг/м<sup>2</sup>, 450 мкг/м<sup>2</sup>, 400 мкг/м<sup>2</sup>, 350 мкг/м<sup>2</sup>, 300 мкг/м<sup>2</sup>, 250 мкг/м<sup>2</sup>, 200 мкг/м<sup>2</sup>, 150 мкг/м<sup>2</sup>, 100 мкг/м<sup>2</sup>, 50 мкг/м<sup>2</sup>, 40 мкг/м<sup>2</sup>, 30 мкг/м<sup>2</sup>, 20 мкг/м<sup>2</sup>, 15 мкг/м<sup>2</sup>, 10 мкг/м<sup>2</sup> или 5 мкг/м<sup>2</sup> одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения, замедления прогрессирования, отсрочки возникновения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В другом варианте осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем курс лечения осуществляют в течение 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В одном варианте осуществления схема лечения включает введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов каждый день, через день, каждый третий день или каждый четвертый день. В некоторых вариантах осуществления схема лечения включает введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов в понедельник, вторник, среду, четверг конкретной недели и не введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов в пятницу, субботу или воскресенье той же недели, пока не будет введено 14 доз, 13 доз, 12 доз, 11 доз, 10 доз, 9 доз или 8 доз. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза является одинаковой каждый день схемы. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну

или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем профилактически или терапевтически эффективное количество составляет 200 мкг/кг/день, 175 мкг/кг/день, 150 мкг/кг/день, 125 мкг/кг/день, 100 мкг/кг/день, 95 мкг/кг/день, 90 мкг/кг/день, 85 мкг/кг/день, 80 мкг/кг/день, 75 мкг/кг/день, 70 мкг/кг/день, 65 мкг/кг/день, 60 мкг/кг/день, 55 мкг/кг/день, 50 мкг/кг/день, 45 мкг/кг/день, 40 мкг/кг/день, 35 мкг/кг/день, 30 мкг/кг/день, 26 мкг/кг/день, 25 мкг/кг/день, 20 мкг/кг/день, 15 мкг/кг/день, 13 мкг/кг/день, 10 мкг/кг/день, 6,5 мкг/кг/день, 5 мкг/кг/день, 3,2 мкг/кг/день, 3 мкг/кг/день, 2,5 мкг/кг/день, 2 мкг/кг/день, 1,6 мкг/кг/день, 1,5 мкг/кг/день, 1 мкг/кг/день, 0,5 мкг/кг/день, 0,25 мкг/кг/день, 0,1 мкг/кг/день или 0,05 мкг/кг/день; и/или причем профилактически или терапевтически эффективное количество составляет 1200 мкг/м<sup>2</sup>/день, 1150 мкг/м<sup>2</sup>/день, 1100 мкг/м<sup>2</sup>/день, 1050 мкг/м<sup>2</sup>/день, 1000 мкг/м<sup>2</sup>/день, 950 мкг/м<sup>2</sup>/день, 900 мкг/м<sup>2</sup>/день, 850 мкг/м<sup>2</sup>/день, 800 мкг/м<sup>2</sup>/день, 750 мкг/м<sup>2</sup>/день, 700 мкг/м<sup>2</sup>/день, 650 мкг/м<sup>2</sup>/день, 600 мкг/м<sup>2</sup>/день, 550 мкг/м<sup>2</sup>/день, 500 мкг/м<sup>2</sup>/день, 450 мкг/м<sup>2</sup>/день, 400 мкг/м<sup>2</sup>/день, 350 мкг/м<sup>2</sup>/день, 300 мкг/м<sup>2</sup>/день, 250 мкг/м<sup>2</sup>/день, 200 мкг/м<sup>2</sup>/день, 150 мкг/м<sup>2</sup>/день, 100 мкг/м<sup>2</sup>/день, 50 мкг/м<sup>2</sup>/день, 40 мкг/м<sup>2</sup>/день, 30 мкг/м<sup>2</sup>/день, 20 мкг/м<sup>2</sup>/день, 15 мкг/м<sup>2</sup>/день, 10 мкг/м<sup>2</sup>/день или 5 мкг/м<sup>2</sup>/день. В другом варианте осуществления внутривенную дозу, составляющую 1200 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 1150 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 1100 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 1050 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 1000 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 950 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 900 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 850 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 800 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 750 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 700 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 650 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 600 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 550 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 500 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 450 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 400 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 350 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 300 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 250 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 200 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 150 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 100 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 50 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 40 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 30 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 20 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 15 мкг/м<sup>2</sup> или меньше, 10 мкг/м<sup>2</sup> или меньше или 5 мкг/м<sup>2</sup> или

меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, вводят в течение приблизительно 24 часов, приблизительно 22 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 2 часов, приблизительно 1,5 часов, приблизительно 1 часа, приблизительно 50 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 5 минут, приблизительно 2 минут, приблизительно 1 минуты, приблизительно 30 секунд или приблизительно 10 секунд для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности. Суммарная доза за время реализации схемы предпочтительно составляет всего менее 9000 мкг/м<sup>2</sup>, 8000 мкг/м<sup>2</sup>, 7000 мкг/м<sup>2</sup>, 6000 мкг/м<sup>2</sup> и может составлять менее 5000 мкг/м<sup>2</sup>, 4000 мкг/м<sup>2</sup>, 3000 мкг/м<sup>2</sup>, 2000 мкг/м<sup>2</sup> или 1000 мкг/м<sup>2</sup>. В конкретных вариантах осуществления суммарная доза, назначаемая в схеме, составляет 100 мкг/м<sup>2</sup>-200 мкг/м<sup>2</sup>, 100 мкг/м<sup>2</sup>-500 мкг/м<sup>2</sup>, 100 мкг/м<sup>2</sup>-1000 мкг/м<sup>2</sup> или 500 мкг/м<sup>2</sup>-1000 мкг/м<sup>2</sup>.

В предпочтительных вариантах осуществления дозу увеличивают на протяжении первых четырех, первой половины и первых 2/3 доз (например, в течение первых 2, 3, 4, 5 или 6 дней схемы введения в течение 10, 12, 14, 16, 18 или 20 дней одной дозы в день) схемы лечения до достижения суточного профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем профилактически или терапевтически эффективное количество увеличивают, например, на 0,01 мкг/кг, 0,02 мкг/кг, 0,04 мкг/кг, 0,05 мкг/кг, 0,06 мкг/кг, 0,08 мкг/кг, 0,1 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,25 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 0,75

мкг/кг, 1 мкг/кг, 1,5 мкг/кг, 2 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 15 мкг/кг, 20 мкг/кг, 25 мкг/кг, 30 мкг/кг, 35 мкг/кг, 40 мкг/кг, 45 мкг/кг, 50 мкг/кг, 55 мкг/кг, 60 мкг/кг, 65 мкг/кг, 70 мкг/кг, 75 мкг/кг, 80 мкг/кг, 85 мкг/кг, 90 мкг/кг, 95 мкг/кг, 100 мкг/кг или 125 мкг/кг каждый день; или увеличивают, например, на 1 мкг/м<sup>2</sup>, 5 мкг/м<sup>2</sup>, 10 мкг/м<sup>2</sup>, 15 мкг/м<sup>2</sup>, 20 мкг/м<sup>2</sup>, 30 мкг/м<sup>2</sup>, 40 мкг/м<sup>2</sup>, 50 мкг/м<sup>2</sup>, 60 мкг/м<sup>2</sup>, 70 мкг/м<sup>2</sup>, 80 мкг/м<sup>2</sup>, 90 мкг/м<sup>2</sup>, 100 мкг/м<sup>2</sup>, 150 мкг/м<sup>2</sup>, 200 мкг/м<sup>2</sup>, 250 мкг/м<sup>2</sup>, 300 мкг/м<sup>2</sup>, 350 мкг/м<sup>2</sup>, 400 мкг/м<sup>2</sup>, 450 мкг/м<sup>2</sup>, 500 мкг/м<sup>2</sup>, 550 мкг/м<sup>2</sup>, 600 мкг/м<sup>2</sup> или 650 мкг/м<sup>2</sup>, каждый день в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления субъекту назначают схему лечения, включающую одну или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, причем профилактически или терапевтически эффективное количество увеличивают в 1,25 раз, в 1,5 раза, в 2 раза, в 2,25 раз, в 2,5 раза или в 5 раз до достижения суточного профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов.

В конкретном варианте осуществления субъекту внутримышечно вводят одну или более доз, составляющих 200 мкг/кг или меньше, предпочтительно 175 мкг/кг или меньше, 150 мкг/кг или меньше, 125 мкг/кг или меньше, 100 мкг/кг или меньше, 95 мкг/кг или меньше, 90 мкг/кг или меньше, 85 мкг/кг или меньше, 80 мкг/кг или меньше, 75 мкг/кг или меньше, 70 мкг/кг или меньше, 65 мкг/кг или меньше, 60 мкг/кг или меньше, 55 мкг/кг или меньше, 50 мкг/кг или меньше, 45 мкг/кг или меньше, 40 мкг/кг или меньше, 35 мкг/кг или меньше, 30 мкг/кг или меньше, 25 мкг/кг или меньше, 20 мкг/кг или меньше, 15 мкг/кг или меньше, 10 мкг/кг или меньше, 5 мкг/кг или меньше, 2,5 мкг/кг или меньше, 2 мкг/кг или меньше, 1,5 мкг/кг или меньше, 1 мкг/кг или меньше, 0,5 мкг/кг или меньше или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного

нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В другом варианте осуществления субъекту подкожно вводят одну или более доз, составляющих 200 мкг/кг или меньше, предпочтительно 175 мкг/кг или меньше, 150 мкг/кг или меньше, 125 мкг/кг или меньше, 100 мкг/кг или меньше, 95 мкг/кг или меньше, 90 мкг/кг или меньше, 85 мкг/кг или меньше, 80 мкг/кг или меньше, 75 мкг/кг или меньше, 70 мкг/кг или меньше, 65 мкг/кг или меньше, 60 мкг/кг или меньше, 55 мкг/кг или меньше, 50 мкг/кг или меньше, 45 мкг/кг или меньше, 40 мкг/кг или меньше, 35 мкг/кг или меньше, 30 мкг/кг или меньше, 25 мкг/кг или меньше, 20 мкг/кг или меньше, 15 мкг/кг или меньше, 10 мкг/кг или меньше, 5 мкг/кг или меньше, 2,5 мкг/кг или меньше, 2 мкг/кг или меньше, 1,5 мкг/кг или меньше, 1 мкг/кг или меньше, 0,5 мкг/кг или меньше или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения.

В другом варианте осуществления субъекту внутривенно вводят одну или более доз, составляющих 100 мкг/кг или меньше, предпочтительно 95 мкг/кг или меньше, 90 мкг/кг или меньше, 85 мкг/кг или меньше, 80 мкг/кг или меньше, 75 мкг/кг или меньше, 70 мкг/кг или меньше, 65 мкг/кг или меньше, 60 мкг/кг или меньше, 55 мкг/кг или меньше, 50 мкг/кг или меньше, 45 мкг/кг или меньше, 40 мкг/кг или меньше, 35 мкг/кг или меньше, 30 мкг/кг или меньше, 25 мкг/кг или меньше, 20 мкг/кг или меньше, 15 мкг/кг или меньше, 10 мкг/кг или меньше, 5 мкг/кг или меньше, 2,5 мкг/кг или меньше, 2 мкг/кг или меньше, 1,5 мкг/кг или меньше, 1 мкг/кг или меньше, 0,5 мкг/кг или меньше или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности. В другом варианте осуществления внутривенную дозу, составляющую 100 мкг/кг или меньше, 95 мкг/кг или меньше, 90 мкг/кг или меньше, 85 мкг/кг или меньше, 80 мкг/кг или меньше, 75 мкг/кг

или меньше, 70 мкг/кг или меньше, 65 мкг/кг или меньше, 60 мкг/кг или меньше, 55 мкг/кг или меньше, 50 мкг/кг или меньше, 45 мкг/кг или меньше, 40 мкг/кг или меньше, 35 мкг/кг или меньше, 30 мкг/кг или меньше, 25 мкг/кг или меньше, 20 мкг/кг или меньше, 15 мкг/кг или меньше, 10 мкг/кг или меньше, 5 мкг/кг или меньше, 2,5 мкг/кг или меньше, 2 мкг/кг или меньше, 1,5 мкг/кг или меньше, 1 мкг/кг или меньше, 0,5 мкг/кг или меньше или 0,5 мкг/кг или меньше одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, вводят в течение приблизительно 6 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 2 часов, приблизительно 1,5 часов, приблизительно 1 часа, приблизительно 50 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 5 минут, приблизительно 2 минут, приблизительно 1 минуты, приблизительно 30 секунд или приблизительно 10 секунд для предупреждения, лечения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов аутоиммунного нарушения или Т-клеточной злокачественности.

В конкретных вариантах осуществления, в которых увеличивающиеся дозы вводят в течение первых дней схемы введения доз, доза в день 1 этой схемы составляет 5-100 мкг/м<sup>2</sup>/день и увеличивается до изложенной непосредственно выше суточной дозы к дню 3, 4, 5, 6 или 7. Например, в день 1 субъекту вводят дозу, составляющую приблизительно 51 мкг/м<sup>2</sup>/день, в день 2 - приблизительно 103 мкг/м<sup>2</sup>/день, в день 3 - приблизительно 207 мкг/м<sup>2</sup>/день, в день 4 - приблизительно 413 мкг/м<sup>2</sup>/день и в последующие дни этой схемы (например, дни 5-14) 826 мкг/м<sup>2</sup>/день.

В других вариантах осуществления первоначальная доза составляет 1/4, до 1/2, до равной суточной дозе в конце схемы, но вводится частями с интервалами в 6, 8, 10 или 12 часов. Например, составляющую 13 мкг/м<sup>2</sup>/день дозу вводят в четырех дозах, равных 3-4 мкг/кг, с интервалами в 6 часов для уменьшения уровня выброса цитокинов, причиной которого является введение антитела.

В конкретных вариантах осуществления, для уменьшения

вероятности выброса цитокинов и других неблагоприятных эффектов, первые 1, 2, 3 или 4 дозы или все дозы в схеме вводят более медленно с помощью внутривенного введения. Например, доза, составляющая  $51 \text{ мкг/м}^2/\text{день}$ , может вводиться в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов и приблизительно 22 часов. В некоторых вариантах осуществления дозу вводят с помощью медленной инфузии в течение периода времени, составляющего, например, 20-24 часов. В конкретных вариантах осуществления дозу нагнетают в насос, предпочтительно увеличивая концентрацию антитела, вводимого в ходе инфузии.

В других вариантах осуществления может вводиться заданная часть схемы в увеличивающихся дозах. Например, в случае схемы введения  $51 \text{ мкг/м}^2/\text{день}$ - $826 \text{ мкг/м}^2/\text{день}$ , описанной выше, часть может составлять  $1/10$ ,  $1/4$ ,  $1/3$ ,  $1/2$ ,  $2/3$  или  $3/4$  от суточных доз. Соответственно, когда часть будет равняться  $1/10$ , суточные дозы будут составлять  $5,1 \text{ мкг/м}^2$  в день 1,  $10,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 2,  $20,7 \text{ мкг/м}^2$  в день 3,  $41,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 4 и  $82,6 \text{ мкг/м}^2$  в дни 5-14. Когда часть будет равняться  $1/4$ , дозы будут составлять  $12,75 \text{ мкг/м}^2$  в день 1,  $25,5 \text{ мкг/м}^2$  в день 2,  $51 \text{ мкг/м}^2$  в день 3,  $103 \text{ мкг/м}^2$  в день 4 и  $207 \text{ мкг/м}^2$  в дни 5-14. Когда часть будет равняться  $1/3$ , дозы будут составлять  $17 \text{ мкг/м}^2$  в день 1,  $34,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 2,  $69 \text{ мкг/м}^2$  в день 3,  $137,6 \text{ мкг/м}^2$  в день 4 и  $275,3 \text{ мкг/м}^2$  в дни 5-14. Когда часть будет равняться  $1/2$ , дозы будут составлять  $25,5 \text{ мкг/м}^2$  в день 1,  $51 \text{ мкг/м}^2$  в день 2,  $103 \text{ мкг/м}^2$  в день 3,  $207 \text{ мкг/м}^2$  в день 4 и  $413 \text{ мкг/м}^2$  в дни 5-14. Когда часть будет равняться  $2/3$ , дозы будут составлять  $34 \text{ мкг/м}^2$  в день 1,  $69 \text{ мкг/м}^2$  в день 2,  $137,6 \text{ мкг/м}^2$  в день 3,  $275,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 4 и  $550,1 \text{ мкг/м}^2$  в дни 5-14. Когда часть будет равняться  $3/4$ , дозы будут составлять  $38,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 1,  $77,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 2,  $155,3 \text{ мкг/м}^2$  в день 3,  $309,8 \text{ мкг/м}^2$  в



день 4 и 620 мкг/м<sup>2</sup> в дни 5-14.

В конкретных вариантах осуществления антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты не вводят с использованием ежедневных доз на протяжении ряда дней, а точнее вводят с помощью инфузии непрерывно в течение 4 часов, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 15 часов, 18 часов, 20 часов, 24 часов, 30 часов или 36 часов. Инфузия может быть неизменной или может начинаться с более низкой дозы, вводимой в течение, например, первых 1, 2, 3, 5, 6 и 8 часов инфузии, и впоследствии увеличиваться до более высокой дозы. В ходе инфузии пациент получает дозу, равную количеству, вводимому в приводимых в качестве примера схемах, изложенных выше, например, дозу, составляющую приблизительно 150 мкг/м<sup>2</sup>, 200 мкг/м<sup>2</sup>, 250 мкг/м<sup>2</sup>, 500 мкг/м<sup>2</sup>, 750 мкг/м<sup>2</sup>, 1000 мкг/м<sup>2</sup>, 1500 мкг/м<sup>2</sup>, 2000 мкг/м<sup>2</sup>, 3000 мкг/м<sup>2</sup>, 4000 мкг/м<sup>2</sup>, 5000 мкг/м<sup>2</sup>, 6000 мкг/м<sup>2</sup>, 7000 мкг/м<sup>2</sup>, 8000 мкг/м<sup>2</sup> или 9000 мкг/м<sup>2</sup>. В частности, скорость и продолжительность инфузии планируют в расчете на минимизацию уровня свободного антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов у субъекта после введения. В некоторых вариантах осуществления уровень свободного антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов не должен превышать 200 нг/мл свободного антитела. Кроме того, инфузию планируют в расчете на достижение комбинированного покрытия и модуляции Т-клеточных рецепторов, составляющего по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты вводят для достижения определенного уровня комбинированного покрытия и модуляции Т-клеточных рецепторных комплексов на Т-клетках, определяемого с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, смотрите, например, пример 11 в публикации заявки на патент США № US 2003/0108548, которая тем самым включена в настоящее описание в качестве ссылки в ее полном объеме. В отдельных вариантах осуществления с помощью схемы введения доз достигается комбинированное покрытие и модуляция Т-клеточных рецепторов, составляющее по крайней мере 50%, 60%, 70%, 80%,

90%, 95% или 100%, с, в отдельных вариантах осуществления, малым количеством или отсутствием выявляемого свободного антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов (например, меньше 200 нг/мл лекарственного средства выявляется в крови пациента).

В предпочтительных вариантах осуществления антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты вводят парентерально, например, внутривенно, внутримышечно или подкожно, или, альтернативно, вводят перорально. Антитело против CD3 или антигенсвязывающие фрагменты можно также вводить в виде препарата с замедленным высвобождением.

В отдельном варианте осуществления назначение одной или более доз или схемы введения доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов не вызывает или уменьшает по сравнению с другими иммуносупрессорами один или более из следующих нежелательных или неблагоприятных эффектов: отклонения основных показателей состояния организма (лихорадку, тахикардию, брадикардию, гипертензию, гипотензию), гематологические проявления (анемию, лимфопению, лейкопению, тромбоцитопению), головную боль, озноб, головокружение, тошноту, астению, боль в пояснице, боль в груди (сдавленность в груди), диарею, миалгию, боль, зуд, псориаз, ринит, потоотделение, реакцию в месте инъекции, расширение кровеносных сосудов, повышенный риск инфекции, вызываемой условно патогенными организмами, активацию вируса Эпштейна-Барра, апоптоз Т-клеток и повышенный риск развития некоторых типов рака. В другом отдельном варианте осуществления назначение одной или более доз профилактически или терапевтически эффективного количества одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов не вызывает или уменьшает по сравнению с другими иммуносупрессорами один или более из следующих нежелательных или неблагоприятных эффектов: отклонения основных показателей состояния организма (лихорадку, тахикардию, брадикардию, гипертензию, гипотензию), гематологические проявления (анемию,

лимфопению, лейкопению, тромбоцитопению), головную боль, озноб, головокружение, тошноту, астению, боль в пояснице, боль в груди (сдавленность в груди), диарею, миалгию, боль, зуд, псориаз, ринит, потоотделение, реакцию в месте инъекции, расширение кровеносных сосудов, повышенный риск инфекции, вызываемой условно патогенными организмами, активацию вируса Эпштейна-Барра, апоптоз Т-клеток и повышенный риск развития некоторых типов рака.

В соответствии с настоящим изобретением дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов для лечения аутоиммунного нарушения, можно повторять через 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца или дольше после первоначальной или предыдущей дозы или схемы введения доз, включающей профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. Повторную дозу или схему введения доз можно назначать, как правило, когда симптомы, связанные с указанным аутоиммунным нарушением, снова возникают после ослабления после первоначальной или предыдущей дозы или схемы введения доз, или когда симптомы, связанные с указанным аутоиммунным нарушением, не ослабляются после первоначальной дозы или схемы введения доз антитела против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов в соответствии со способами по настоящему изобретению. Например, что касается диабета, повторную дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, можно назначать субъекту, когда, например, среднее суточное введение субъекту инсулина через 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца или дольше после первоначального или предыдущего лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами не уменьшается на по крайней мере 5%, по крайней мере 10%, по крайней мере 20%, по крайней

мере 30%, по крайней мере 40%, по крайней мере 50%, по крайней мере 60%, по крайней мере 70%, по крайней мере 80% или по крайней мере 90% по сравнению с уровнями до лечения. Альтернативно, что касается диабета, повторную дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, можно назначать субъекту, когда, например, уровни НА 1 или НА 1 С у субъекта через 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца или дольше после первоначального или предыдущего лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами не уменьшаются на по крайней мере 5%, по крайней мере 10%, по крайней мере 20%, по крайней мере 30%, по крайней мере 40%, по крайней мере 50%, по крайней мере 60%, по крайней мере 70%, по крайней мере 80% или по крайней мере 90% по сравнению с уровнями до лечения. В другом варианте осуществления, что касается диабета, повторную дозу или схему введения доз, включающую профилактически или терапевтически эффективное количество одного или более из антител против CD3 или антигенсвязывающих фрагментов, можно назначать субъекту, когда, например, ответ в виде увеличения С-пептида через 1 месяц, 2 месяца, 4 месяца, 6 месяцев, 8 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев, 18 месяцев или 24 месяца или дольше после первоначального или предыдущего лечения антителом против CD3 или антигенсвязывающими фрагментами уменьшается на более чем 5%, более чем 10%, более чем 20%, более чем 30%, более чем 40%, более чем 50%, более чем 60%, более чем 70%, более чем 80% или более чем 90% по сравнению с уровнями до лечения.

Аутоиммунные заболевания являются неинфекционными иммунологическими заболеваниями, вызванными иммунными ответами, направленными против нормальных компонентов клеток, тканей и органов человека. Аутоиммунные заболевания часто являются хроническими заболеваниями, которые мало-помалу разрушают являющиеся мишенями ткани и органы. Часто встречающиеся заболевания, в настоящее время отнесенные к аутоиммунным

заболеваниям вследствие наличия несоответствующих аутоиммунных реакций, включают инсулинозависимый диабет типа I, ревматоидный артрит (RA), системную красную волчанку (SLE), рассеянный склероз (MS), воспалительное заболевание кишечника (IBD), злокачественную миастению, глютеновую болезнь, синдром Гужеро-Шегрена, болезнь Грейвса, болезнь Крона, аутоиммунный гепатит, псориаз, псориатический артрит, астму, аллергический ринит, эффекты вследствие трансплантации органа или гомологичную болезнь (GVHD) и многочисленные другие заболевания, в которые вовлечена воспалительная иммунная реакция.

Поскольку аутоиммунные заболевания типично являются хроническими, в их случае, как правило, требуется пожизненное лечение и слежение. По этой причине традиционные терапии для аутоиммунного заболевания, главным образом, направлены на борьбу с последствиями воспаления, вызванного заболеванием, и лишь немного аутоиммунных заболеваний можно вылечить или заставить исчезнуть с помощью такого лечения. В случае некоторых аутоиммунных заболеваний введение одного из ограниченного ряда иммуносупрессоров может привести к периодам ремиссии или исчезновения активного заболевания. Иммуносупрессоры, используемые для дополнительной терапии, включают вещества, которые подавляют продукцию цитокинов, уменьшают или подавляют экспрессию аутоантигенов или маскируют антигены главного комплекса гистосовместимости (MHC). Иммуносупрессоры включают противовоспалительные лекарственные средства (например, нестероидное противовоспалительное лекарственное средство («NSAID»), циклофосфамид, бромкриптин, циклоспорин А, метотрексат, стероиды, такие как глюкокортикоиды, и цитокины или антагонисты рецепторов цитокинов. Пациенты редко могут прекратить прием этих иммуносупрессоров, поскольку аутоиммунное заболевание у них обычно вновь возникает при прекращении приема лекарственного средства. Аутоиммунное заболевание может стать не поддающимся лечению при продолжении приема иммуносупрессоров в течение длительного срока и может даже нуждаться в увеличивающихся дозах иммуносупрессоров.

Терапевтические антитела, направленные против CD3, как полагают, приводят к меньшему числу длительных побочных эффектов, чем многие из иммуносупрессорных химиотерапий, доступных в настоящее время для лечения аутоиммунных заболеваний (WO 2007/117600). Однако было установлено, что прежние терапии на основе антител являются проблематичными, особенно в случае использования многократного введения. Антилимфоцитарные терапии, такие как антилимфоцитарный глобулярный белок (ALG), и моноклональные антитела, направленные против В-клеток, такие как ритуксимаб (Rituxin®) и алемтузумаб (CAMPATH®), уменьшают популяции циркулирующих и тканевых В-клеток у подвергнутых лечению субъектов. Однако эти терапии также приводят к тяжелой форме иммуносупрессии, которая является нежелательной в случае лечения в течение длительного срока хронического аутоиммунного заболевания. Основным осложнением вызывающей тяжелую форму иммуносупрессии терапии является инфекция. Системная иммуносупрессия может также сопровождаться нежелательными токсическими эффектами и снижением уровней гемопоэтических стволовых клеток. Кроме того, у пациентов, получающих терапии на основе антител, часто вырабатываются значительные уровни человеческих антимышиных антител (НАМА), человеческих антихимерных антител (НАСА) и антиидиотипические ответы, которые могут ограничить повторные лечения, когда ремиссия заканчивается.

Как обсуждалось выше, антитела, направленные против антигенов Т-клетки, таких как Т-клеточный рецепторный комплекс (TCR), были предложены в качестве возможных терапевтических средств для иммуносупрессии аутоиммунного заболевания. Антитела против CD3, как полагают, вызывают такую иммуносупрессию в результате уменьшения патогенных Т-клеток и индукции регуляторных Т-клеток (WO 2007/117600; St. Clair E.W. (2009) "Novel Targeted Therapies for Autoimmunity," Curr. Opin. Immunol. 21(6): 648-657; Ludvigsson, J. (2009) "The Role of Immunomodulation Therapy in Autoimmune Diabetes," J. Diabetes Sci. Technol. 3(2): 320-330). По этой причине антитела против

Т-клеток, в том числе против CD3, использовались для оказания влияния на иммунологический статус у субъекта посредством супрессии, усиления или перенаправления Т-клеточных реакций на антиген. В частности, Теплизумаб, также известный как hОКТ3γ1(Ala-Ala) (содержащий аланин в положениях 234 и 235) (MacroGenics, Inc.), является антителом против CD3, которое было сконструировано для изменения функции Т-лимфоцитов, которые опосредуют разрушение инсулин-продуцирующих бета-клеток панкреатических островков. Теплизумаб связывается с эпитопом ε-цепи CD3, представленной на зрелых Т-клетках, и поступает таким образом.

Благодаря частично своей перекрестной реактивности с нечеловеческим CD3 (которая делает возможным более точное и гибкое дозирование), антитела против CD3 по настоящему изобретению, как считают, особенно применимы для лечения аутоиммунного заболевания, несмотря на очевидные неудачи известного уровня техники.

Такие антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться отдельно или вместе с другими фармакологическими средствами. В частности, в настоящем изобретении предусматриваются терапии, включающие введение таких антител или антигенсвязывающих фрагментов вместе с антителами против В-клеток (или их антигенсвязывающими фрагментами). Антитела против В-клеток известны в данной области техники (смотрите WO 2007/117600; WO 2005/000901; WO 2004/035607; патенты США №№ 5500362 и 5736137, публикации заявок на патенты США №№ 2003/0219433, 2005/0271658, 2005/0271658, 2005/0281817, 2006/024295, 2006/024300 и 2006/034835; Clark, E.A. et al. (1985) "Role Of The Bp35 Cell Surface Polypeptide In Human B-Cell Activation," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82(6): 1766-1770; Press, O.W. et al. (1987) "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B Cell Lymphomas," Blood 69: 584-591). Такое совместное введение можно выполнять, используя совместное введение отдельных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, или посредством образования биспецифических

антител, или более предпочтительно, посредством образования диател DART™, описанных выше, обладающих способностью к связыванию как с CD3, так и с В-клеточным антигеном.

Предпочтительно используемое антитело против В-клеток или антигенсвязывающий фрагмент будет направлено против маркера поверхности В-клеток, такого как маркер, выбираемый из CD19, CD20, CD22, CD23, CD32В, CD40, В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), CD79а, CD79b, CD38, CD27, связанного с функцией лимфоцитов антигена (LFA), такого как LFA-I или LFA-3, CFA-I, или другой вспомогательной молекулы, вовлеченной в ассоциацию Т-клеток, В-клеток, которая приводит к активации Т-клеток и В-клеток в ходе адаптивного иммунного ответа. В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления антителом против В-клеток может быть истощающее В-клетки антитело, такое как антитело, направленное против маркера, выбираемого из CD19, CD20, CD22, CD23, CD32В, CD40, В7-1 (CD80), В7-2 (CD86), связанного с функцией лимфоцитов антигена (LFA), такого как LFA-I или LFA-3, CFA-I, или другой вспомогательной молекулы, вовлеченной в ассоциацию Т-клеток, В-клеток.

Альтернативно, такая комбинированная терапия может включать введение антитела против CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента в комбинации с антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом), которое распознает антиген, присутствующий на антигенпрезентирующей клетке (например, В7-Н3). Тем не менее, в дополнительном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение антитела против CD3 (или его антигенсвязывающего фрагмента) в комбинации с антителом (или его антигенсвязывающим фрагментом), которое распознает полипептид, участвующий в активации В-клеток (или напрямую, или опосредованно), или иммуномодулятор, такой как член семейства цитокинов TNF или интерферон (например,  $\alpha$ ,  $\beta$  или  $\gamma$ -интерферон). Как это будет понятно квалифицированным в данной области техники специалистам, такие интерфероны участвуют в регуляции белков, которые работают сообща при процессировании и презентации антигенов. Эти цитокины



стимулируют клетки с увеличением экспрессии в них тяжелых цепей класса I HLA. В одном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту, имеющему активное аутоиммунное заболевание, антитела против Т-клеточного антигена в комбинации с антителом против  $\beta$ -интерферона. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту антитела, направленного против Т-клеточного антигена, в комбинации с антителом, выбираемым из антител против  $\beta$ -интерферона AVONEX®, BETASERON® и REBIF®. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления комбинированная терапия включает введение субъекту антитела, направленного против Т-клеточного антигена, в комбинации с антителом, направленным против  $\beta$ -интерферона, для лечения субъекта, страдающего рассеянным склерозом.

В дополнительном варианте осуществления антитело против CD3 может быть немитогенным антителом или антителом с уменьшенной митогенностью, которое ингибирует или предотвращает активацию Т-клетки, когда Т-клетка приходит в контакт со специфическим антигеном на антигенпрезентирующей клетке, в частности, антигенпрезентирующей В-клетке. Используемый здесь термин «немитогенное по отношению к Т-клетке антитело» означает антитело, которое сконструировано посредством изменения Fc-рецептора антитела, так что оно не запускает первоначальные события активации и последующий выброс цитокинов, которые отмечаются при активации Т-клетки. «Антителом с уменьшенной митогенностью по отношению к Т-клетке», является антитело, специфическое в отношении Т-клеточного антигена, которое ослабляет первоначальные события активации и последующий выброс цитокинов, которые возникают при активации Т-клетки. Немитогенное антитело или антитело с уменьшенной митогенностью может применяться для предотвращения первоначальных «побочных эффектов первой дозы», отмечаемых при введении пациенту антилимфоцитарного антитела. Немитогенным антителом или антителом с уменьшенной митогенностью может быть

сконструированное антитело, содержащее модифицированный Fc-фрагмент, который предотвращает или ингибирует связывание клетками-эффекторами.

### **С. Способы введения**

В одном аспекте варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают являющихся людьми субъектов, подвергнутых лечению для достижения и сохранения клинической ремиссии в течение более длительных периодов времени, чем ремиссии, достигаемые у пациентов, подвергнутых лечению с использованием традиционной терапии. Например, если с помощью традиционной терапии достигается ремиссия симптомов аутоиммунного заболевания в течение трех месяцев, композиции по настоящему изобретению могут обеспечить полную ремиссию симптомов вплоть до шести месяцев, вплоть до 12 месяцев и в некоторых случаях вплоть до одного-двух лет или дольше. Предусматривается, что в случае некоторых аутоиммунных заболеваний возможно достижение полной ремиссии, которая снова не прекращается, особенно если терапию начинают вскоре после диагностирования аутоиммунного заболевания.

Клиническая ремиссия, достигаемая с помощью комбинированной терапии, может быть полной ремиссией, или она может быть частичной ремиссией, при которой значительные ослабления симптомов заболевания сохраняются в течение продленного периода. Например, у субъекта, получающего терапию по настоящему изобретению, могут отмечаться уменьшенные аутоиммунные ответы, что определяется по уменьшению уровней обнаруживаемых аутоантител в жидкостях и тканях организма, например, в спинномозговой жидкости (CSF), сыворотке, моче или в тканях организма. У субъекта, получающего комбинированную терапию по настоящему изобретению, могут также отмечаться уменьшенные Т-клеточные реакции на аутоантигены, что определяется с помощью *in vitro* анализов пролиферации или продукции цитокинов, используя мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) или очищенные Т-клетки, по сравнению с субъектами, подвергнутыми лечению с использованием традиционной терапии.

Композиции по настоящему изобретению могут вводиться любым подходящим способом, в том числе с помощью парентерального, местного, подкожного, внутрибрюшинного, внутрилегочного, интраназального введения и/или введения внутрь пораженных тканей. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, антитело можно соответственно ввести с помощью инфузии в прерывистом режиме, например, с использованием увеличивающихся доз антитела. Предпочтительно введение доз осуществляют внутривенно или подкожно, а более предпочтительно с помощью внутривенной инфузии (й). Каждое подвергание воздействию можно обеспечить, используя один и тот же или различные способы введения. В одном варианте осуществления каждое подвергание воздействию осуществляют с помощью внутривенного введения. В другом варианте осуществления каждое подвергание воздействию осуществляют с помощью подкожного введения. Тем не менее, в другом варианте осуществления подвергание воздействию осуществляют с помощью как внутривенного, так и подкожного введения.

В одном варианте осуществления терапевтические антитела вводят в виде медленной внутривенной инфузии, которая может начинаться с почасовой скоростью для доставки молекул по настоящему изобретению за приблизительно 15 минут - 4 часа. Однако, если субъект демонстрирует инфузионную реакцию, скорость инфузии предпочтительно уменьшают, например, до половины скорости потока. Подвергаемые лечению субъекты могут получать профилактическое лечение ацетаминофеном/парацетамолом (например, приблизительно 1 г) и дифенгидрамина HCl (например, приблизительно 50 мг или эквивалентную дозу схожего средства), принимая их внутрь за приблизительно 30-60 минут до начала инфузии.

Лечение, обеспечиваемое комбинированными композициями по настоящему изобретению (включающими диатела DART™), может назначаться субъекту, используя первоначальную дозу первого антитела, которая меньше количества такого антитела, которое необходимо для достижения клинической эффективности терапии для

аутоиммунного заболевания при введении в виде терапии, предусматривающей одно антитело. Доза терапевтического антитела против Т-клеток, которая меньше дозы, необходимой для достижения истощения Т-клеток, способных распознавать аутоантигены и реагировать на них, при терапии, предусматривающей одно антитело, может быть достаточной для обеспечения желаемой клинической эффективности. Способы определения дозы терапевтического антитела, необходимой для достижения клинической эффективности, известны квалифицированным в данной области техники специалистам. Например, клиническую эффективность у субъекта можно определить как период времени до прогрессирования заболевания, уменьшение клинических симптомов, уменьшение уровней лабораторных маркеров, уменьшение необходимости в повторном лечении или с помощью любого другого клинического средства, признанного в качестве пригодного индикатора улучшения состояния аутоиммунного заболевания.

Второе антитело комбинированной терапии может также вводиться субъекту, нуждающемуся в лечении, в виде первоначальной дозы, которая меньше дозы, эффективной для достижения клинической эффективности при приведении только этого антитела. Например, дозы истощающего антитела против В-клеток, с помощью которых достигается составляющее менее чем 100% истощение В-клеток, составляющее менее чем 50% истощение В-клеток, составляющее менее чем 30% истощение В-клеток или даже не достигается истощение В-клеток, могут вводиться вместе с первым антителом против Т-клеток для достижения клинической эффективности, предусматривающей подавление иммунного ответа против аутоантигена, которая равна клинической эффективности, достигаемой при введении количества истощающего В-клетки антитела, которое обеспечивает 100% истощение В-клеток у субъекта при введении только этого антитела, или превосходит ее.

В некоторых случаях клинической эффективностью является эффективность, которая не достигается ни при введении только первого антитела, или только второго антитела. В других случаях

клиническая эффективность может быть эквивалентна таковой, достигаемой при назначении терапии, предусматривающей одно антитело, причем комбинированная терапия обуславливает меньшую иммуносупрессию иммунной системы подвергаемого лечению субъекта, чем терапия, предусматривающая одно антитело. В одном предпочтительном варианте осуществления синергетическая реакция, обуславливаемая комбинированной терапией, уменьшает или аннулирует ответы против аутоантигена у субъекта при обеспечении более низких уровней иммуносупрессии. Общая иммуносупрессия является значительной проблемой для ранее доступных терапий на основе антител.

#### **D. Фармацевтические препараты**

Терапевтические препараты антител, используемые в вариантах осуществления настоящего изобретения, готовят для хранения, поставки и введения посредством смешивания композиции по настоящему изобретению с желаемой степенью чистоты с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами, общепризнанными в фармацевтической области, в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов.

Термин «фармацевтически приемлемый» означает разрешенный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или приведенный в списке в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопеех для применения для животных и конкретнее для людей. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному)), эксципиенту или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода или масла, в том числе масла нефтяные, масла животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. В качестве жидких носителей могут также использоваться солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина, особенно в случае инъеклируемых

растворов. Подходящие фармацевтические эксципиенты включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, если желательно, может также содержать незначительные количества смачивающих агентов или эмульгаторов, или рН-буферных веществ. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсии, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и т.п.

Композиции по настоящему изобретению включают нерасфасованные композиции лекарственных средств, применимые для производства фармацевтических композиций, (например, композиции с примесью или нестерильные композиции) и фармацевтические композиции (т.е. композиции, которые подходят для введения субъекту или пациенту), которые могут использоваться для приготовления стандартных лекарственных форм. Такие композиции включают профилактически или терапевтически эффективное количество профилактического и/или терапевтического средства, описываемого здесь, или комбинации этих средств и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, когда композиции по настоящему изобретению включают профилактически или терапевтически эффективное количество гуманизированных антител по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Как правило, ингредиенты композиций по настоящему изобретению поставляются или порознь, или смешаны вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере, таком как ампула или саше, указывающем на количество активного агента. Если композиция должна вводиться с помощью инфузии, ее распределение осуществляют с использованием инфузионного флакона, содержащего стерильную воду или солевой раствор фармацевтического качества. Если композиция вводится с помощью инъекции, может предоставляться ампула со стерильной водой для инъекции или

солевым раствором, так что ингредиенты могут быть смешаны до введения. Фармацевтические композиции, подходящие для инъекции, включают стерильные водные растворы, в которых активные агенты являются водорастворимыми, или дисперсии или стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов для немедленного введения. Композиции для применения в комбинированной терапии можно приготовить посредством включения активного антагониста или антитела в требуемом количестве вместе с подходящими носителями, например, водой, этанолом, полиолом (например, глицерином, пропиленгликолем и жидким полиэтиленгликолем) и их подходящими смесями. В композицию могут быть включены агенты для придания изотоничности, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

Композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают, но без ограничения, те, которые образованы анионами, такими как те, которые получаются из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и те, которые образованы катионами, такими как те, которые получаются из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов трехвалентного железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

#### **Е. Наборы**

Настоящим изобретением обеспечивается фармацевтический комплект или набор, включающий один или более контейнеров, наполненных гуманизированными антителами по настоящему изобретению. Кроме того, в фармацевтический комплект или набор могут быть также включены одно или более других профилактических или терапевтических средств, применимых для лечения заболевания. Настоящим изобретением также обеспечивается фармацевтический комплект или набор, включающий один или более контейнеров, наполненных одним или более ингредиентов фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Такой контейнер(ы) может необязательно сопровождать сообщение в форме, предписанной государственным

органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, в котором отражено разрешение этим органом производства, применения или продажи для введения человеку.

Настоящим изобретением обеспечиваются наборы, которые могут использоваться в вышеприведенных способах. В одном варианте осуществления набор включает одно или более гуманизированных антител по настоящему изобретению. В другом варианте осуществления набор, кроме того, включает одно или более других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения злокачественного новообразования, в одном или более контейнерах. В другом варианте осуществления набор, кроме того, включает одно или более цитотоксических антител, которые связываются с одним или более раковых антигенов, связанных с раком. В некоторых вариантах осуществления другим профилактическим или терапевтическим средством является химиотерапевтическое средство. В других вариантах осуществления профилактическим или терапевтическим средством является биологическое или гормональное терапевтическое средство.

В одном варианте осуществления настоящим изобретением обеспечивается готовое изделие, содержащее антитела, которые используют для комбинированной терапии для лечения аутоиммунного заболевания. Готовое изделие включает контейнер, включающий первое антитело, которое связывается с антигеном, присутствующим на Т-клетке, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель внутри контейнера. Готовое изделие, кроме того, включает второй контейнер, включающий второе антитело, направленное против маркера В-клеточной поверхности, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель и инструкции в отношении введения композиции субъекту, нуждающемуся в лечении аутоиммунного заболевания. Если первое и второе антитела, как установлено, являются комплементарными и не оказывают неблагоприятный эффект друг на друга, первое и второе антитела могут быть предоставлены в одном контейнере, содержащем первое и второе антитела в соответствующих для введения концентрациях, вместе с листовкой-



вкладышем и инструкциями в отношении введения.

Контейнеры готового изделия могут быть изготовлены из любого подходящего материала, который не будет вступать в реакцию с препаратом или иначе оказывать воздействие на препарат. Готовое изделие может, кроме того, включать второй или третий контейнер, включающий буфер в качестве фармацевтически приемлемого разбавителя, такой как бактериостатическая вода для инъекции, забуференный фосфатом солевой раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Готовое изделие может также включать другой материал, который может быть желателен с коммерческой точки зрения и точки зрения потребителя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

#### **VII. Способы диагностирования с использованием антител против CD3 по настоящему изобретению**

Антитела против CD3, созданные с помощью описываемых здесь способов, могут также использоваться для определения присутствия или отсутствия раковых клеток или их уровня посредством детектирования антигенов, которые являются циркулирующими в крови после их разъединения от клеточной поверхности (например, растворимого CD3). Такой циркулирующий антиген может быть интактным антигеном CD3 или его фрагментом, который сохраняет способность быть обнаруженным в соответствии со способами, изложенными здесь. Такое детектирование может быть осуществлено, например, с помощью анализа и использованием FACS, используя стандартные способы, обычно используемые в данной области техники.

В предпочтительном варианте осуществления способов диагностирования по этому изобретению антитело несет обнаруживаемую метку. Примеры меток, которые могут использоваться, включают радиоактивный агент (например, скандий-47, технеций-99m, индий-111, йод-131, рений-186, рений-188, самарий-153, гольмий-166, лютеций-177, медь-64, скандий-47, иттрий-900), фермент или флуорофор, такой как фикоэритрин или флуоресцеин изотиоцианат (также известный как фторизотиоцианат или FITC).

Одним способом применения антител для диагностирования является *in vivo* визуализация опухоли посредством связывания антитела с радиоактивным или рентгеноконтрастным веществом, введение антитела индивидууму и использование рентгеновского аппарата или другого аппарата для получения изображения для визуализации местонахождения меченого антитела на поверхности раковых клеток, экспрессирующих антиген. Антитело вводят в концентрации, которая поддерживает связывание в физиологических условиях.

*In vitro* методы детектирования CD3 являются обычными в данной области техники и включают иммуноферментные твердофазные анализы (ELISA), иммунопреципитации, иммунофлуоресценцию, иммуноферментный анализ (EIA), радиоиммуноанализ (RIA) и анализ с использованием Вестерн-блоттинга.

Настоящим изобретением также обеспечиваются способы оказания помощи в диагностировании злокачественного новообразования, характеризующегося раковыми клетками, которые экспрессируют CD3, у индивидуума, используя антитело, которое связывается с CD3, и любые другие способы, которые могут использоваться для определения уровня экспрессии CD3. Как здесь используется, способы «оказания помощи в диагностировании» означают, что эти способы содействуют клиническому определению по классификации, или природы, рака и могут быть или могут не быть определяющими, что касается точного диагноза. Соответственно, способ оказания помощи в диагностировании рака может включать стадию детектирования уровня CD3 в биологическом образце от индивидуума и/или определение уровня экспрессии CD3 в образце. Антитела, распознающие антиген или его часть, могут также использоваться для создания диагностических иммуноанализов для детектирования антигена, разъединенного от живых или умирающих раковых клеток или секретированного ими, в жидкостях организма, включающих, но без ограничения, кровь, слюну, мочу, альвеолярную жидкость или асцитическую жидкость. Антитела против CD3, созданные с помощью описываемых здесь способов, могут использоваться для определения того, может ли индивидуум, у которого диагностирован рак, считаться кандидатом

на иммунотерапию с использованием антител, направленных против CD3. В одном варианте осуществления биопсийный образец можно проверить в отношении экспрессии CD3, используя антитела, направленные против CD3. Индивидуумы с раковыми клетками, которые экспрессируют CD3, являются подходящими кандидатами на иммунотерапию с использованием антител, направленных против CD3. Окрашивание антителом против CD3 может также использоваться для проведения различения раковых тканей от нормальных тканей.

Способы применения антител против CD3 с целью диагностирования применимы как до, так и после любой формы противоракового лечения, например, химиотерапии или лучевой терапии, для определения, какие опухоли с наибольшей вероятностью будут отвечать на конкретное лечение, прогноза для индивидуума со злокачественным новообразованием, подтипа опухоли или источника метастатического заболевания, и прогрессирования заболевания или ответной реакции на лечение.

Композиции по этому изобретению, в частности, подходят для диагностирования болезненных состояний, отличных от рака, используя способы, описанные в общем выше, для применения с другими нездоровыми (нераковыми) клетки. Болезненные состояния, подходящие для применения в способах по этому изобретению, включают, но без ограничения, заболевания или нарушения, связанные с воспалительными или аутоиммунными реакциями у индивидуумов. Способы, описанные выше, могут использоваться для модулирования воспалительных или аутоиммунных реакций у индивидуумов. Заболевания и состояния, являющиеся следствием воспалительных и аутоиммунных нарушений, которые могут быть подвергнуты диагностированию и/или лечению, используя композиции и способы по настоящему изобретению, включают, в качестве иллюстрации, а не ограничения, рассеянный склероз, менингит, энцефалит, удар, другие повреждения головного мозга, воспалительное заболевание кишечника, в том числе неспецифический язвенный колит и болезнь Крона, злокачественную миастению, обыкновенную волчанку, ревматоидный артрит, астму, острый ювенильный диабет, СПИД-деменцию, атеросклероз, нефрит,

ретинит, атопический дерматит, псориаз, ишемию миокарда и острое, лимфоцит-опосредованное повреждение легких.

Тем не менее, другие показания к диагностическому и/или терапевтическому применению антител и других терапевтических средств по настоящему изобретению включают введение индивидуумам, подверженным риску отторжения органа или трансплантата. За последние годы было достигнуто значительное увеличение эффективности хирургических методов трансплантации тканей и органов, таких как кожа, почка, печень, сердце, легкое, поджелудочная железа и костный мозг. Наверно, основной нерешенной проблемой является отсутствие удовлетворительных агентов для индукции иммунотолерантности у реципиента к трансплантированному аллотрансплантату или органу. Когда аллогенные клетки или органы трансплантируют хозяину (т.е. донор и реципиент являются различными индивидуумами одного и того же вида), иммунная система хозяина будет, вероятно, устанавливать иммунный ответ против чужеродных антигенов в трансплантате (реакцию «хозяин против трансплантата»), приводящий к разрушению трансплантированной ткани.

Моноклональные антитела против CD3, созданные с помощью описываемых здесь способов, могут использоваться для определения присутствия или отсутствия человеческих раковых стволовых клеток в ряде тканей. Была выдвинута гипотеза, что раковые стволовые клетки (CSC) играют роль в росте опухоли и ее метастазировании (Ghotra, V.P. et al. (2009) "The Cancer Stem Cell Microenvironment And Anti-Cancer Therapy," *Int. J. Radiat. Biol.* 85(11): 955-962; Gupta, P.B. et al. (2009) "Cancer Stem Cells: Mirage Or Reality?" *Nat. Med.* 15(9): 1010-1012; Lawson, J.C. et al. (2009) "Cancer Stem Cells In Breast Cancer And Metastasis," *Breast Cancer Res. Treat.* 118(2): 241-254; Hermann, P.C. et al. (2009) "Pancreatic Cancer Stem Cells- Insights And Perspectives," *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(10): 1271-1278; Schatton, T. et al. (2009) "Identification And Targeting Of Cancer Stem Cells," *Bioessays* 31(10): 1038-1049; Mittal, S. et al. (2009) "Cancer Stem Cells: The Other Face Of Janus," *Amer. J. Med. Sci.* 338(2): 107-112; Alison, M.R. et al.

(2009) "Stem Cells And Lung Cancer: Future Therapeutic Targets?" *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(9): 1127-1141; Charafe-Jauffret, E. et al. (2009) "Breast Cancer Stem Cells: Tools And Models To Rely On," *BMC Cancer* 9:202; Scopelliti, A. et al. (2009) "Therapeutic Implications Of Cancer Initiating Cells," *Expert Opin. Biol. Ther.* 9(8): 1005-1016; публикация РСТ-заявки № 2008/091908). В соответствии с этой гипотезой CSC обеспечивают небольшую, особую субпопуляцию клеток внутри каждой опухоли, которые способны к неограниченному самообновлению и развитию в более зрелую опухолевую клетку(и), которая относительно ограничена в способности к репликации. Была выдвинута гипотеза, что эти раковые стволовые клетки, возможно, являются более устойчивыми к химиотерапевтическим средствам, облучению или другим токсическим условиям, и поэтому остаются после клинических терапий и позднее превращаются во вторичные опухоли, метастазы или ответственны за рецидив. Было выдвинуто предположение, что CSC могут возникать или из стволовых клеток «нормальных» тканей, или из клеток-предшественников дифференцированных тканей.

Описанные в этой заявке применения, которые распространяются на применение антител против CD3, также охватывают применение других агонистов, антагонистов и модуляторов CD3, описываемых здесь, для применения для идентификации и лечения раковых стволовых клеток. В таких вариантах осуществления антитела против CD3 и другие агонисты, антагонисты и модуляторы CD3 используются для идентификации, диагностирования или терапевтического лечения раковых стволовых клеток, используя способы, схожие с описанными способами, и осуществляют изменения в пределах средней компетенции специалиста-практика для пригонки способа к идентификации/диагностированию или лечению раковых стволовых клеток.

Теперь после общего описания настоящего изобретения его будет легче понять благодаря ссылке на следующие примеры, которые предоставлены в качестве иллюстрации и, как предполагается, не являются ограничением настоящего

изобретения, кроме особо оговоренных случаев.

### Пример 1

**mAb1 связывается как с CD3 человека, так и с CD3 яванского макака**

Для оценки способности mAb1 к связыванию с CD3 человека был выполнен ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкг/мл растворимого CD3 яванского макака («sCD3») и инкубировали в присутствии различных концентраций химерного варианта антитела mAb1 (ch-mAb1) (содержащего последовательности переменных областей mAb1 и константные области антитела человека), гуманизированного варианта (h-mAb1) и антитела, состоящего из легкой цепи химерного антитела mAb1 и тяжелой цепи гуманизированного варианта mAb1. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 1А. Этот эксперимент показывает способность mAb1 к связыванию с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком. Кроме того, было выполнено сравнение связывание химерного антитела mAb1 с таковым антитела, в состав которого входят LC-2 гуманизированного варианта mAb1 и тяжелая цепь mAb1. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 1В. Этот эксперимент показывает способность mAb1 к связыванию с CD3 человека. Таким образом, фиг. 1А и 1В показывают, что гуманизированное mAb1 было способно к связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, не являющегося человеком. Гуманизированное mAb продемонстрировало связывание с sCD3 и hCD3, схожее с таковым химерного mAb1.

### Пример 2

#### Гуманизация mAb1

Были приготовлены гуманизированные производные mAb1. Ниже представлены аминокислотные последовательности этих гуманизированных производных и кодирующие их полинуклеотидные последовательности. CDR начертаны полужирно и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 1 переменной области легкой цепи гуманизированного mAb1 (SEQ ID NO: 10):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT **ITCSASSSVS** **YMNWYQQKPG** KAPKRLIY**DS**  
**SKLAS**GVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYC**QQW** **SRNPPT**FGGG  
 TKVEIK

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 1  
вариабельной области легкой цепи гуманизированного mAb1 (SEQ ID  
NO: 11):

gacatccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgcct ctgtgggcca  
cagagtgaca atcacctgtt ccgccagctc ctccgtgtcc tacatgaact  
ggtatcagca gaagcccggc aaggccccc aagcggctgat ctacgactcc  
tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga ttctccggct ctggctccgg  
caccgagttc accctgacca tctccagcct gcagcccag gacttcgcca  
cctactactg ccagcagtg tcccggaaacc cccctacctt cggcggaggc  
accaaggtgg aatcaag

Аминокислотная последовательность варианта 2 вариабельной  
области легкой цепи гуманизированного mAb1 (LC-2 mAb1) (SEQ ID  
NO: 12):

DVVMTQSPA I MSAFPGEKVT ITC **SASSSVS** **YMNWYQQKPG** KAPKRWIY**DS**  
**SKLAS**GVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPE DFATYYC**QQW** **SRNPPT**FGGG  
TKVEIK

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 2  
вариабельной области легкой цепи гуманизированного mAb1 (SEQ ID  
NO: 13):

gacgtgggtga tgaccagtc tcttgccatc atgagtgctt tcccaggcca  
gaaagtgacc attacatgct ctgcttccag ctctgtgtcc tacatgaact  
ggtatcagca gaagccaggg aaagcaccca agaggtggat ctacgactcc  
tccaagctgg cctccggcgt gccaaagccgg ttctctggta gtggctcagg  
aaccgagttt actctgacca tttccagcct gcagcctgaa gatttcgcaa  
catactattg tcagcagtg tccagaaatc cccctacatt tggcggaggg  
actaaagtg aatcaag

Аминокислотная последовательность вариабельной области  
тяжелой цепи гуманизированного mAb1 (SEQ ID NO: 14):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT **RSTMHWVRQA** PGQGLEWIG**Y**  
**INPSSAYTNY** **NQKFKD**RVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAS**PQ**  
**VHYDNGFPY** WGQGTTLVTVS S

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая  
вариабельную область тяжелой цепи гуманизированного mAb1 (SEQ  
ID NO: 15):

```

caggtgcagc  tgggtgcagtc  tggcgccgaa  gtgaagaaac  ctggcgcctc
cgtgaagggtg  tcctgcaagg  cctccggcta  caccttcacc  cgggccacca
tgcaactgggt  gcgacaggcc  ccaggccagg  gactggaatg  gatcggctac
atcaaccctc  ccagcgccta  caccaactac  aaccagaaat  tcaaggaccg
cgtgaccatc  accgccgaca  agtccaccag  caccgcctac  atggaactgt
ctagcctgcg  gagcgaggac  accgccgtgt  actactgcgc  ctccccccag
gtgcactacg  actacaacgg  cttcccctac  tggggccagg  gcaccctggt
gacagtgtcc  tcc

```

### Пример 3

#### Гуманизация mAb2

Были приготовлены гуманизированные производные mAb2. Ниже представлены аминокислотные последовательности этих гуманизированных производных и кодирующие их полинуклеотидные последовательности. CDR начертаны полужирно и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта 1 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 16):

```

QAVVTQEPSL  TVSPGGTVTL  TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ  KPGQAPRTLI
GTNKRAPWT  PARFSGSLLG  GKAALTITGA  QAEDEADYYC  ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 1 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 17):

```

caggctgtgg  tgactcagga  gccttcactg  accgtgtccc  caggcggaac
tgtgaccctg  acatgcagat  ccagcacagg  cgcagtgacc  acatctaact
acgccaattg  gttccagcag  aagccaggac  aggcaccaag  gaccctgac
gggggtaca  acaaaagggc  tccttgacc  cctgcacggt  tttctggaag
tctgctgggc  ggaaaggccg  ctctgactat  taccggggca  caggccgagg
acgaagccga  ttactattgt  gctctgtggt  atagcaatct  gtgggtgttc
gggggtggca  caaaactgac  tgtgctggga

```

Аминокислотная последовательность варианта 2 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 18):

```

QAVVTQEPSL  TVSPGGTVTL  TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ  KPGQAPRTLI
GTNKRAPWT  PARFSGSLLG  GKAALTITGA  QAEDEADYYC  ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 2 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-2



h-mAb2) (SEQ ID NO: 19):

```
caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gaccctgac
gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga
```

Аминокислотная последовательность варианта 3 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 20):

```
QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQE KPGQAPRTLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 3 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 21):

```
caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac
tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact
acgccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gaccctgac
gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggt tttctggaag
tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg
acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga
```

Аминокислотная последовательность варианта 4 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-4 h-mAb2) (SEQ ID NO: 22):

```
QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 4 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-4 h-mAb2) (SEQ ID NO: 23):



caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac  
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact  
 acgccaattg ggtgcagcag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc  
 ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggg tttctggaag  
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg  
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggg atagcaatct gtgggtgttc  
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 7 вариабельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-7 h-mAb2) (SEQ ID NO: 28):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQE KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 7 вариабельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-7 h-mAb2) (SEQ ID NO: 29):

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac  
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact  
 acgccaattg gttccaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc  
 ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc cctgcacggg tttctggaag  
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg  
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggg atagcaatct gtgggtgttc  
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 8 вариабельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 30):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 8 вариабельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 31):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac  
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact  
 acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc  
 ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag  
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg  
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc  
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 9 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-9 h-mAb2) (SEQ ID NO: 32):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPGQAFRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 9 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-9 h-mAb2) (SEQ ID NO: 33):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac  
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact  
 acgccaattg ggtgcaggag aagccaggac aggcattcag gggcctgatc  
 ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag  
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg  
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc  
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 10 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-10 h-mAb2) (SEQ ID NO: 34):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWFQQ KPDHLFTGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 10 варибельной области легкой цепи гуманизированного mAb2 (VL-10 h-mAb2) (SEQ ID NO: 35):

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac  
 tgtgaccctg acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact  
 acgctaattg gttccagcag aagcccagacc acctgttcac tgggctgatc  
 ggcggaacca acaaaagggc tccttgacc cctgcacggt tttctggaag  
 tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca caggccgagg  
 acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc  
 ggggggtggca caaaactgac tgtgctggga

Аминокислотная последовательность варианта 1 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 36):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDR**F TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 1 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-1 h-mAb2) (SEQ ID NO: 37):

gaggtgcagc tgggtggaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag  
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca  
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg  
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa  
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc  
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga  
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcat attgggggtca  
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 2 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 38):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDR**F TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 2 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-2 h-mAb2) (SEQ ID NO: 39):

gaggtgcagc tgggtggaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag  
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca  
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg  
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa  
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc  
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga  
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcat attgggggtca  
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 3 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-3 h-mAb2) (SEQ ID NO: 40):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 3  
 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-3  
 h-mAb2) (SEQ ID NO: 41):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag  
 cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggcct caccttttct acatacgcca  
 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg  
 atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa  
 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc  
 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca  
 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 4 вариабельной  
 области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-4 h-mAb2) (SEQ  
 ID NO: 42):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVGR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 4  
 вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-4  
 h-mAb2) (SEQ ID NO: 43):

gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag  
 cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggcct caccttttct acatacgcca  
 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg  
 atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa  
 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc  
 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca  
 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 5 вариабельной  
 области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-5 h-mAb2) (SEQ  
 ID NO: 44):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 5  
вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-5  
h-mAb2) (SEQ ID NO: 45):

```
gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgcaaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc
```

Аминокислотная последовательность варианта 6 вариабельной  
области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-6 h-mAb2) (SEQ  
ID NO: 46):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 6  
вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-6  
h-mAb2) (SEQ ID NO: 47):

```
gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag
cctgcgactg tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca
tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg
atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa
ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc
agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga
cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca
gggcacactg gtgaccgtgt ccagc
```

Аминокислотная последовательность варианта 7 вариабельной  
области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-7 h-mAb2) (SEQ  
ID NO: 48):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 7  
вариабельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-7  
h-mAb2) (SEQ ID NO: 49):

gaggtgcagc tgggtggaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag  
 cctgcgactg tcttgccg ccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca  
 tgaactgggt gaggcaggct cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg  
 atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actcagtgaa  
 ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt ctgtatctgc  
 agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcat attgggggtca  
 gggcacactg gtgaccgtgt ccagc

Аминокислотная последовательность варианта 8 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 50):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDRF** TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант 8 варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-8 h-mAb2) (SEQ ID NO: 51):

gaggtgcagc tgggtggagt tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc  
 cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta  
 tgaattgggt ccgccaggct ccagggaaagg ggctggagtg ggttgcaagg  
 atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc tactatgccg actctgtgaa  
 ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc  
 aaatgaacag cctgaaaacc gaggacaccg ccgtgtatta ctgtgtgaga  
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attgggggaca  
 ggggacactg gtgactgtgt cttcc

Аминокислотная последовательность варианта QV варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-QV h-mAb2) (SEQ ID NO: 52):

EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN **TYAMN**WVRQA PGKGLEWVAR  
**IRSKYNNYAT** **YYADSVKDRF** TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYVCVR  
**HGNFGNSYVS** **WFAY**WGQGTL VTVSA

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая вариант QV варибельной области тяжелой цепи гуманизированного mAb2 (VH-QV h-mAb2) (SEQ ID NO: 53):



```

gaggtgcagc  tgggtggaag  cggcggagga  ctggtgcagc  caaagggatc
actgaaactg  tcctgcgccg  cctccggcct  cacctttaac  acatacgcga
tgaattgggt  gcgacaggca  cctggcaagg  gcctggagtg  ggtggcaagg
atcaggtcca  agtacaaca  ttatgcaacc  tactatgccg  actctgtgaa
ggatagattc  acaatcagtc  gcgacgattc  ccagagcatt  ctgtatctgc
agatgaacaa  tctgaaaact  gaagacaccg  ccatgtacta  ttgtgtgcgg
cacggtaact  tcggcaattc  ttacgtgtct  tggtttgctt  attggggaca
ggggacactg  gtgactgtgt  cttcc

```

#### Пример 4

**mAb2 связывается как с CD3 человека, так и с CD3 яванского макака**

Как осуждалось выше, антитело mAb2 было изначально выделено на основе его способности к связыванию с CD3 человека. Для оценки способности mAb2 к связыванию с нечеловеческим CD3 был выполнен ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкг/мл CD3 (или человека, или яванского макака) и инкубировали в присутствии различных концентраций химерного варианта антитела mAb2 (ch-mAb2) (содержащего последовательности переменных областей mAb2 и константные области антитела человека). В качестве контроля планшеты также покрывали антителом, состоящим из легкой цепи гуманизированного mAb1 и тяжелой цепи химерного антитела. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 2А и 2В и показывают, что химерный вариант mAb2 продемонстрировал равное связывание с CD3 человека и с CD3 яванского макака.

#### Пример 5

**Анализ связывающих свойств вариантов легкой и тяжелой цепей h-mAb2**

Анализ был проведен для определения эффекта вариаций остатков каркасных областей легкой цепи mAb2. В таблице 2 указаны исследованные замены.

Таблица 2										
Легкая цепь										
№ остатка по Kabat:	36	38	41	42	43	44	45	46	SEQ ID NO:	
№ остатка SEQ ID NO: 5	38	40	43	44	45	46	47	48		
Вариант	mAb2-VL	V	E	D	H	L	F	T	G	5
	h-mAb2 VL-1	F	Q	G	Q	A	P	R	T	16
	h-mAb2 VL-2	V								18
	h-mAb2 VL-3		E							20
	h-mAb2 VL-4								G	22
	h-mAb2 VL-5	V	E							24
	h-mAb2 VL-6	V							G	26
	h-mAb2 VL-7		E						G	28
	h-mAb2 VL-8	V	E						G	30
	h-mAb2 VL-9	V	E				F		G	32
	h-mAb2 VL-10			D	H	L	F	T	G	34
Тяжелая цепь										
№ остатка по Kabat:	30	49	52a	58	93				SEQ ID NO:	
№ остатка SEQ ID NO: 7	30	49	53	61	99					
Вариант	mVH	N	A		Y	V				7
	hVH-1	S	G			A				36
	hVH-2	N								38
	hVH-3		A							40
	hVH-4					V				42
	hVH-5	N	A							44
	hVH-6	N				V				46
	hVH-6L	N			E	V				54
	hVH-6M	N		N	E	V				72
	hVH-7		A			V				48
	hVH-8	N	A			V				50
	hVH-8L	N	A		E	V				55
	hVH-8M	N	A	N	E	V				74

Были образованы антитела, имеющие легкие цепи mAb2 с SEQ ID NO: 11, но содержащие замены (с использованием нумерации по Kabat) D41G, H42Q, L43A, F44P, T45R или G46T, и тяжелые цепи химерного mAb2 (CDR mAb2 с hFR1-mFR2-hFR3-4), и их связывание оценивали, используя ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкг/мл экстраклеточного домена CD3 человека (растворимого hCD3 или «shCD3») и инкубировали в присутствии различных концентраций антитела. Результаты (фиг. 3) указывают на то, что замена T в положении 46 по Kabat аннулировала способность антитела к связыванию с shCD3.

Были проведены дополнительные исследования для определения влияния вариаций в положениях легкой цепи 36, 38, 44 и 46 по Kabat. Были образованы антитела, содержащие переменную

область легкой цепи VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2 и тяжелую цепь химерного антитела mAb2, и их оценивали, используя описанный выше ELISA с захватом. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 4 и показывают, что связывание с shCD3 антителом, содержащим переменную область легкой цепи hVL-8, было схожим с таковым антитела, содержащего легкую цепь химерного mAb2.

Были также образованы антитела, содержащие переменную область легкой цепи VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2 или VL-8 h-mAb2 и тяжелую цепь химерного антитела mAb2, и их оценивали, используя описанный выше ELISA с захватом (за исключением того, что планшеты покрывали 0,5 мкг/мл shCD3 в забуференном фосфатом солевом растворе) для определения влияния дополнительных замен в положениях 36, 38 и 46. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 5 и показывают, что замены F36V и T46G с использованием нумерации по Kabat были достаточными для получения антитела, связывание которого с shCD3 было схожим с таковым антитела, содержащего легкую цепь химерного mAb2.

Влияние замен в последовательности тяжелой цепи mAb2 оценивали посредством образования антител, содержащих легкую цепь химерного антитела mAb2 и переменную область тяжелой цепи VH-5 h-mAb2, VH-6 h-mAb2 или VH-7 h-mAb2, и оценки связывания, используя описанный выше ELISA с захватом (с использованием покрытия 1 мкг/мл shCD3). Результаты этих исследований представлены на фиг. 6. Кроме того, были образованы антитела, содержащие легкую цепь химерного антитела mAb2 и гуманизированный вариант переменной области тяжелой цепи VH-4 h-mAb2, VH-7 h-mAb2 или VH-9 h-mAb2. Связывание таких антител оценивали, используя описанный выше ELISA с захватом. Результаты этих исследований представлены на фиг. 7.

hVH-6L (и ее вариант hVH-6M) и hVH-8L (и ее вариант VH-8M) тяжелых цепей являются особенно предпочтительными для получения антител, обладающих меньшей аффинностью к CD3, чем антитела, в состав которых входят hVH-1, hVH-2, hVH-3, hVH-4, hVH-5, hVH-6, hVH-7 или hVH-8 таблицы 2. В состав таких антител с уменьшенной аффинностью будет предпочтительно входить или hVH-6L тяжелой

цепи, или VH-8L тяжелой цепи в комбинации с любой из VL-1 легкой цепи h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. Особенно предпочтительное «деиммунизированное» антитело будет состоять из hVH-6L (или ее варианта hVH-6M) тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2, или hVH-8L (или ее варианта hVH-8M) тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2. Ниже представлены последовательности таких полипептидов:

Аминокислотная последовательность hVH-6L (SEQ ID NO: 54):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNEFGNSYVS WFAFWGQGTL VTVSS
```

Аминокислотная последовательность hVH-8L (SEQ ID NO: 55):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR
IRNKYNNYAT EYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNEFGNSYVS WFAFWGQGTL VTVSS
```

hVH-6L и hVH-8L тяжелых цепей были, кроме того, модифицированы для получения вариантов, содержащих модификацию в виде замены на аспарагин в положении 52а (S52аN). Аминокислотные последовательности этих модифицированных переменных областей тяжелых цепей и соответствующие полинуклеотидные последовательности, кодирующие их, представлены ниже:

Аминокислотная последовательность hVH-6M (SEQ ID NO: 72):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNEFGNSYVS WFAFWGQGTL VTVSS
```

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи hVH-6M (SEQ ID NO: 73):

```
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggagggtc
cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgccta
tgaattgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggttggaaagg
atcaggtcca agtacaacaа ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa
ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc
aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca
ggggacactg gtgactgtgt cttcc
```

Аминокислотная последовательность hVH-8M (SEQ ID NO: 74):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
 IRNKYNNYAT EYAASVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

Полинуклеотидная последовательность, кодирующая  
 переменную область тяжелой цепи hVH-8M (SEQ ID NO: 75):

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc ctggagggtc  
 cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta  
 tgaattgggt ccgccaggct ccagggaagg ggctggagtg ggttgcaagg  
 atcaggaaca agtacaaca ttatgcaacc gagtatgccg actctgtgaa  
 ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca ctgtatctgc  
 aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga  
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca  
 ggggacactg gtgactgtgt cttcc

hVH-8 di-1 и hVH-8 di-2 тяжелых цепей являются особенно предпочтительными для получения антител, которые являются менее иммуногенными, чем антитела, в состав которых входят hVH-1, hVH-2, hVH-3, hVH-4, hVH-5, hVH-6, hVH-7 или hVH-8 таблицы 2. Такие «деиммунизированные» антитела будут предпочтительно состоять из или hVH-8 di-1 тяжелой цепи, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи в комбинации с любой из VL-1 легкой цепи h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. Особенно предпочтительное «деиммунизированное» антитело будет состоять из hVH-8 di-1 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2.

Аминокислотная последовательность hXR32VH-8 di-1 (SEQ ID NO: 56):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
 TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR  
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

Аминокислотная последовательность hXR32VH-8 di-2 (SEQ ID NO: 57):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
 TRSKANSYTT YYAASVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCAR  
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTLL VTVSS

Такие «деиммунизированные» антитела будут предпочтительно

состоять из или hVH-8 di-1 тяжелой цепи, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи в комбинации с любой из VL-1 легкой цепи h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. Особенно предпочтительное «деиммунизированное» антитело будет состоять из hVH-8 di-1 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2, или hVH-8 di-2 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи h-mAb2.

Были также созданы дополнительные гуманизированные варианты вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 7). Аминокислотные последовательности таких вариантов представлены ниже, при этом изменения по сравнению с SEQ ID NO: 7 начертаны полужирно и подчеркнуты.

Аминокислотная последовательность варианта «а» (I51T Y52CA) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 76):

EVKLLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGGLEWVAR  
**TASKANNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR  
 HGNFNGNSYVS WFAYWGGTTL VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «b» (I51T N54S) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 77):

EVKLLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGGLEWVAR  
**TRSKYNSYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR  
 HGNFNGNSYVS WFAYWGGTTL VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «с» (I51T A56T) вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 78):

EVKLLLESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGGLEWVAR  
**TRSKYNNYT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYYCVR  
 HGNFNGNSYVS WFAYWGGTTL VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «d» (I51T Y52CA N54S) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 79):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TRSK**A****N****S**YAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN~~N~~LKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT~~L~~ VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «e» (I51T N54S A56T) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 80):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TRSKY**N****S****Y****T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN~~N~~LKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT~~L~~ VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «f» (I51T Y52cA N54S A56T) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 81):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TRSK**A****N****S****Y****T** YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN~~N~~LKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT~~L~~ VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «g» (I51T D61A) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 82):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TRSKY**N****N****Y****A**T YYA**A**SVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN~~N~~LKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT~~L~~ VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «h» (I51T D65G) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 83):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TRSKY**N****N****Y****A**T YYADSVK**G**RF TISRDDSQSI LYLQMN~~N~~LKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT~~L~~ VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «i» (I51T Y52cA N54S D61A) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышиноного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 84):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TRSK**A****N****S**YAT YYA**A**SVKDRF TISRDDSQSI LYLQMN~~N~~LKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT~~L~~ VTVSA**

Аминокислотная последовательность варианта «j» (I51T Y52cA N54S D65G) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи

мышинного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 85):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TR**SK**AN**S**Y**AT YYADSVK**G**RF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT**L** VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта «k» (I51T Y52cA N54S D61A D65G) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 86):

EVKLLES~~G~~GG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
**TR**SK**AN**S**Y**AT YYA**A**SVK**G**RF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMY~~Y~~CVR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT**L** VTVSA

Аминокислотная последовательность варианта «2k» (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-A49G V93A)) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 87):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTF**N** TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
**TR**SK**AN**S**Y**TT YYA**A**SVK**G**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAV~~Y~~YCAR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT**L** VTVSS

Аминокислотная последовательность варианта «5k» (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) гуманизированной вариабельной области тяжелой цепи мышинного моноклонального антитела mAb2 (SEQ ID NO: 88):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTF**N** TYAMNWVRQA PGKGLEWV**AR**  
**TR**SK**AN**S**Y**TT YYA**A**SVK**G**RF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAV~~Y~~YCAR  
 HGNFNGNSYVS WFA~~Y~~WGQGT**L** VTVSS

Все такие дополнительные гуманизированные варианты вариабельной области тяжелой цепи мышинного моноклонального антитела mAb2 могут использоваться для образования «деиммунизированных» антител по настоящему изобретению. В состав таких дополнительных «деиммунизированных» и гуманизированных антител будет предпочтительно входить вариабельная область тяжелой цепи: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, 2k или 5k, в комбинации с любой из вариабельных областей легких цепей: VL-1 h-mAb2, VL-2 h-mAb2, VL-3 h-mAb2, VL-4 h-mAb2, VL-5 h-mAb2, VL-6 h-mAb2, VL-7 h-mAb2, VL-8 h-mAb2, VL-9 h-mAb2 или VL-10 h-mAb2. В состав особенно предпочтительного



«деиммунизированного» антитела будет входить переменная область тяжелой цепи 2k или 5k и переменная область легкой цепи VL-6 h-mAb2, или переменная область тяжелой цепи hVH-8M8L di-2 и переменная область легкой цепи VL-6 h-mAb2. Варианты 2k и 5k связываются с белком А в переменной области, что тем самым облегчает очистку молекул (таких как диатела), в которых могут отсутствовать Fc-области или другие домены, которые могут использоваться для отделения таких молекул от других молекул. Варианты hVH-8M, hVH-8L, hVH-6M и hVH-6L проявляют уменьшенную иммуногенность по сравнению с соответствующими родительскими полипептидами.

Настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к «деиммунизированным» и гуманизированным антителам, в состав которых входят hVH-8 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи. Настоящее изобретение, кроме того, имеет отношение к «деиммунизированным» и гуманизированным антителам, в состав которых входят hVH-4 тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи. Кроме того, настоящее изобретение, в частности, имеет отношение к «деиммунизированным» и гуманизированным антителам, в состав которых входят hVH-2k тяжелой цепи и VL-6 легкой цепи.

#### **Пример 6**

##### **Анализ связывающих свойств вариантов легкой и тяжелой цепей химерного и гуманизированного mAb2**

Для оценки способности химерного и гуманизированного mAb2 к связыванию с нечеловеческим CD3 был выполнен ELISA с захватом. Планшеты покрывали 1 мкл/мл экстраклеточного домена CD3 (растворимого CD3) (или человека, или яванского макака) и инкубировали в присутствии различных концентраций антитела. Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 8А и 8В и показывают, что mAb2 и его гуманизированный вариант продемонстрировали равное связывание с растворимым CD3 человека и с растворимым CD3 яванского макака.

#### **Пример 7**

##### **Количественный анализ связывания mAb2 с CD3 человека и CD3 яванского макака**

Для определения степени связывания между mAb2 и CD3

человека или яванского макака были выполнены анализы VIACORE™. В анализах VIACORE™ определяется скорость диссоциации,  $k_d$ . Аффинность ( $K_D$ ) антитела к его мишени зависит от кинетических констант ассоциации (скорости ассоциации,  $k_a$ ) и диссоциации (скорости диссоциации,  $k_d$ ) в соответствии с уравнением  $K_D = k_d/k_a$ . В анализах VIACORE™ используется поверхностный плазмонный резонанс для прямого определения этих кинетических параметров. Антитело против CD3 mAb2 (6,3–100 нМ) подвергали иммобилизации на подложке, используя антитела против ЕК, и инкубировали в присутствии растворимого CD3 человека (shCD3) или растворимого CD3 яванского макака (scCD3). Определяли динамику диссоциации, и выполняли приближение данных к двухвалентной природе антител. Результаты анализов VIACORE™ представлены на фиг. 9А–9D. Относящиеся к кинетике данные суммированы в таблице 3.

Таблица 3			
shCD3			
Антитело	$k_a$	$k_d$	$K_D$
ch-mAb2	$1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$2.5 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	14.7 нМ
h-mAb2	$1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$3.8 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	20.0 нМ
scCD3			
Антитело	$k_a$	$k_d$	$K_D$
ch-mAb2	$1.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$2.3 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	14.4 нМ
h-mAb2	$1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ сек}^{-1}$	$4.1 \times 10^{-3} \text{ сек}^{-1}$	24.1 нМ

### Пример 8

Относящиеся к биспецифическому связыванию данные для диател DART™, содержащих CDR h-mAb2

CDR гуманизированного mAb2 (h-mAb2) использовали для создания ряда диател DART™, содержащих первый эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с CD3, и второй эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с Her2/neu (диатело DART™ «Her2-h-mAb2»), или с CD19 (диатело DART™ «CD19-h-mAb2»), или с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) (диатело DART™ «ERBITUX™-h-mAb2»).

### Диатело DART™ Her2/neu-h-mAb2

Аминокислотная последовательность hXR32VL-Her-2VH-E-спираль диатела DART™ Her2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью Her2VH и

между последовательностью Her2VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 58):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
GGGTKLTVLG GGSGGGGQV QLQQSGPELV KPGASLKLSC TASGFNIKDT  
YIHWVKQRPE QGLEWIGRIY PTNGYTRYDP KFDKATITA DTSSNTAYLQ  
VSRLTSEDTA VYYCSRWGGD GFYAMDYWGQ GASVTVSSGG CGGGKVAALK  
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

Аминокислотная последовательность Her2VL-hXR32VH-K-спираль диатела DART™ Her2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью Her2VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 59):

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS  
ASFRYTGVPD RFTGNRSGTD FTFTISSVQA ADLAVYYCQQ HYTTPPTFGG  
GTKLEIKRAG GGSGGGGEVQ LVESSGGLVQ PGGSLRLSCA ASGFTFNTYA  
MNWVRQAPGK GLEWVARIRS KYNNYATYYA DSVKDRFTIS RDDSKNSLYL  
QMNSLKTEDT AVYYCVRHGN FGNSYVSWFA YWGQGTLLTV SSGGCGGGEV  
AALEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEK

#### Диатело DART™ CD19-h-mAb2

Аминокислотная последовательность CD19VL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ CD19-h-mAb2 (линкеры между последовательностью CD19VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 60):

DIQLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD YDGDSYLNWY QQIPGQPPKL  
LIYDASNLVS GIPPREFSGS SGTDFTLNIH PVEKVDAATY HCQQSTEDPW  
TFGGGTKLEI KGGSGGGGGE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFNT  
YAMNWRQAP GKGLEWVARI RSKYNNYATY YADSVKDRFT ISRDDSKNSL  
YLQMNSLKTE DTAVYYCVRH GNFGNSYVSW FAYWGQGTLLV TVSSGGCGGG  
EVALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEK

Аминокислотная последовательность hXR32VL-CD19VH-K-спираль диатела DART™ CD19-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью CD19VH и между последовательностью CD19VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 61):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQOSGAELV RPGSSVKISC KASGYAFSSY  
 WMNVVKQRPQ QGLEWIGQIW PGDGDNTYNG KFKGKATLTA DESSTAYMQ  
 LSSLASEDSA VYFCARRETT TVGRYYYAMD YWGQGTTVTV SSGGCGGGKV  
 AALKEKVAAL KEKVAALKEK VAALKE

**Диатело DART™ ERBITUX™-h-mAb2**

Аминокислотная последовательность hXR32VL-EGFRVH-E-спираль диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью EGFRVH и между последовательностью EGFRVH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 62):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLKQSGPGLV QPSQSLSITC TVSGFSLTNY  
 GVHWVRQSPG KGLEWLGVIW SGGNTDYNTF FTSRLSINKD NSKSQVFFKM  
 NSLQSNDAI YYCARALTY YEFAYWGQG TLVTVSSGGC GGGEVAALEK  
 EVAALEKEVA ALEKEVAALE K

Аминокислотная последовательность EGFRVL-hXR32VH-K-спираль диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2 (линкеры между последовательностью EGFRVL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 63):

DILLTQSPVI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TNIHWYQORT NGSPRLLIKY  
 ASESISGIPS RFSGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ NNNWPTTFGA  
 GTKLELKGGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN  
 WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM  
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTTLVTVSS GGCGGGKVAA  
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Было установлено, что такие диатела DART™ способны к связыванию с CD3 яванского макака (фиг. 10A-10C).

CDR гуманизированного mAb2 (h-mAb2) использовали для создания ряда диател DART™, содержащих первый эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с CD3, и второй эпитопсвязывающий сайт, способный к связыванию с B7-H3 (диатело DART™ «B7-H3-1-h-mAb2» и «B7-H3-2-h-mAb2»).

**Диатело DART™ B7-H3-1-h-mAb2**

Аминокислотная последовательность hBRCA69DVL-hXR32VH-E-

спираль диатела DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hBRCA69DVL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 64):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY  
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG  
 GTKLEIKGGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFNTYAM  
 NWVRQAPGKG LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ  
 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNE GNSYVSWFAY WGQGTTLVTVS SGGCGGGEVA  
 ALEKEVAALE KEVAALEKEV AALEK

Аминокислотная последовательность hXR32VL-hBRCA69DVH-K-спираль диатела DART™ B7-H3-1-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью hBRCA69DVH и между последовательностью hBRCA69DVH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 65):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY  
 WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME  
 LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTT<sup>TV</sup>TVSSGG CGGGKVAALK  
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

#### **Диатело DART™ B7-H3-2-h-mAb2**

Аминокислотная последовательность hBRCA84DVL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ B7-H3-2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hBRCA84DVL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 66):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVN TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
 ASYRYSRVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPFTFGQ  
 GTKLEIKGGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSLRLSCAA SGFTFNTYAM  
 NWVRQAPGKG LEWVARIRSK YNNYATYYAD SVKDRFTISR DDSKNSLYLQ  
 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNE GNSYVSWFAY WGQGTTLVTVS SGGCGGGEVA  
 ALEKEVAALE KEVAALEKEV AALEK

Аминокислотная последовательность hXR32VL-hBRCA84DVH-K-спираль диатела DART™ B7-H3-2-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью hBRCA84DVH и между последовательностью hBRCA84DVH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 67):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYIC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSSF  
 GMHWVRQAPG KGLEWVAYIS SDSSAIYYAD TVKGRFTISR DNAKNSLYLQ  
 MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTTVTVSS GGCGGGKVAA  
 LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Было установлено, что такие антитела DART™ способны к связыванию с растворимым CD3 яванского макака (фиг. 10D).

#### Пример 9

**Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении HER2/neu и CD3, опосредуют мощное перенаправленное, опосредуемое Т-клетками уничтожение**

Были приготовлены диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении HER2/neu и CD3. Такие диатела DART™ обладают способностью локализовать Т-клетку (в результате связывания такой Т-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего диатела DART™) в положении опухолевой клетки (в результате связывания такой раковой клетки с HER2/neu-связывающей частью диатела DART™). Локализованная Т-клетка может затем уничтожать опухолевую клетку в ходе процесса, называемого здесь «перенаправленным» уничтожением.

Было сконструировано диатело - перенаправляющий реагент с двумя аффинностями (DART™), специфический в отношении HER2/neu и CD3, содержащее способные к связыванию с HER2/neu переменные домены трастузумаба и способные к связыванию с CD3 переменные домены VH-8 h-mab2 и VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 58-59).

Для демонстрации способности диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения раковых клеток, описанное выше HER2/neu x CD3-биспецифическое диатело DART™ инкубировали в различных концентрациях с опухолевыми клетками-мишенями (опухолевыми клетками SKOV-3, опухолевыми клетками SKBR-3, опухолевыми клетками A549 и опухолевыми клетками MCF-7) и покоящимися РВМС-эффекторами (отношение Е:Т=30:1), и определяли цитотоксичность (анализ LDH). Результаты этих исследований свидетельствуют о способности HER2/neu x CD3-биспецифического

диатела DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток.

### **Пример 10**

#### **Терапия с использованием моноклонального антитела против TCR для пациентов с диабетом аутоиммунного генеза**

Пациенты: Сорок пациентов с диабетом типа 1 привлекают для участия в соответствии со следующими критериями: возраст между 7 и 20 лет, диагностирование в пределах 6 недель в соответствии с критериями Американской ассоциации диabetологов и подтверждение наличия аутоантител против GAD65, ICA512 и/или инсулина. Пациенты остаются под наблюдением их личных врачей в ходе исследования.

Подходящих для участия в исследовании пациентов случайным образом зачисляют в контрольную группу и группу лечения гуманизированным антителом против CD3 (N297Q) (включающим VN-8 h-mab2 и VL-6 h-mab2). После рандомизации отбирают образцы крови для установления исходных уровней HА1с, устанавливают ответ в виде увеличения С-пептида до лечения в ММТТ, и выполняют FPIR до лечения в IGTТ. Пациентов обеих групп госпитализируют для получения ими или 6-дневного курса лечения гуманизированным моноклональным антителом против CD3 (N297Q), или плацебо. Антитело вводят внутривенно в следующей дозе: 17 мкг/м<sup>2</sup> в день 1, 34,3 мкг/м<sup>2</sup> в день 2, 69 мкг/м<sup>2</sup> в день 3, 137,6 мкг/м<sup>2</sup> в день 4 и 275,3 мкг/м<sup>2</sup> в дни 5 и 6. Альтернативно, антитело может внутривенно вводиться в следующей дозе: 1,6 мкг/кг/день в день 1; 3,2 мкг/кг/день в день 2; 6,5 мкг/кг/день в день 3; 13 мкг/кг/день в день 4 и 26 мкг/кг/день в дни 5-14. В исследованиях с использованием увеличения дозы лечение может представлять собой, например, 1,42 мкг/кг/день в день 1; 5,7 мкг/кг/день в день 2; 11 мкг/кг/день в день 3; 26 мкг/кг/день в день 4 и 45,4 мкг/кг/день в дни 5-14. В последующих исследованиях терапию меняют с увеличением дозы и/или с уменьшением периода времени лечения. Например, в последующих исследованиях пациентам может назначаться 4-дневное лечение: 6,4 мкг/кг/день в день 1; 13 мкг/кг/день в день 2 и 26 мкг/кг/день в дни 3 и 4; во время дополнительных исследований с

использованием увеличения дозы лечение может представлять собой 8 мкг/кг/день в день 1; 16 мкг/кг/день в день 2 и 32 мкг/кг/день в дни 3 и 4.

Во время первоначальных исследований дозу антитела в первые три дня лечения вводят с помощью медленной внутривенной инфузии в течение 20 часов для слежения за неблагоприятными реакциями. В последующих исследованиях время введения будут уменьшать, и/или дозу будут разбивать на 2-4 равных части, которые будут вводить в виде болюсных инъекций, равномерно распределенных в течение периода, составляющего 12 часов. Пациенты контрольной группы подвергаются метаболическим и иммунологическим исследованиям, но не получают моноклональные антитела. На протяжении всего исследования осуществляют контроль в отношении иммуносупрессорных эффектов моноклонального антитела против CD3 (N297Q) у пациентов.

За пациентами следят в течение 18 месяцев после лечения. Функционирование  $\beta$ -клеток определяют каждые 6 месяцев в случае уменьшенной толерантности к глюкозе и каждые 12 месяцев в случае нормальной толерантности к глюкозе. Пациентам разрешают соблюдать нормальный режим питания, и они остаются под наблюдением их личных врачей на протяжении всего исследования. Иммунологические анализы повторяют с интервалами в 6 месяцев. Пациенты будут получать терапию с использованием инсулина, как предписано их личными врачами.

Функционирование  $\beta$ -клеток будут анализировать в соответствии с изменениями уровней С-пептида, определяемых с помощью радиоиммуноанализа. После отбора образцов для установления исходных уровней С-пептида и глюкозы пациентам дают смешанную пищу. Уровни С-пептида определяют в образцах, отобранных через 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 и 240 мин. Ответ в виде увеличения С-пептида в тесте толерантности к смешанной пище (ММТТ) представляют в виде общей площади под кривой ответа (AUC). Считается, что изменение ответа произошло, если ответ отличается на более чем 7,5 процентов от ответа при вхождении в исследование. Ответы в виде увеличения С-пептида у



пациентов в ММТТ постоянно проверяют через 6 месяцев, 9 месяцев, 12 месяцев, 15 месяцев и 18 месяцев после лечения. Альтернативно, функционирование  $\beta$ -клеток оценивают с использованием FPIR (выброса инсулина на первой фазе) в IGTT. Уровни инсулина в сыворотке определяют с использованием модификации способа радиоиммуноанализа с использованием двух антител, используя моноиодированный тирозин A14-меченный инсулин (Amersham Pharmacia). FPIR рассчитывают как сумму уровней инсулина через 1 и 3 минуты после введения глюкозы (0,5 г/кг). Уровни гликозилированного гемоглобина определяют с помощью исследования ингибирования латекс-агглютинации.

Иммунологическая проверка: Уровень аутоантител против GAD65, IA2/ICA512 и инсулина определяют с помощью анализов радиосвязывания, известных в данной области техники (например, Woo et al., 2000, J. Immunol Methods 244: 91-103). Генотипирование HLA-DQA и HLA-DQB выполняют с помощью прямого секвенирования полиморфизмов экзона 2 после амплификации с помощью ПЦР. Уровень цитокинов в сыворотке после введения моноклонального антитела определяют с помощью иммуноферментного твердофазного анализа (ELISA). Продукцию антиидиотипических антител проверяют с помощью анализа ELISA, используя связанное с планшетом антитела против CD3 (N297Q), или с помощью проточной цитометрии для определения блокирования связывания анти-CD3-FITC с CD3-цепью TCR.

Статистический анализ: Будут проводиться анализы данных, касающихся остаточной функции бета-клеток, уровня аутоантител, уровня цитокинов и уровня гликозилированного гемоглобина.  $\chi^2$  анализ будут проводить для проверки эффекта лечения лекарственным средством до и после введения лекарственного средства. Сравнение между контрольной группой и группой лечения будут осуществлять с помощью U-критерия Манна-Уитни.

#### **Пример 11**

**Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении V $\beta$ H3 и CD3, опосредуют мощное перенаправленное, опосредуемое T-клетками уничтожение**

Были приготовлены диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении В7Н3 и CD3. В7Н3 был иммуногистологически обнаружен в линиях опухолевых клеток (Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production," *Nature Immunol.* 2: 269-274; Saatian, B. et al. (2004) "Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation," *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287: L217-L225; Castriconi et al. (2004) "Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34): 12640-12645); Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," *J. Immunol.* 168: 6294-6297). Несколько независимых исследований показали, что злокачественные опухолевые клетки человека демонстрируют явное увеличение экспрессии белка В7-Н3, и что эта увеличенная экспрессия связана с увеличением тяжести заболевания (Zang, X. et al. (2007) "The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition," *Clin. Cancer Res.* 13: 5271-5279), что наводит на мысль о том, что В7-Н3 используется опухолями в качестве пути ускользания от иммунной системы (Hofmeyer, K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30): 10277-10278).

CD3-связывающая часть таких антител DART™ состояла из описанных выше переменных областей легкой и тяжелой цепи гуманизированного mAb2 против CD3 (VH-8 h-mAb2 и VL-6 h-mAb2). В7Н3-связывающая часть таких антител DART™ состояла из легкой цепи hBRCA84D-2 и тяжелой цепи hBRCA84D-2 (SEQ ID NO: 64-65).

Такие диатела DART™ обладают способностью локализовать Т-клетку (в результате связывания такой Т-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего диатела DART™) в положении опухолевой клетки (в результате связывания такой раковой клетки с В7Н3-связывающей частью диатела DART™). Локализованная Т-клетка может затем опосредовать уничтожение опухолевой клетки в ходе процесса «перенаправленного» уничтожения.

Для демонстрации способности таких диател DART™ к опосредованию такого перенаправленного уничтожения раковых клеток диатело DART™ инкубировали в различных концентрациях с опухолевыми клетками-мишенями (опухолевыми клетками A498, опухолевыми клетками RECA905021E) и покоящимися РВМС-эффекторами (отношение Е:Т=30: 1), и определяли цитотоксичность (анализ LDH). Диатело DART™ (4420-h-mAb2), обладающее двумя специфичностями к CD3 (h-mAb2) и флуоресцеину (антитело 4420), использовали в качестве контроля.

#### **Диатело DART™ 4420-h-mAb2**

Аминокислотная последовательность 4420VL-hXR32VH-E-спираль диатела DART™ 4420-h-mAb2 (линкеры между последовательностью 4420VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 68):

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK  
 VLIYKVSNRG SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP  
 WTFGGGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFN  
 TYAMNWRQA PGKGLEWVAR IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS  
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNGFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSSGGCGG  
GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALKE

Аминокислотная последовательность hXR32VL-4420VH-K-спираль диатела DART™ 4420-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью 4420VH и между последовательностью 4420VH и последовательностью K-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 69):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV KLDETGGGLV QPGRPMKLSC VASGFTFSDY  
 WMNWRQSPK KGLEWVAQIR NKPYNYETYY SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY  
 LQMNNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCGG GGKVAALKEK  
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Результаты этих исследований (фиг. 11А-11В) указывают на способность В7Н3 х CD3-биспецифического диатела DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих В7Н3.

#### **Пример 12**

**Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении А33 и CD3, опосредуют мощное перенаправленное, опосредуемое Т-клетками уничтожение**

Были приготовлены диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении А33 и CD3 (диатело DART™ «А33-h-mAb2»). А33 является мембранным антигеном, который экспрессируется в нормальном эпителии толстой кишки и тонкой кишки человека и в >95% раков толстой кишки человека (Heath, J.K. et al. (1997) "The Human А33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 94: 469-474).

Такие диатела DART™ обладают способностью локализовать Т-клетку (в результате связывания такой Т-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего диатела DART™) в положении опухолевой клетки (в результате связывания такой раковой клетки с А33-связывающей частью диатела DART™). Локализованная Т-клетка может затем опосредовать уничтожение опухолевой клетки в ходе процесса «перенаправленного» уничтожения.

CD3-связывающая часть таких диател DART™ состояла из описанных выше переменных областей легкой и тяжелой цепей гуманизированного mAb2 (VH-8 h-mAb2 и VL-6 h-mAb2). А33-связывающая часть таких диател DART™ состояла из антитела RECA47.

#### **Диатело DART™ А33-h-mAb2**

Аминокислотная последовательность RECA47VL-hXR32VH-К-спираль диатела DART™ А33-h-mAb2 (линкеры между последовательностью RECA47VL и последовательностью hXR32VH и между последовательностью hXR32VH и последовательностью К-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 70):

```

QIVLTQSPAI MSASPGERV MTCSARSSIS FMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
SNLASGVPVR FSGSGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYCQQW SSYPLTFGSG
TKLELKRGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFNTYAMN
WVRQAPGKGL EWVARIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHGNEF NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGKVAA
LKEKVAALKE KVAALKEKVA ALKE

```

Аминокислотная последовательность hXR32VL-RECA47VH-E-спираль диатела DART™ A33-h-mAb2 (линкеры между последовательностью hXR32VL и последовательностью RECA47VH и между последовательностью RECA47VH и последовательностью E-спирали подчеркнуты) (SEQ ID NO: 71):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQOSGPELV KPGASVKISC KASGYTFSGS  
WMNWVKQRPQ QGLEWIGRIY PGDGETNYNG KFKDKATLTA DKSSTTAYME  
LSSLTSVDSA VYFCARIYGN NVYFDVWGAG TTVTSSGGC GGGEVAALEK  
EVAALEKEVA ALEKEVAALE K

Для демонстрации способности таких диател DART™ к опосредованию такого перенаправленного уничтожения раковых клеток, диатело DART™ инкубировали в различных концентрациях с опухолевыми клетками-мишенями (опухолевыми клетками Colo205, опухолевыми клетками RECA905021E) и покоящимися РВМС-эффекторами (отношение E:T=30:1), и определяли цитотоксичность (анализ LDH). Результаты этих исследований (фиг. 12A-12E) свидетельствуют о способности A33 x CD3-биспецифических диател DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения опухолевых клеток, экспрессирующих A33.

### Пример 13

**Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™), специфические в отношении CD3, приводят к перенаправленному, опосредуемому Т-клетками уничтожению, эквивалентному таковому в случае других специфических в отношении CD3 человека диател**

Для дальнейшей оценки диател - перенаправляющих реагентов с двумя аффинностями (DART™), специфических в отношении CD3, по настоящему изобретению, способность описанного выше диатела DART™ CD19-h-mAb2 к вызову перенаправленного, опосредуемого Т-клетками уничтожения сравнивали с таковой CD19 x CD3-биспецифического диатела DART Moore, P.A. и др. (2011) ("Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," Blood 117(17): 4542-4551). Диатело DART™ CD19-h-mAb2 проявляет

специфичность в отношении CD3 человека, а также нечеловеческого CD3; CD19 x CD3-биспецифическое диатело DART Moore, P.A. и др. (2011) проявляет специфичность в отношении только CD3 человека.

Соответственно, клетки В-клеточной лимфомы человека Raji (смотрите Drexler, H.G. et al. (1998) "History And Classification Of Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines," Leuk. Lymphoma 31(3-4): 305-316; Arndt, R. (1984) "Demonstration Of C3-Binding Circulating Immune Complexes Using Raji, Conglutinin And Anti-C3 Assays - A Critical Review," Immun. Infekt. 12(1): 3-11) или клетки лимфомы из клеток ткани человека JeKo-1 (Salaverria, I. et al. (2006) "Mantle Cell Lymphoma: From Pathology And Molecular Pathogenesis To New Therapeutic Perspectives," Haematologica 91: 11-16; Jeon, H.J. et al. (1998) "Establishment And Characterization Of A Mantle Cell Lymphoma Cell Line," Br. J. Haematol. 102(5): 1323-1326) инкубировали в присутствии диатела DART™ и покоящихся мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) (E:T=30:1). Результаты этого эксперимента (фиг. 13А и 13В) показывают, что диатело DART™ CD19-h-mAb2 по настоящему изобретению приводит к перенаправленному, опосредуемому Т-клетками уничтожению, которое эквивалентно таковому, отмечаемому при использовании CD19 x CD3-биспецифического диатела DART, специфического в отношении CD3 человека. Таким образом, расширение специфичности в отношении нечеловеческих гомологов CD3 не уменьшало способность диатела DART™ к опосредованию перенаправленного уничтожения.

#### **Пример 14**

**Перенаправленный цитолиз с помощью диател - перенаправляющих реагентов с двумя аффинностями (DART™), специфических в отношении CD3, обладающих перекрестной реактивностью с CD3 яванского макака**

Была исследована способность описанного выше диатела DART™ CD19-h-mAb2 DART™ к вызову перенаправленного, опосредуемого Т-клетками уничтожения в присутствии Т-клеток или человека, или яванского макака.

Клетки рака толстой кишки человека HT-29 (Marchis-Mouren,

G. et al. (1988) "HT 29, A Model Cell Line: Stimulation By The Vasoactive Intestinal Peptide (VIP); VIP Receptor Structure And Metabolism," Biochimie 70(5): 663-671; Fogh, J. et al. (1975) In: J. Fogh (ed.), HUMAN TUMOR CELLS IN VITRO, New York: Plenum Press. 1975) инкубировали в присутствии Т-клеток человека или яванского макака (отношение Е:Т=30:1) и или описанного выше диатела DART™ CD19-h-mAb2, или CD19 х CD3-биспецифического диатела DART, CD3-связывающие последовательности которого происходят из антитела FN-18. Антитело FN-18 проявляет специфичность в отношении только CD3 яванского макака (Nooij, F.J. et al. (1986) "Differentiation Antigens On Rhesus Monkey Lymphocytes. I. Identification Of T Cells Bearing CD3 And CD8, And Of A Subset Of CD8-Bearing Cells," Eur. J. Immunol. 16(8): 975-979; Meng, G. et al. (1998) "The Effect Of Anti-CD3-Immunotoxin On T Lymphocyte Function in vitro," Transpl. Immunol. 6(1): 53-59). Определяли результирующей процент цитотоксичности в зависимости от концентрации диател. Результаты (фиг. 14А и 14В) показывают, что диатело DART™ CD19-h-mAb2 способно к опосредованию цитолиза в присутствии Т-клеток-эффекторов или человека, или яванского макака. В отличие от этого, диатело FN-18 было способно к опосредованию цитолиза только в присутствии Т-клеток яванского макака.

#### **Пример 15**

**Диатела - перенаправляющие реагенты с двумя аффинностями (DART™) нуждаются во вхождение в контакт с клетками-мишенями**

Для демонстрации того, что наблюдаемое перенаправленное уничтожение, опосредуемое CD3-специфическим диателом DART™ по настоящему изобретению, было специфическим, определяли степень уничтожения в присутствии и в отсутствие клеток-мишеней.

PMBC человека инкубировали в присутствии описанного выше диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2, (ERBITUX™-Т-клеточный рецептор)-биспецифического диатела DART™ (способного к связыванию с EGFR (рецептором эпидермального фактора роста) и Т-клеточным рецептором) или диатела DART™ ERBITUX™-CD3 FN18 (способного к связыванию с EGFR и с CD3 яванского макака). Инкубации проводили в присутствии или в отсутствие клеток рака

почки A498-мишеней (Giard, D.J. et al. (1973) "In vitro Cultivation Of Human Tumors: Establishment Of Cell Lines Derived From A Series Of Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 51: 1417-1423; Fogh, J. (1978) "Cultivation, Characterization, And Identification Of Human Tumor Cells With Emphasis On Kidney, Testis And Bladder Tumors," Natl. Cancer Inst. Monogr. 49: 5-9).

Гликопротеин CD69 является ранним антигеном активации Т- и В-лимфоцитов, представленным на клетках большинства гемопоэтических линий, включая нейтрофилы, после стимуляции (Atzenia, F. et al. (2002) "Induction Of CD69 Activation Molecule On Human Neutrophils by GM-CSF, IFN- $\gamma$ , and IFN- $\alpha$ ," Cellular Immunol. 220(1): 20-29). По этой причине в качестве способа оценки активации иммунной системы определяли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) CD69 (в зависимости от концентрации диател) (смотрите, например, Ampel, N.M. et al. (2002) "In Vitro Whole-Blood Analysis of Cellular Immunity in Patients with Active Coccidioidomycosis by Using the Antigen Preparation T27K," Clinical Diagnostic Laboratory Immunology 9(5): 1039-1043).

Результаты (фиг. 15А и 15В) показывают, что активация иммунной системы (определяемая по MFI CD69) увеличивалась, только когда CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> Т-клетки инкубировали с диателом DART<sup>™</sup> ERBITUX<sup>™</sup>-h-mAb2 по настоящему изобретению или (ERBITUX<sup>™</sup>-Т-клеточный рецептор)-биспецифическим диателом DART<sup>™</sup> (способным к связыванию с EGFR и с Т-клеточным рецептором). Диатело DART<sup>™</sup> ERBITUX<sup>™</sup>-CD3 FN18 (способное к связыванию с EGFR и с CD3 яванского макака) не вызывало увеличение MFI CD69.

#### **Пример 16**

**Перенаправленное уничтожение с помощью гуманизованных, обладающих реактивностью с CD3 яванского макака/человека диател DART<sup>™</sup>**

Для дальнейшей демонстрации способности диател DART<sup>™</sup> по настоящему изобретению к опосредованию перенаправленного уничтожения использовали клетки рака почки A498-мишени или



клетки плоскоклеточного рака A431 (Lee, C.M. et al. (2010) "The Distribution Of The Therapeutic Monoclonal Antibodies Cetuximab And Trastuzumab Within Solid Tumors" BMC Cancer 10: 255; pages 1-11; Bryant, J.A. et al. (2004) "EGF Activates Intracellular And Intercellular Calcium Signaling By Distinct Pathways In Tumor Cells," Cancer Biol. Ther. 3(12): 1243-1249) и определяли степень перенаправленного уничтожения, опосредуемого различными диателами DART™, в присутствии клеток РМВС-эффекторов (Е:Т=30:1).

Клетки инкубировали в присутствии или диатела DART™ ERBITUX™-h-mAb2, диатела DART™ ERBITUX™-m-mAb2 или диатела DART™ 4420-h-mAb2 (в качестве отрицательно контроля) или контрольного второго антитела. Связывание с клетками-мишенями определяли с помощью измерения MFI. Перенаправленное уничтожение определяли посредством измерения % цитотоксичности.

Результаты этого исследования представлены на фиг. 16А-16D. Было установлено, что диатела, обладающие специфичностью в отношении CD3 и EGFR, способны к связыванию с клетками A498 или A431 (фиг. 16А и 16С, соответственно) и к опосредованию перенаправленного уничтожения этих клеток (фиг. 16В и 16D, соответственно).

Все публикации и патенты, упомянутые в этом описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы было специально и отдельно указано, что каждая отдельная публикация или заявка на патент включена посредством ссылки в ее полном объеме. Хотя настоящее изобретение было описано применительно к конкретным вариантам его осуществления, будет понятно, что возможны дальнейшие модификации, и что эта заявка, как предполагается, охватывает любые вариации, применения или адаптации настоящего изобретения, следующие, в общем, принципам настоящего изобретения и включающие такие отклонения от описания настоящего изобретения, которые подпадают под известную или обычную практику в области техники, к которой относится настоящее изобретение, и которые могут быть применимы к существенным признаком, изложенным выше.

SEQUENCE LISTING

<110> MacroGenics, Inc.  
Huang, Ling  
Johnson, Leslie

<120> CD3-Binding Molecules Capable of Binding to Human and Non-Human  
CD3

<130> 1301.0075I

<150> US 61/488,716  
<151> 2011-05-21

<150> US 61/530,353  
<151> 2011-09-01

<160> 88

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 1

Gln	Val	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Phe	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met
			20					25					30		
Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr
		35					40					45			
Asp	Ser	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser
	50					55					60				
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Met	Glu	Thr	Glu
65					70					75					80
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Arg	Asn	Pro	Pro	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Gln	Ile	Thr	Arg					
			100					105							

<210> 2  
<211> 321  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 2  
caggtggtgc tgaccagtc ccccgccatc atgtccgct tccccggcga gaaagtgaca 60  
atgacctgct cgcctcctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagtccggc 120

acctccccc a gcggtggat ctacgaactcc tccaagctgg cctccggcgt gcccgccaga 180  
 ttctctgggt ccggtcccg caccagctac tcctgacca tctctccat ggaaaccgag 240  
 gacgccgcca cctactactg ccagcagtg tcccgggaacc ccctacctt cggcggaggc 300  
 accaagctgc agatcaccag a 321

<210> 3  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 4  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 4

caggtgcagc tgcagcagtc tggcgccgag ctggccagac ctggcgctc cgtgaagatg 60  
 tctgcaagg cctccggcta caccttcacc cgtccacca tgcaactgggt gaaacagcgg 120  
 cctggacagg gcctggaatg gatcggctac atcaaccct ccagcgccta caccaactac 180  
 aaccagaagt tcaaggacaa ggccaccctg accgcccaca agtcctccag caccgcctac 240  
 atgcagctgt cctccctgac ctccgaggac tccgcccgtgt actactgcgc ctccccccag 300  
 gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360  
 tcc 363

<210> 5  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 5

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 6  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 6

caggccgtgg tgacacagga gtcagctctg accacatccc caggcgaaac agtgactctg 60  
 acctgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact acgctaattg ggtgcaggag 120  
 aagcccgacc acctgttcac tgggctgac ggcggaacca acaaaagggc acccggtgtg 180  
 cctgcccggg tttctggcag tctgatcgga gacaaggccg ctctgacaat tactggcgcc 240  
 cagacagagg atgaagctat ttacttctgt gcactgtggt atagcaatct gtgggtgttt 300  
 ggggggtggca ccaaactgac agtgetggga 330

<210> 7  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 7

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 8  
<211> 375  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 8  
gaggtgaagc tgctggaagc cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc actgaaactg 60  
tcctgcgccg cctccggctt cacctttaac acatacgcta tgaattgggt gcgacaggca 120  
cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180  
tactatgccg actctgtgaa ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt 240  
ctgtatctgc agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg 300  
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360  
gtgactgtgt cttcc 375

<210> 9  
<211> 218  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
1 5 10 15  
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
20 25 30  
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
35 40 45  
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
50 55 60  
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
65 70 75 80

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 85 90 95  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 100 105 110  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 115 120 125  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 130 135 140  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 145 150 155 160  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 165 170 175  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 180 185 190  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 195 200 205  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 210 215

<210> 10  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAbl Variable Light Chain  
 Variant 1

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 11  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light Chain Variant 1

<400> 11  
 gacatccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtccgcct ctgtgggcga cagagtgaca 60  
 atcacctggt ccgccagctc ctccgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagcccggc 120  
 aaggccccca agcggctgat ctacgactcc tccaagctgg cctccggcgt gccctccaga 180  
 ttctccggct ctggctccgg caccgagttc acctgacca tctccagcct gcagcccag 240  
 gacttcgcca cctactactg ccagcagtg tcccggaacc ccctacctt cggcggaggc 300  
 accaaggtgg aaatcaag 318

<210> 12  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb1 Variable Light Chain Variant 2 (mAb1 LC-2)

<400> 12  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 13  
 <211> 318  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light Chain Variant 1

<400> 13  
 gacgtggtga tgaccagtc tctgcatc atgagtgctt tcccaggcga gaaagtgacc 60  
 attacatgct ctgcttccag ctctgtgtcc tacatgaact ggtatcagca gaagccaggg 120  
 aaagcaccca agaggtggat ctacgaactcc tccaagctgg cctccggcgt gccaaagccgg 180  
 ttctctggta gtggctcagg aaccgagttt actctgacca tttccagcct gcagcctgaa 240  
 gatttcgcaa catactattg tcagcagtgg tccagaaatc ccctacatt tggcggaggg 300  
 actaaagtgg aaatcaag 318

<210> 14  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb1 Variable Heavy Chain

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser  
 20 25 30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 15  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light



Chain Chain

<400> 15  
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgcctc cgtgaaggtg 60  
tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc cgggccacca tgcaactgggt gcgacaggcc 120  
ccaggccagg gactggaatg gatcggctac atcaaccctt ccagcgccta caccaactac 180  
aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc accgccgaca agtccaccag caccgcctac 240  
atggaactgt ctagcctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc ctccccccag 300  
gtgcactacg actacaacgg cttcccctac tggggccagg gcaccctggt gacagtgtcc 360  
tcc 363

<210> 16  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 1  
(h-mAb2 VL-1)

<400> 16  
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30  
Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr  
35 40 45  
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60  
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80  
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95  
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 17  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
Chain Variant 1 (h-mAb2 VL-1)

<400> 17

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccagcag 120  
 aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc ggggtacaa acaaagggc tcctggacc 180  
 cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
 ggggtgtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 18  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 2  
 (h-mAb2 VL-2)

<400> 18

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
			20					25					30		
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Val	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Thr
		35					40					45			
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
				85					90					95	
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly		
			100					105					110		

<210> 19  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
 Chain Variant 2 (h-mAb2 VL-2)

<400> 19

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120  
 aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc ggggtacaa acaaagggc tcctggacc 180

cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
cagcccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 20  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 3  
(h-mAb2 VL-3)

<400> 20

Gln	Ala	Val	Val	Thr	Gln	Glu	Pro	Ser	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Thr	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser
			20					25						30	
Asn	Tyr	Ala	Asn	Trp	Phe	Gln	Glu	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Thr
		35					40					45			
Leu	Ile	Gly	Gly	Thr	Asn	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Thr	Pro	Ala	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Gly	Gly	Lys	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Thr	Gly	Ala
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn
				85					90					95	
Leu	Trp	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly		
			100					105					110		

<210> 21  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
Chain Variant 3 (h-mAb2 VL-3)

<400> 21

caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcgaac tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccaggag 120  
aagccaggac aggcaccaag gaccctgatc gggggtacaa aaaaagggc tccttgacc 180  
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
cagcccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300

gggggtggca caaaactgac tgtgctggga

330

<210> 22

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 4  
(h-mAb2 VL-4)

<400> 22

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 23

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
Chain Variant 4 (h-mAb2 VL-4)

<400> 23

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60

acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccagcag 120

aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggtacaa acaaagggc tcctggacc 180

cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240

caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300

gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 24

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 5  
(h-mAb2 VL-5)

<400> 24

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Thr  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 25

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
Chain Variant 5 (h-mAb2 VL-2)

<400> 25

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60

acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120

aagccaggac aggcaccaag gacctgatc ggggtatac aaaaagggc tcctggacc 180

cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc gaaaggccg ctctgactat taccggggca 240

caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300

gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 6  
(h-mAb2 VL-6)

<400> 26

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30  
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45  
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60  
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80  
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95  
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 27

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
Chain Variant 6 (h-mAb2 VL-6)

<400> 27

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120  
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggtatac acaaaagggc tccttgacc 180  
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 28

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 7  
(h-mAb2 VL-7)

<400> 28

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

<210> 29  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
 Chain Variant 7 (h-mAb2 VL-7)

<400> 29  
 caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg gttccaggag 120  
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc 180  
 cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
 ggggggtggc caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 30  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 8  
 (h-mAb2 VL-8)

<400> 30

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly

```

          35             40             45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
    50             55             60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
  65             70             75             80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
    85             90             95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
    100           105           110

```

```

<210> 31
<211> 330
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light
Chain Variant 8 (h-mAb2 VL-8)

```

```

<400> 31
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg        60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag        120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc gggggtacaa acaaaggggc tcctggacc        180
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca        240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc        300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga        330

```

```

<210> 32
<211> 110
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 9
(h-mAb2 VL-9)

```

```

<400> 32
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
  1             5             10             15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
    20             25             30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
    35             40             45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
    50             55             60

```



Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 33  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light  
Chain Variant 9 (h-mAb2 VL-9)

<400> 33  
caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcaggag 120  
aagccaggac aggcattcag gggcctgatc ggggtataca aaaaagggc tcctggacc 180  
cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggg atagcaatct gtgggtgttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 34  
<211> 110  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Chain Variant 10  
(h-mAb2 VL-10)

<400> 34

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105 110

<210> 35  
<211> 330  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Light Chain Variant 10 (h-mAb2 VL-10)

<400> 35  
caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcactgg agcagtgact acctctaact acgctaattg gttccagcag 120  
aagccccgacc acctgttcac tgggctgata ggcggaacca aaaaagggc tcctggacc 180  
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaagggccg ctctgactat taccggggca 240  
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga 330

<210> 36  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 1 (h-mAb2 VH-1)

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 37  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 1 (h-mAb2 VH-1)

<400> 37  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgcaaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 38  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 2 (h-mAb2 VH-2)

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 39  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 2 (h-mAb2 VH-2)

<400> 39  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatagcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgcaaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 40  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 3 (h-mAb2 VH-3)

<400> 40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 41  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 3 (h-mAb2 VH-3)

<400> 41  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgcaaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 42  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 4 (h-mAb2 VH-4)

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 43  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 4 (h-mAb2 VH-4)

<400> 43  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatagcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgtgaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 44  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 5 (h-mAb2 VH-5)

<400> 44

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 45  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 5 (h-mAb2 VH-5)

<400> 45  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgcaaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 46  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 6 (h-mAb2 VH-6)

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 47  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 6 (h-mAb2 VH-6)

<400> 47  
 gaggtgcagc tggtggaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt cacctttaac acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtgggcagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg ccgtgtacta ttgtgtgaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 48  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 7 (h-mAb2 VH-7)

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser



115 120 125

<210> 49  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 7 (h-mAb2 VH-7)

<400> 49  
 gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caggtggcag cctgcgactg 60  
 tcttgcgccg ctagtggctt caccttttct acatacgcca tgaactgggt gaggcaggct 120  
 cctggaaagg ggctggagtg ggtggccagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actcagtgaa ggatagattc acaatttccc gcgacgattc taaaaacagt 240  
 ctgtatctgc agatgaactc cctgaagact gaagacaccg cctgtgacta ttgtgtgaga 300  
 cacggaaact tcggcaactc ctacgtgtcc tggtttgcatt attgggggtca gggcacactg 360  
 gtgaccgtgt ccagc 375

<210> 50  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Heavy Chain Variant 8 (h-mAb2 VH-8)

<400> 50

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 51  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant 8 (h-mAb2 VH-8)

<400> 51  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatagccta tgaattgggt cgccaggct 120  
 ccaggggaagg ggctggagtg ggttgcaagg atcaggtcca agtacaaca ttatgcaacc 180  
 tactatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca 240  
 ctgtatctgc aatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga 300  
 cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360  
 gtgactgtgt cttcc 375

<210> 52  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant QV (h-mAb2 VL-QV)

<400> 52

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 53  
<211> 375  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Polynucleotide Sequence Encoding Humanized mAb2 Variable Heavy Chain Variant QV (h-mAb2 VL-QV)

<400> 53  
gaggtgcagc tgggtgaaag cggcggagga ctggtgcagc caaagggatc actgaaactg 60  
tcctgcgccg cctccggctt cacctttaac acatacgcta tgaattgggt gcgacaggca 120  
cctggcaagg gcctggagtg ggtggcaagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180  
tactatgccg actctgtgaa ggatagattc acaatcagtc gcgacgattc ccagagcatt 240  
ctgtatctgc agatgaacaa tctgaaaact gaagacaccg ccatgtacta ttgtgtgcgg 300  
cacggtaact tcggcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360  
gtgactgtgt cttcc 375

<210> 54  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of hVH-6L

<400> 54

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp  
50 55 60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 55  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of hVH-8L

<400> 55

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp  
50 55 60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 56  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of hXR32VH-8 di-1

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 57

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of hXR32VH-8 di-2

<400> 57

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 58

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the hXR32VL-Her-2VH E coil

<400> 58

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu  
 115 120 125  
 Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Leu Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly  
 130 135 140  
 Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr  
 165 170 175  
 Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr  
 180 185 190  
 Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Val Ser Arg Leu Thr Ser Glu Asp  
 195 200 205  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala  
 210 215 220  
 Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu  
 245 250 255  
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 260 265 270

<210> 59

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the Her2VL-hXR32VH-K coil

<400> 59

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly His Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60  
 Asn Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu  
 115 120 125  
 Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe  
 130 135 140  
 Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala  
 165 170 175  
 Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
 180 185 190  
 Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu  
 195 200 205  
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 225 230 235 240  
 Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu  
 245 250 255  
 Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala  
 260 265 270  
 Ala Leu Glu Lys  
 275

<210> 60  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the CD19VL-hXR32VH-E coil

<400> 60

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
1 5 10 15  
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
20 25 30  
Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro  
35 40 45  
Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro  
50 55 60  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
65 70 75 80  
Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr  
85 90 95  
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly  
100 105 110  
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
115 120 125  
Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
130 135 140  
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
145 150 155 160  
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn  
165 170 175  
Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser  
180 185 190  
Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys  
195 200 205  
Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly  
210 215 220  
Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
225 230 235 240  
Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu  
245 250 255  
Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu  
260 265 270  
Val Ala Ala Leu Glu Lys  
275



<210> 61  
<211> 276  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the hXR32VL-CD19VH-K coil

<400> 61

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30  
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45  
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60  
Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80  
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95  
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
100 105 110  
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu  
115 120 125  
Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
130 135 140  
Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
145 150 155 160  
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr  
165 170 175  
Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu  
180 185 190  
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp  
195 200 205  
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg  
210 215 220  
Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val  
225 230 235 240  
Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys  
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala  
260 265 270

Ala Leu Lys Glu  
275

<210> 62

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the hXR32VL-EGFRVH-E coil

<400> 62

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly  
115 120 125

Leu Val Gln Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly  
130 135 140

Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly  
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp  
165 170 175

Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser  
180 185 190

Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr  
195 200 205

Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe  
210 215 220

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys  
225 230 235 240

Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu  
245 250 255

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
260 265 270

<210> 63

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the EGFRVL-hXR32VH-K coil

<400> 63

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn  
20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile  
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr  
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
130 135 140

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr  
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr  
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val  
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala  
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu  
260 265 270

Lys Glu

<210> 64  
<211> 275  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino acid sequence of the hBRCA69DVL-hXR32VH-E coil

<400> 64

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser  
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
115 120 125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
130 135 140

Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
145 150 155 160

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr  
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp  
 180 185 190  
 Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp  
 195 200 205  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr  
 210 215 220  
 Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 245 250 255  
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys  
 275

<210> 65  
 <211> 272  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of the hXR32VL-hBRCA69DVH-K coil

<400> 65

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu  
 115 120 125  
 Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr  
 165 170 175  
 Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys  
 180 185 190  
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp  
 195 200 205  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr  
 210 215 220  
 Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly  
 225 230 235 240  
 Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu  
 245 250 255  
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 260 265 270

<210> 66  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of the hBRCA84DVL-hXR32VH-E coil

<400> 66

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
 115 120 125

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
 130 135 140  
 Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
 145 150 155 160  
 Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr  
 165 170 175  
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp  
 180 185 190  
 Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp  
 195 200 205  
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr  
 210 215 220  
 Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 245 250 255  
 Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala  
 260 265 270  
 Leu Glu Lys  
 275

<210> 67

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the hXR32VL-hBRCA84DVH-K coil

<400> 67

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly

		100						105						110			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly		
		115					120					125					
Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly		
		130				135					140						
Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly		
145					150					155					160		
Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ala	Ile		
				165					170					175			
Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn		
			180					185					190				
Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Asp	Glu	Asp		
		195					200					205					
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gly	Arg	Gly	Arg	Glu	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Gly		
		210				215					220						
Ser	Arg	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser		
225					230					235					240		
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala		
				245					250					255			
Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Lys	Glu	Lys	Val	Ala	Ala	Leu		
			260					265					270				

Lys Glu

<210> 68  
 <211> 279  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of the 4420VL-hXR32VH-E coil

<400> 68

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Phe	Ser	Leu	Pro	Val	Ser	Leu	Gly		
1				5					10					15			
Asp	Gln	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser		
			20					25					30				
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Arg	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser		
		35					40					45					
Pro	Lys	Val	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser	Gly	Val	Pro		
	50					55					60						
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile		
65					70					75					80		



Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 115 120 125  
 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 130 135 140  
 Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn  
 165 170 175  
 Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile  
 180 185 190  
 Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu  
 195 200 205  
 Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe  
 210 215 220  
 Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 225 230 235 240  
 Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu  
 245 250 255  
 Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 260 265 270  
 Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 275

<210> 69

<211> 270

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the hXR32VL-4420VH-K coil

<400> 69

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly  
 115 120 125  
 Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly  
 130 135 140  
 Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr  
 165 170 175  
 Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 180 185 190  
 Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Val  
 195 200 205  
 Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met Asp  
 210 215 220  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 245 250 255  
 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 260 265 270

<210> 70

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the RECA47VL-hXR32VH-K coil

<400> 70

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45  
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly  
 100 105 110  
 Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 115 120 125  
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 130 135 140  
 Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 145 150 155 160  
 Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr  
 165 170 175  
 Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser  
 180 185 190  
 Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr  
 195 200 205  
 Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val  
 210 215 220  
 Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala  
 245 250 255  
 Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu  
 260 265 270

Lys Glu

<210> 71

<211> 271

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of the hXR32VL-RECA47VH-E coil

<400> 71

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly  
 100 105 110  
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu  
 115 120 125  
 Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
 130 135 140  
 Tyr Thr Phe Ser Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
 145 150 155 160  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr  
 165 170 175  
 Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
 180 185 190  
 Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp  
 195 200 205  
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe  
 210 215 220  
 Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys  
 225 230 235 240  
 Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu  
 245 250 255  
 Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 260 265 270

<210> 72  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino acid sequence of hVH-6M

<400> 72

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Ala  
50 55 60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 73

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Polynucleotide Sequence Encoding hVH-6M Variable Heavy Chain

<400> 73

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60  
tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta tgaattgggt ccgccaggct 120  
ccaggggaagg ggctggagtg ggttgaagg atcaggtcca agtacaacaa ttatgcaacc 180  
gagtatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca 240  
ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga 300  
cacggtaact tccgcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360  
gtgactgtgt cttcc 375

<210> 74

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of hVH-8M

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Asn Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 75  
 <211> 375  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Polynucleotide Sequence Encoding hVH-8M Variable Heavy Chain

<400> 75  
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggagggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcaac acatacgcta tgaattgggt ccgccaggct 120  
 ccaggaagg ggctggagtg ggttgcaagg atcaggaaca agtacaacaa ttatgcaacc 180  
 gagtatgccg actctgtgaa ggatagattc accatctcaa gagatgattc aaagaactca 240  
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacgg ccgtgtatta ctgtgtgaga 300  
 cacggtaact tccgcaattc ttacgtgtct tggtttgctt attggggaca ggggacactg 360  
 gtgactgtgt cttcc 375

<210> 76  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of variant "a" (I51T Y52cA) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 76

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Thr Ala Ser Lys Ala Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120 125

<210> 77

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of variant "b" (I51T N54S) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 77

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120 125

<210> 78  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of variant "c" (I51T A56T) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 78

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60  
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 79  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of variant "d" (I51T Y52cA N54S) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 79

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60



Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 80

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of variant "e" (I51T N54S A56T) of humanized  
mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 80

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 81

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of variant "f" (I51T Y52cA N54S A56T) of  
humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 81

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120 125

<210> 82

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of variant "g" (I51T D61A) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 82

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120 125

<210> 83  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of variant "h" (I51T D65G) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 83

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 84  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of variant "i" (I51T Y52cA N54S D61A) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 84

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala  
50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 85

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of variant "j" (I51T Y52cA N54S D65G) of  
humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 85

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
85 90 95

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120 125

<210> 86

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino Acid Sequence of variant "k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G) of  
humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 86

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120 125

<210> 87  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Amino Acid Sequence of variant "2k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G  
 (VH8-A49G V93A)) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody  
 variable heavy chain

<400> 87

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Gly Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 88  
<211> 125  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Amino Acid Sequence of variant "5k" (I51T Y52cA N54S D61A D65G (VH8-V93A)) of humanized mAb2 murine monoclonal antibody variable heavy chain

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
20 25 30  
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ala Arg Thr Arg Ser Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala  
50 55 60  
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser  
65 70 75 80  
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95  
Tyr Cys Ala Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
100 105 110  
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. CD3-связывающая молекула, включающая антигенсвязывающий фрагмент антитела, причем указанный антигенсвязывающий фрагмент включает CD3-специфический VL-домен антитела и CD3-специфический VH-домен антитела, причем указанный CD3-специфический VL-домен и указанный CD3-специфический VH-домен образуют антигенсвязывающий домен, способный к иммуноспецифическому связыванию как с эпитопом CD3 человека, так и с эпитопом CD3 млекопитающего, являющегося человеком, причем:

(I) указанный CD3-специфический VL-домен выбирают из группы, состоящей из VL-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 16), VL-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 18), VL-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 20), VL-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 22), VL-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 24), VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26), VL-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 28), VL-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 30), VL-9 h-mab2 (SEQ ID NO: 32) и VL-10 h-mab2 (SEQ ID NO: 34), а указанный CD3-специфический VH-домен выбирают из группы, состоящей из VH-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 36), VH-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 38), VH-3 h-mab2 (SEQ ID NO: 40), VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42), VH-5 h-mab2 (SEQ ID NO: 44), VH-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 46), VH-6L h-mab2 (SEQ ID NO: 54), VH-7 h-mab2 (SEQ ID NO: 48), VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50), VH-8L h-mab2 (SEQ ID NO: 55), VH-8 di-1 h-mab2 (SEQ ID NO: 56), VH-8 di-2 h-mab2 (SEQ ID NO: 57), VH-6M h-mab2 (SEQ ID NO: 72), VH-8M h-mab2 (SEQ ID NO: 74), VH-2k h-mab2 (SEQ ID NO: 87) и VH-5k h-mab2 (SEQ ID NO: 88); или

(II) указанный CD3-специфический VL-домен выбирают из группы, состоящей из VL-1 h-mab1 (SEQ ID NO: 10) и VL-2 h-mab1 (SEQ ID NO: 12), а указанным CD3-специфическим VH-доменом является VH h-mab1 (SEQ ID NO: 14).

2. CD3-связывающая молекула по п. 1, в которой указанным CD3-специфическим VL-доменом является VL-6 h-mab2 (SEQ ID NO: 26).

3. CD3-связывающая молекула по п. 1 или 2, в которой указанным CD3-специфическим VH-доменом является VH-8 h-mab2 (SEQ ID NO: 50), VH-4 h-mab2 (SEQ ID NO: 42) или VH-2k h-mab2 (SEQ ID NO: 87).

4. CD3-связывающая молекула по любому из п.п. 1-3, которая является антителом.

5. CD3-связывающее антитело по п. 4, в котором отсутствует Fc-область, или которое включает Fc-область, которая:

(А) испытывает недостаток эффекторной функции или обладает уменьшенной эффекторной функцией; или

(В) подвергнута модифицированию, которое ослабляет способность Fc-области антитела к связыванию с Fc-рецептором;

причем указанное уменьшение эффекторной функции и ослабление связывающей способности имеет место относительно таковой Fc-области дикого типа.

6. CD3-связывающая молекула по любому из п.п. 1-3, которая представляет собой CD3-связывающее диатело, которое включает первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом указанные цепи ковалентно связаны друг с другом, причем:

I. указанная первая полипептидная цепь включает аминоконец и карбоксильный конец и от N-конца к С-концу:

(i) домен (А), включающий указанный CD3-специфический VL-домен;

(ii) домен (В), включающий связывающую область переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2); и

(iii) домен (С);

причем указанные домены (А) и (В) не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта; и

(II) указанная вторая полипептидная цепь включает аминоконец и карбоксильный конец и от N-конца к С-концу:

(i) домен (D), включающий связывающую область переменного домена легкой цепи указанного второго иммуноглобулина (VL2);

(ii) домен (Е), включающий указанный CD3-специфический VH-домен; и

(iii) домен (F);

причем указанные домены (D) и (Е) не ассоциируются друг с другом с образованием эпитопсвязывающего сайта; и

причем:



(1) указанные домены (А) и (Е) ассоциируются с образованием указанного антигенсвязывающего домена, который способен к иммуноспецифическому связыванию как с CD3 человека, так и с CD3 млекопитающего, являющегося человеком;

(2) указанные домены (В) и (D) ассоциируются с образованием сайта связывания, который иммуноспецифически связывается со вторым эпитопом, при этом указанный второй эпитоп отличен от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие указанной ассоциации указанных доменов (А) и (Е); и

(3) указанные домены (С) и (F) ковалентно связаны вместе.

7. CD3-связывающее диатело по п. 6, в котором указанным вторым эпитопом не является эпитоп CD3.

8. CD3-связывающее диатело по п. 6, в котором указанным вторым эпитопом является эпитоп CD3, который отличен от эпитопа CD3, с которым связывается антигенсвязывающий домен, образованный вследствие указанной ассоциации указанных доменов (А) и (Е).

9. CD3-связывающая молекула по любому из п.п. 1-3, антитело по п. 4 или 5 или диатело по любому из п.п. 6-8, которая(ое) является гуманизированной.

10. CD3-связывающая молекула по любому из п.п. 1-3 или 9 или диатело по любому из п.п. 6-9, которая(ое) способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и флуоресцеином.

11. CD3-связывающая молекула по любому из п.п. 1-3 или 9 или диатело по любому из п.п. 6-9, которая(ое) способна к иммуноспецифическому связыванию как с (i) CD3, так и с (ii)(a) опухолеспецифическим антигеном, или (ii)(b) антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности.

12. CD3-связывающая молекула или диатело по п. 11, которая(ое) способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и опухолеспецифическим антигеном, представленным на опухолевой клетке, причем указанной опухолевой клеткой является клетка злокачественного новообразования, выбираемого из группы, состоящей из рака молочной железы, рака предстательной железы,

рака желудка, рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака печени, рака яичника, рака ротовой полости, рака глотки, рака пищевода, рака гортани, рака кости, рака кожи, меланомы, рака матки, рака яичек, рака мочевого пузыря, рака почки, рака головного мозга, глиобластомы, рака щитовидной железы, лимфомы, миеломы и лейкоза.

13. CD3-связывающая молекула или диатело по п. 11, которая(ое) способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности, причем указанным антигеном клеточной поверхности, рецептором или лигандом рецептора клеточной поверхности является HER2/neu, B7-H3, CD20, PSMA, IGF-1R, EpcAM, или является молекула, которая вовлечена в ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, которая приводит к активации Т-клетки или В-клетки в ходе адаптивного иммунного ответа.

14. CD3-связывающая молекула или диатело по п. 13, которая(ое) способна к иммуноспецифическому связыванию с CD3 и с молекулой, которая вовлечена в указанную ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, и указанную молекулу, которая вовлечена в указанную ассоциацию Т-клетки с В-клеткой, выбирают из группы, состоящей из CD19, CD20, CD22, CD23, CD27, CD32B, CD38, CD40, CD79a, CD79b, CD80, CD86, LFA-I, LFA-3 и CFA-I.

15. Фармацевтическая композиция, включающая CD3-связывающую молекулу по любому из п.п. 1-3 или 9-14, антитело по п. 4 или 5 или диатело по любому из п.п. 6-14 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

16. Фармацевтическая композиция по п. 15 для применения для лечения злокачественного новообразования или аутоиммунного или воспалительного заболевания.

17. Фармацевтическая композиция по п. 16 для применения для лечения аутоиммунного или воспалительного заболевания, выбираемого из группы, состоящей из инсулинозависимого диабета типа I, ревматоидного артрита, системной красной волчанки, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника,

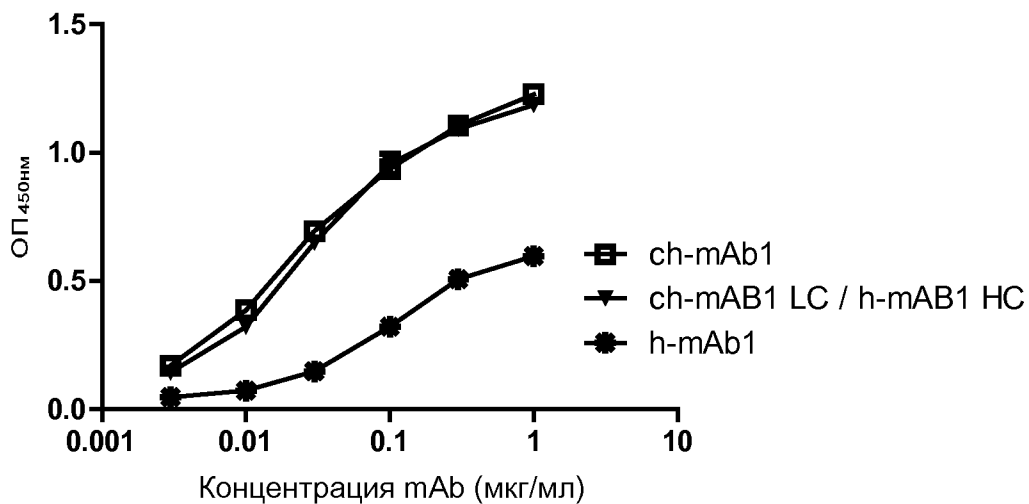
злокачественной миастении, глютеновой болезни, синдрома Гужеро-Шегрена, болезни Грейвса, болезни Крона, аутоиммунного гепатита, псориаза, псориатического артрита, астмы, аллергического ринита, эффектов вследствие трансплантации органа или гомологичной болезни (GVHD).

18. Фармацевтическая композиция по п. 16 для применения для лечения инсулинозависимого диабета типа I.

По доверенности

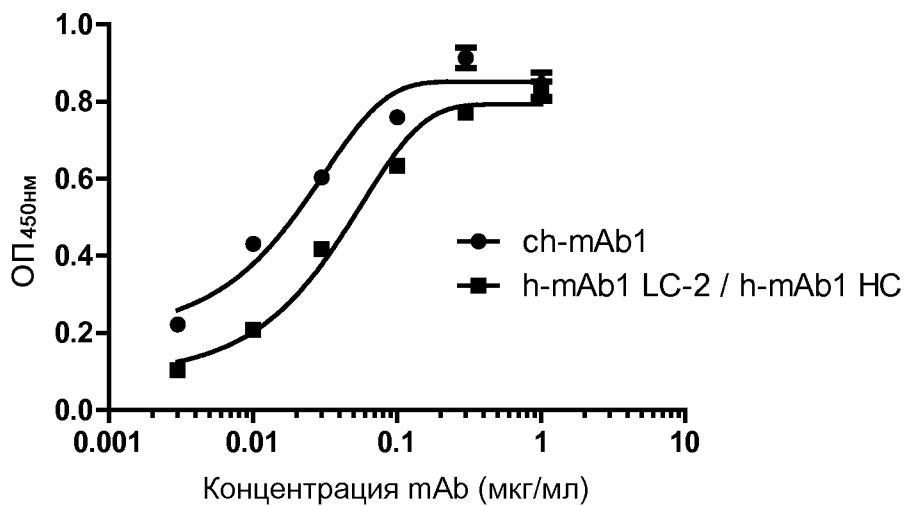
1/21

ELISA связывания с захваченным sCD3

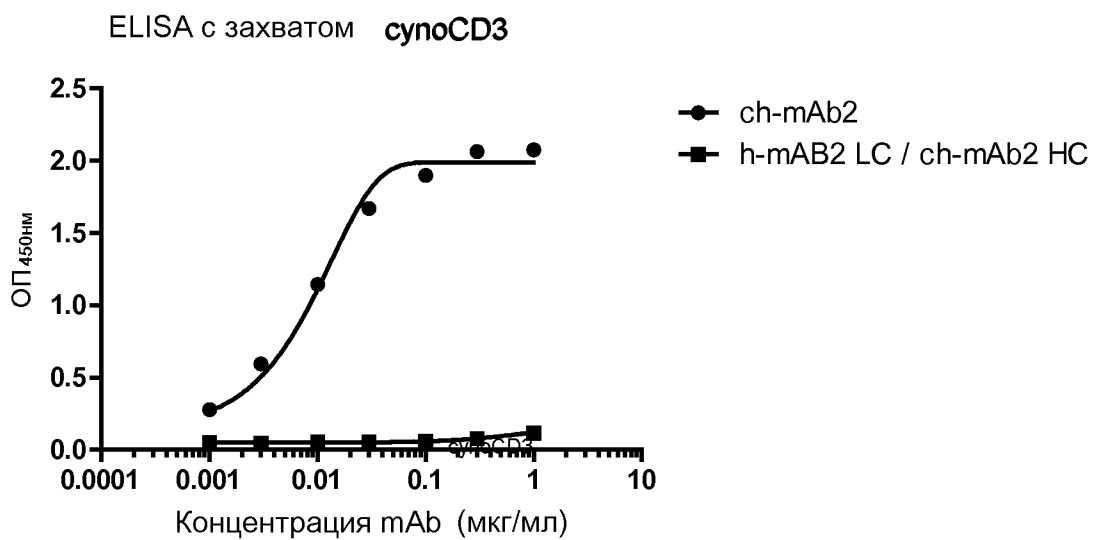


Фиг. 1А

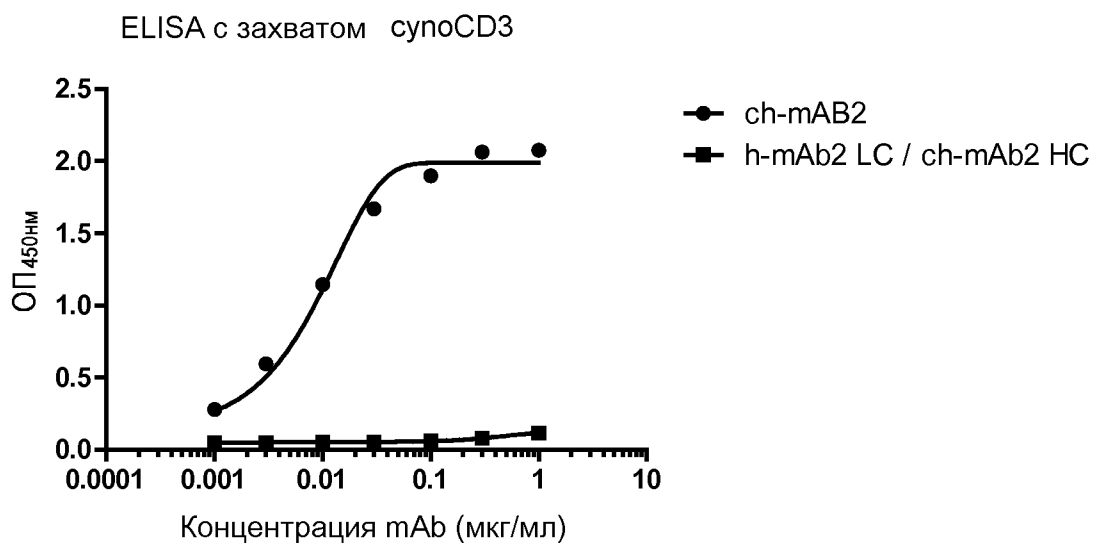
ELISA с захватом hCD3



Фиг. 1В

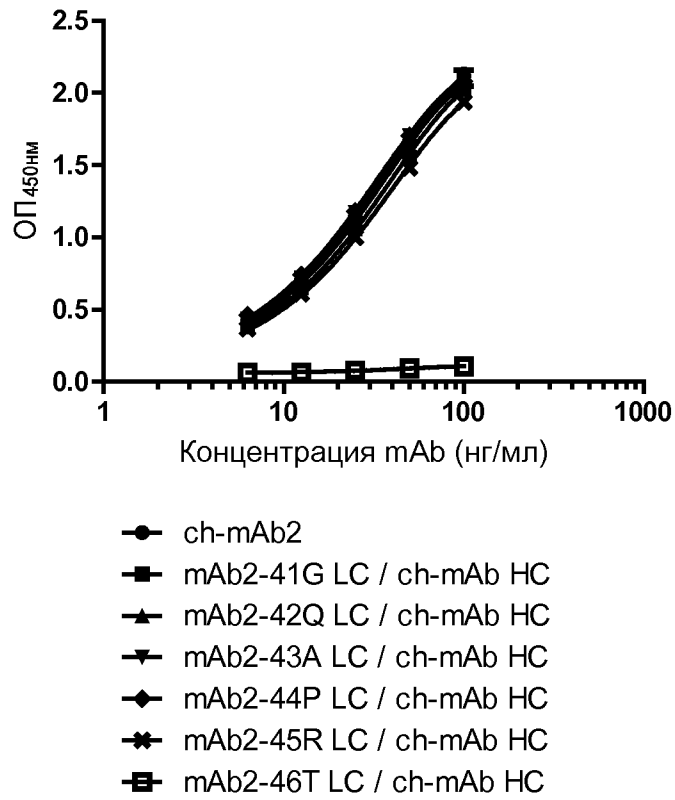


Фиг. 2А

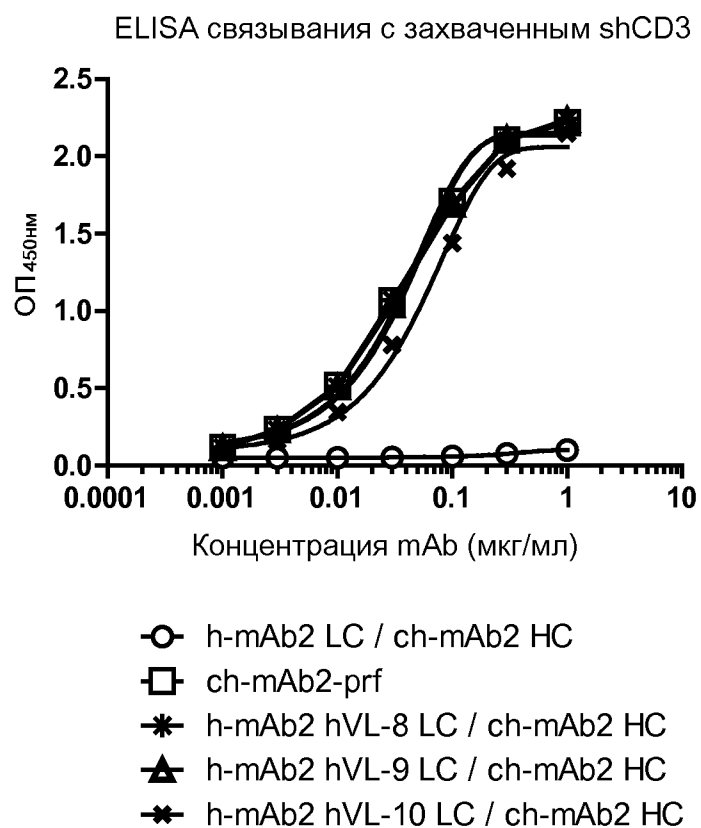


Фиг. 2В

## ELISA с захватом hCD3

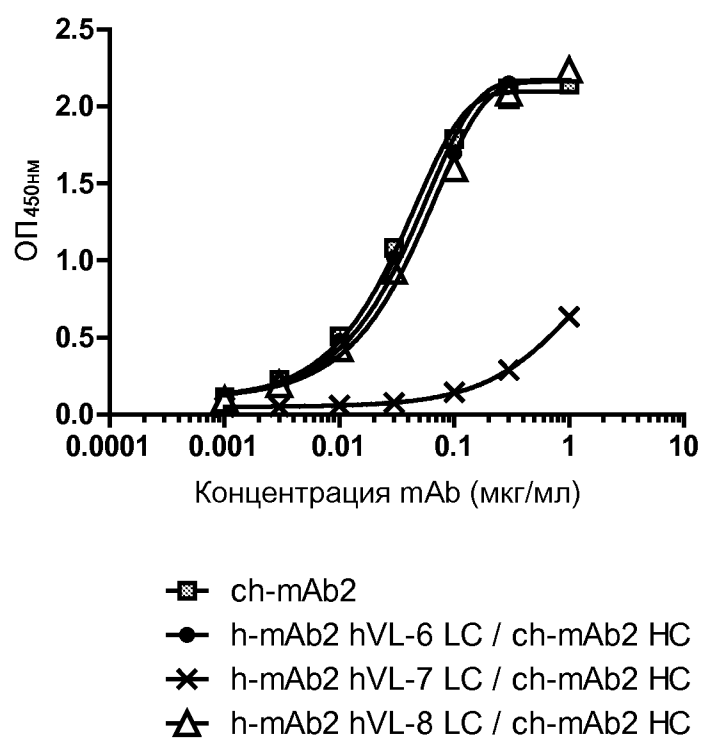


Фиг. 3



Фиг. 4

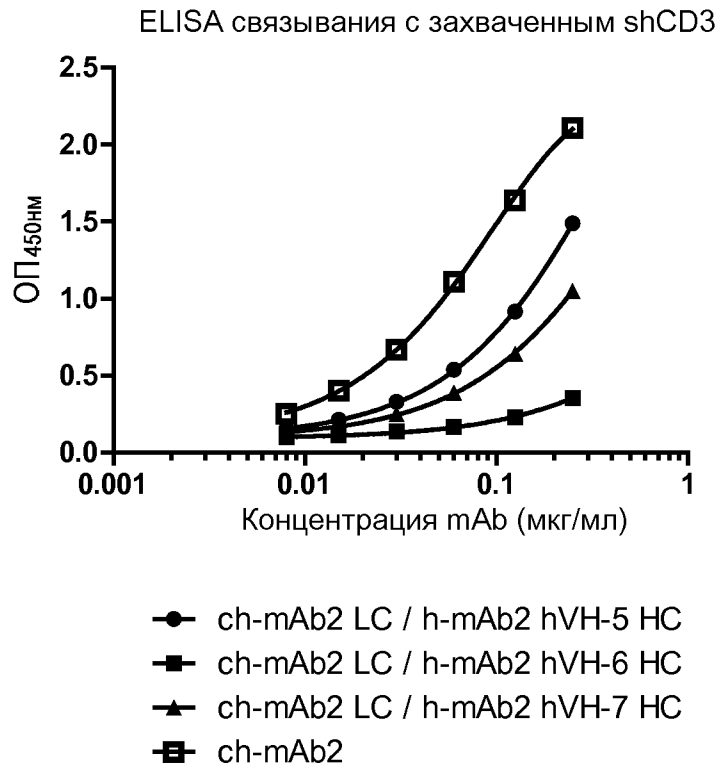
ELISA с захватом shCD3



Фиг. 5

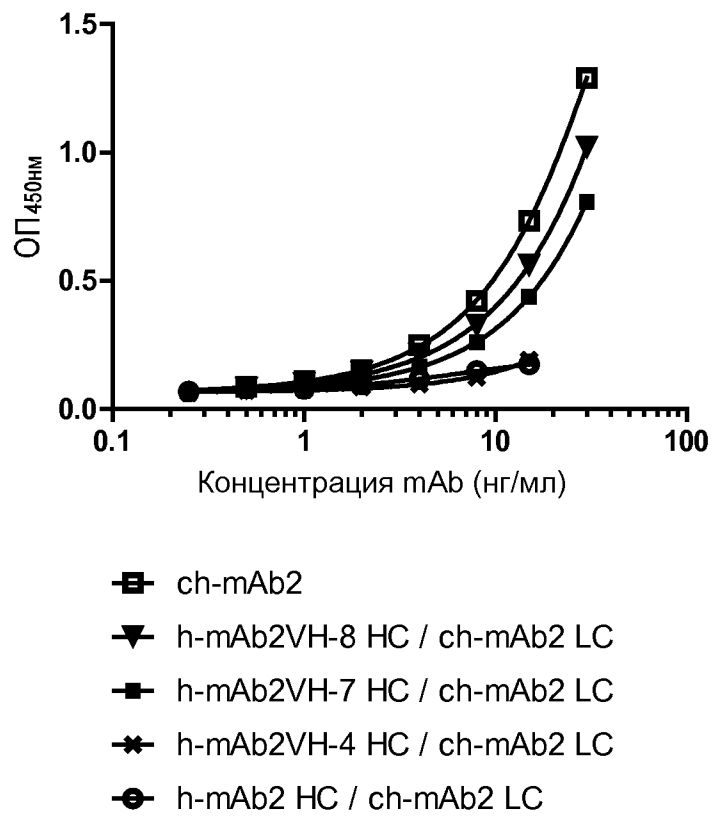


6/21



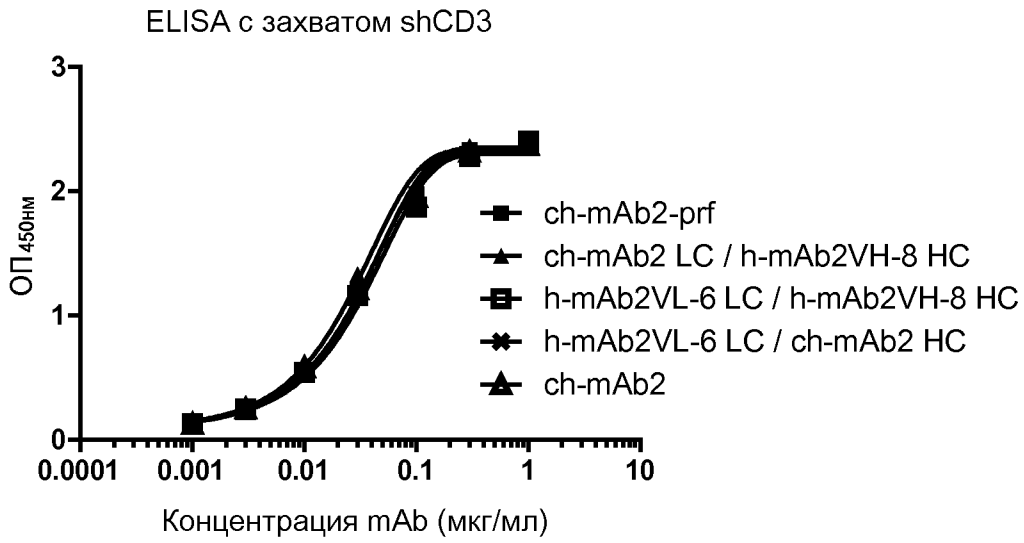
Фиг. 6

ELISA связывания с захваченным shCD3

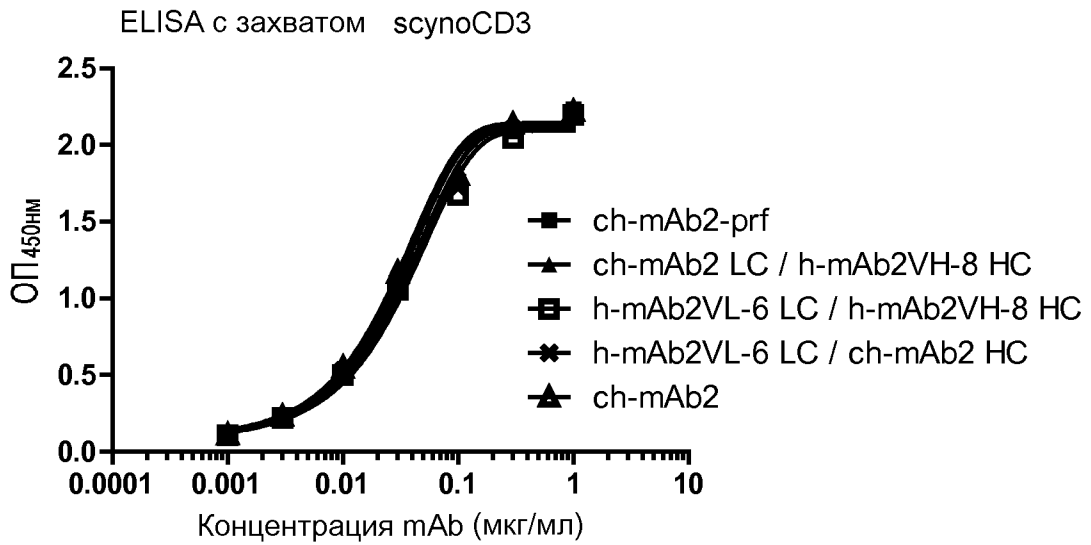


Фиг. 7

8/21



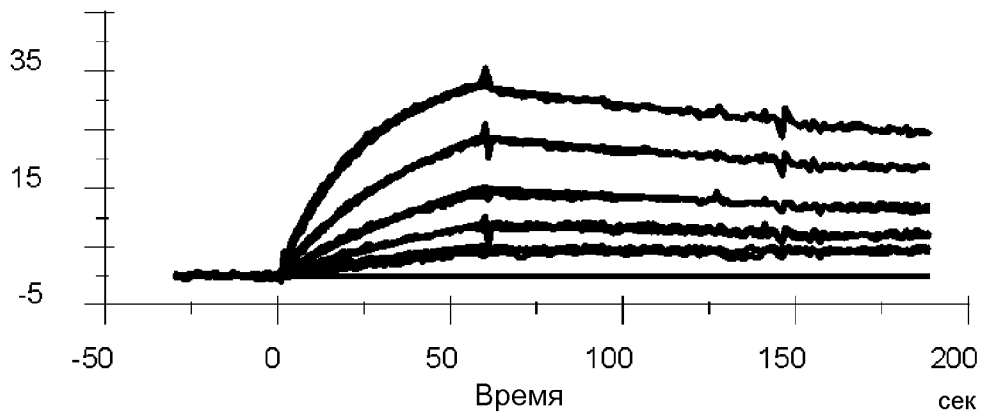
Фиг. 8А



Фиг. 8В

9/21

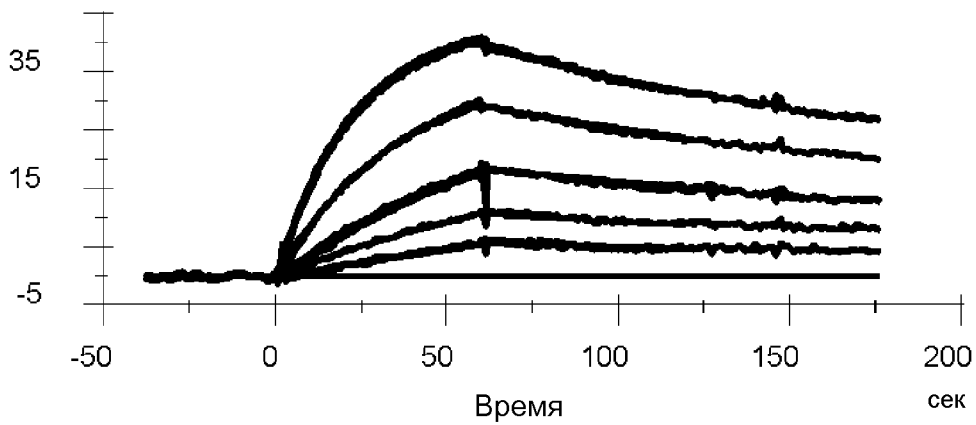
Резонансные  
единицы



ch-mAb2 / shCD3  
 $K_a = 1.7 \times 10^5$     $K_d = 2.5 \times 10^{-3}$     $K_D = 14.7$  нМ

Фиг. 9А

Резонансные  
единицы

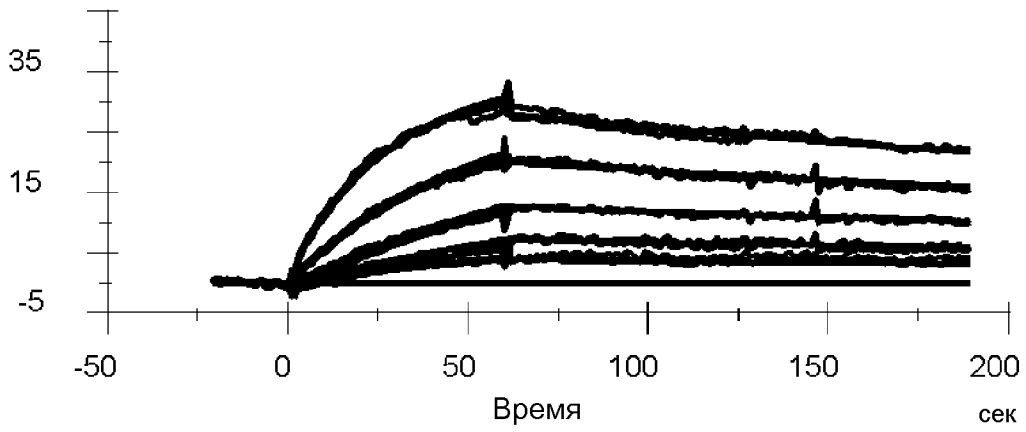


h-mAb2 8.6 / shCD3  
 $K_a = 1.9 \times 10^5$     $K_d = 3.8 \times 10^{-3}$     $K_D = 20.0$  нМ

Фиг. 9В

10/21

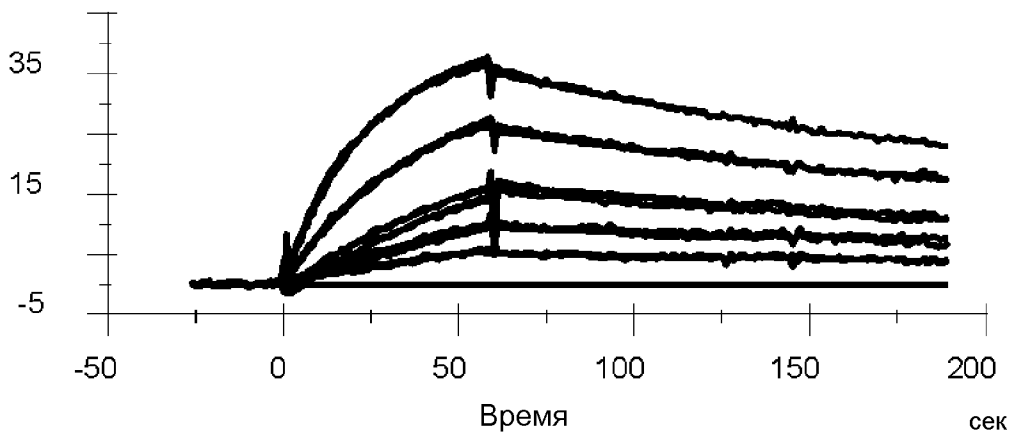
Резонансные  
единицы



ch-mAb2 / scCD3  
 $K_a = 1.6 \times 10^5$     $K_d = 2.3 \times 10^{-3}$     $K_D = 14.4$  нМ

Фиг. 9С

Резонансные  
единицы

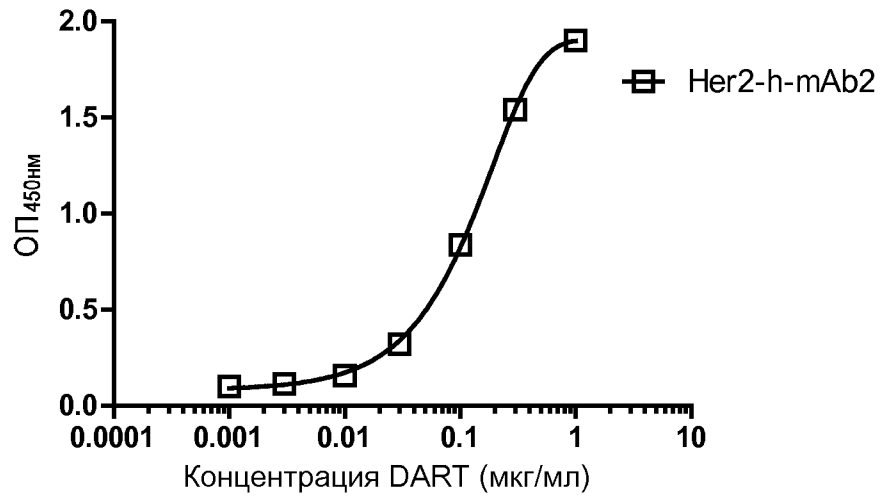


h-mAb2 8.6 / shCD3  
 $K_a = 1.7 \times 10^5$     $K_d = 4.1 \times 10^{-3}$     $K_D = 24.1$  нМ

Фиг. 9D

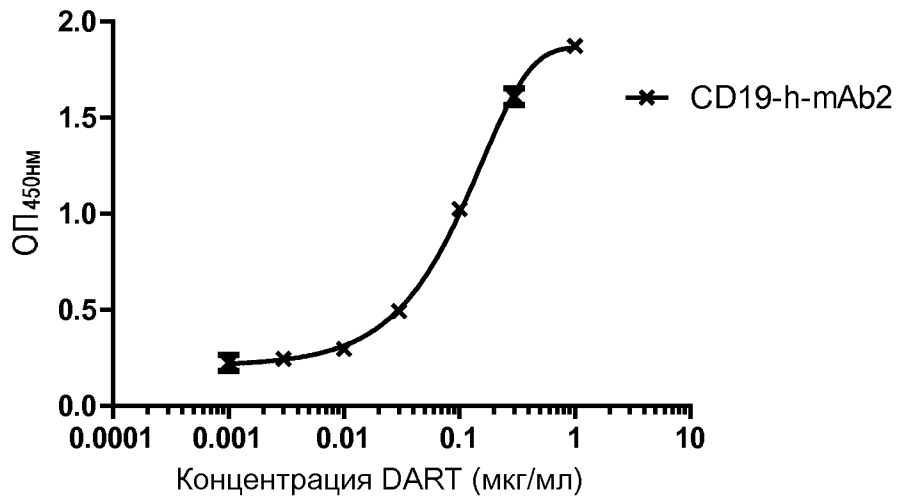
11/21

ELISA связывания биспецифических антител  
с захватом супоCD3

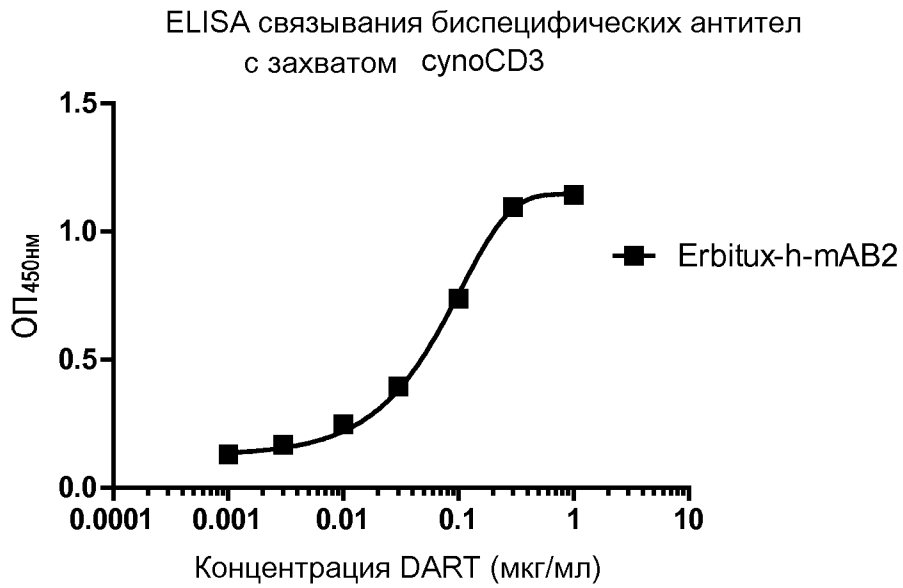


Фиг. 10А

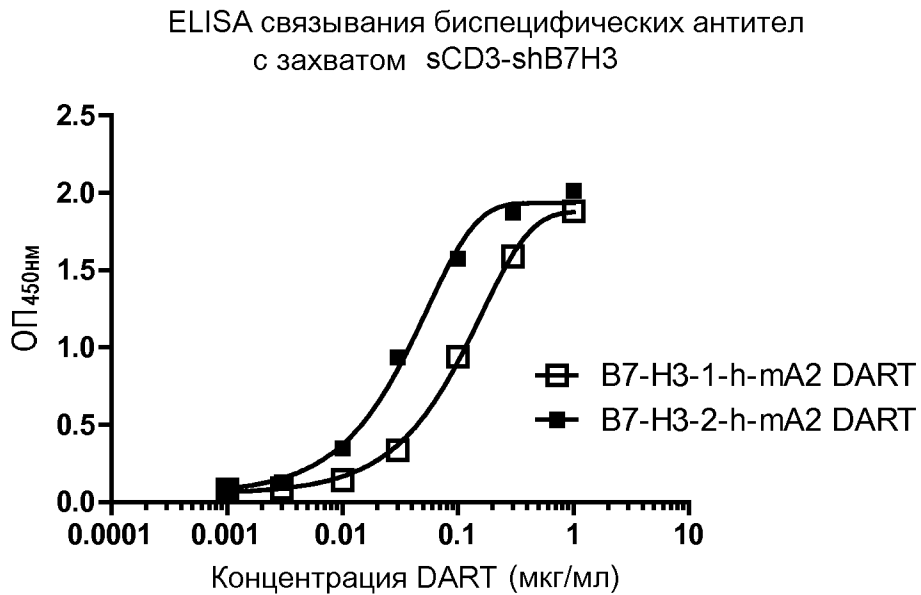
ELISA связывания биспецифических антител  
с захватом супоCD3



Фиг. 10В

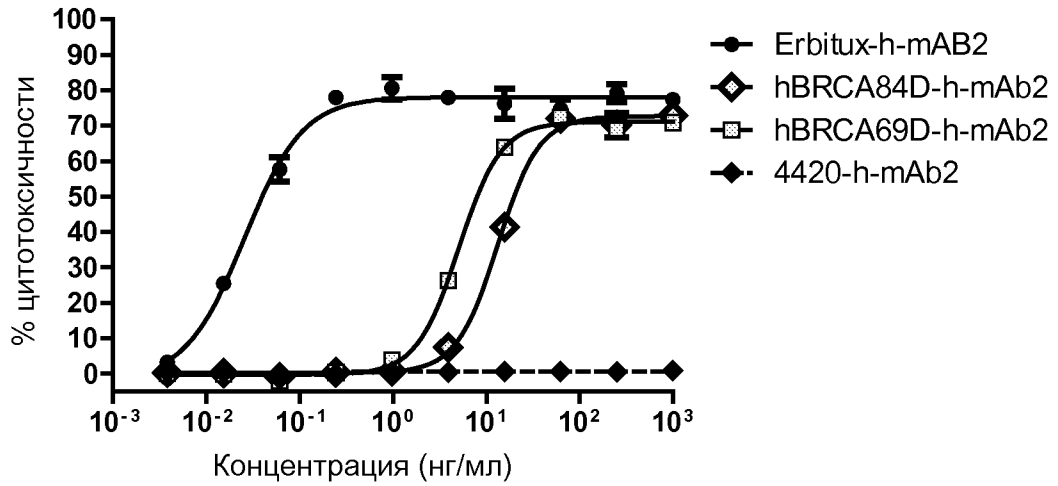


Фиг. 10C



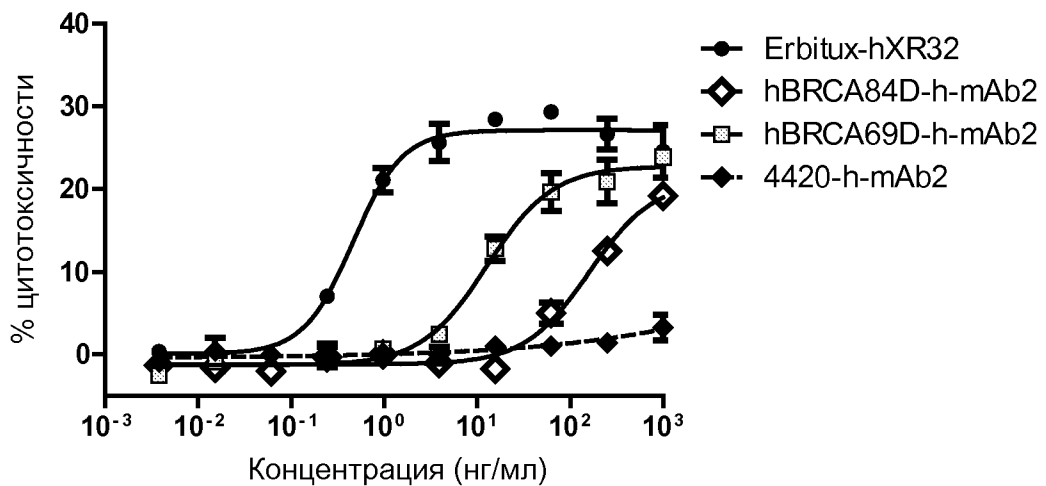
Фиг. 10D

**A498 (20K) + PBMC (LDH)**  
**E:T=30:1 D#38123**



Фиг. 11А

**RECA905021E (20K) + PBMC (LDH)**  
**E:T=30:1**

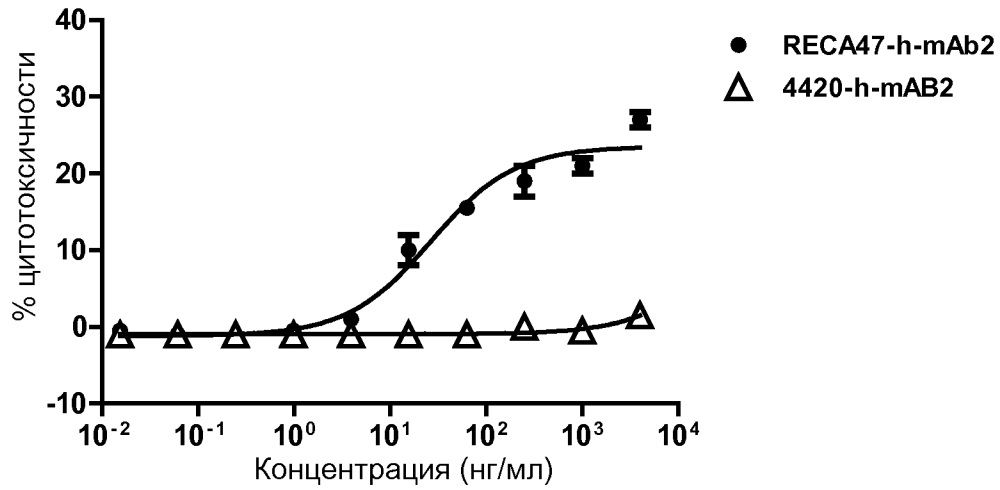


Фиг. 11В



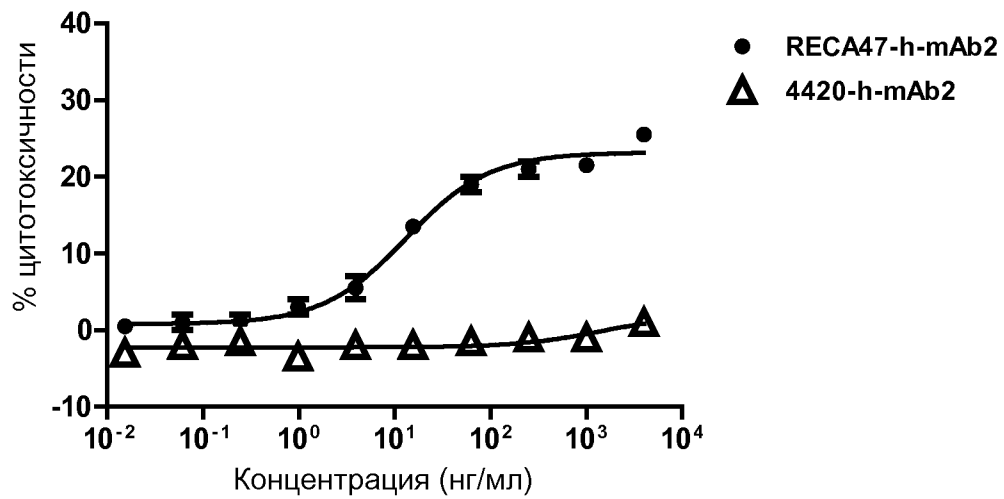
14/21

**Colo205 + Покоящиеся PBMC (LDH)**  
**E:T=30:1**



**Фиг. 12А**

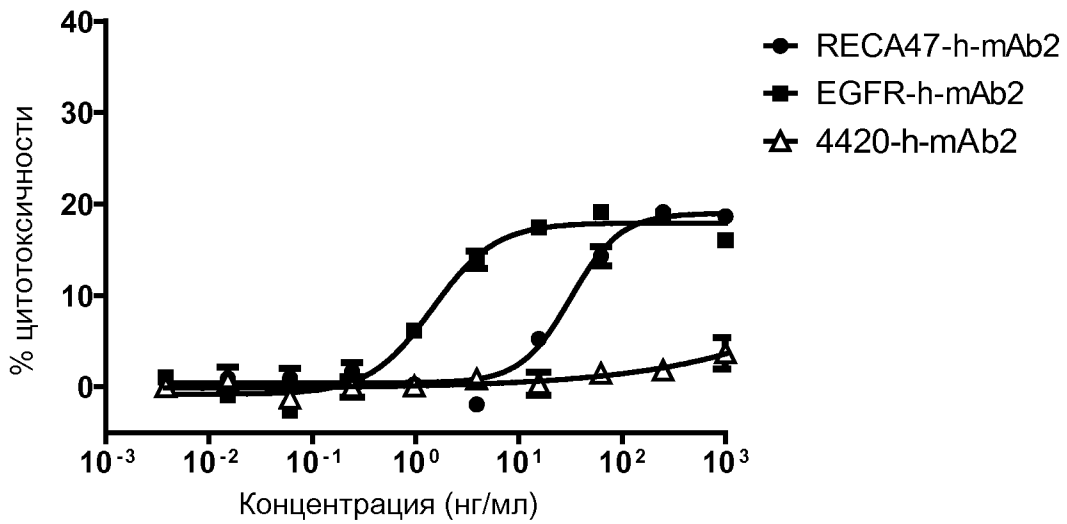
**RECA090521E + Покоящиеся PBMC (LDH)**  
**E:T=30:1**



**Фиг. 12В**

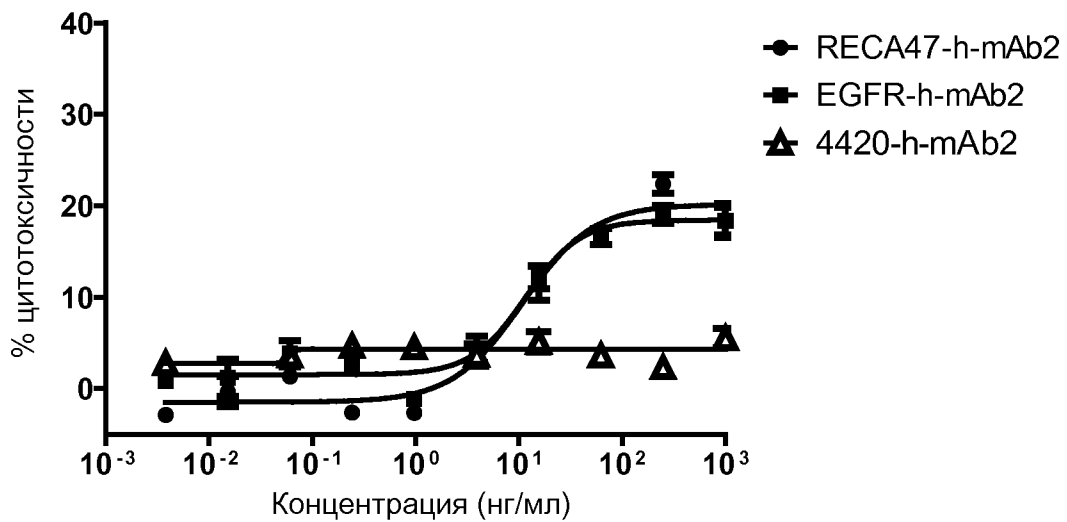
15/21

Colo205 + Покоящиеся PBMC (Glo)  
E:T=30:1



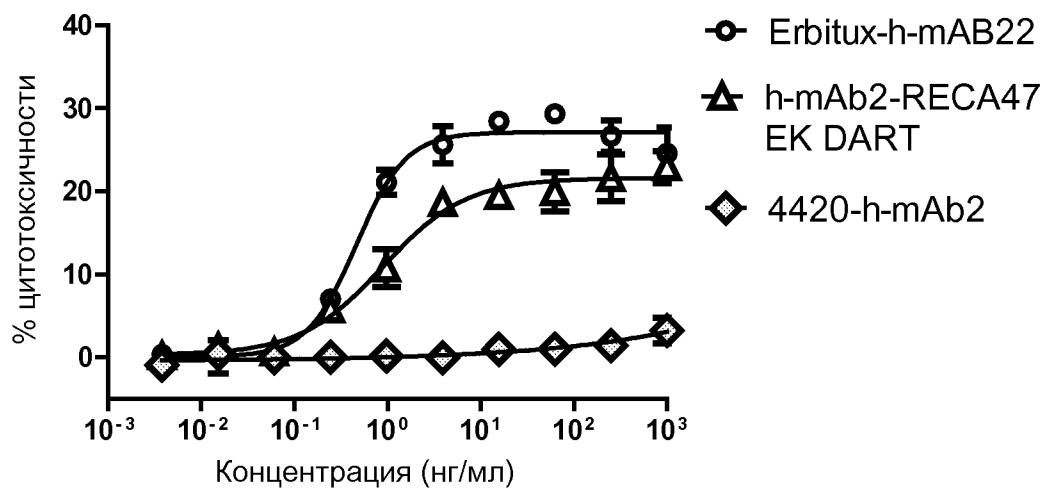
Фиг. 12С

RECA090521E + Покоящиеся PBMC (Glo)  
E:T=30:1



Фиг. 12D

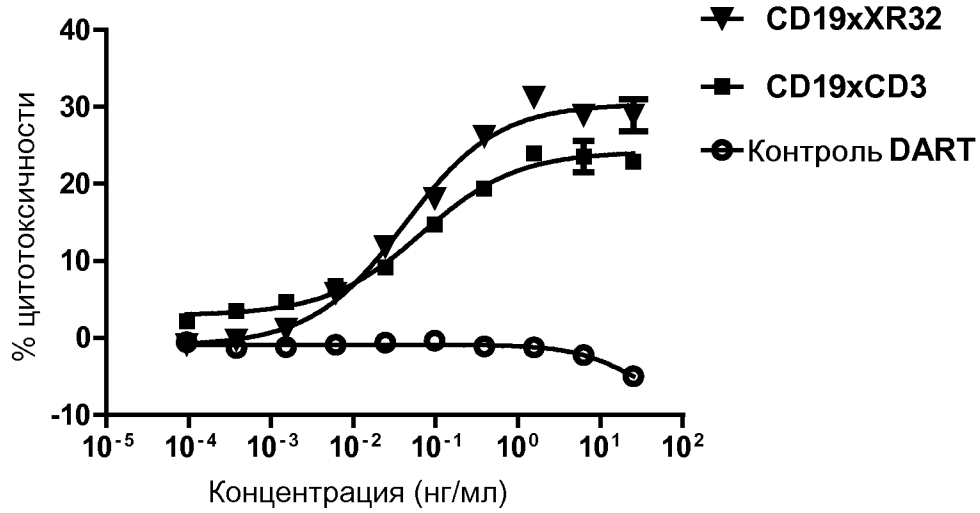
RECA905021E (20K) + PBMC (LDH)  
E:T=30:1



Фиг. 12Е

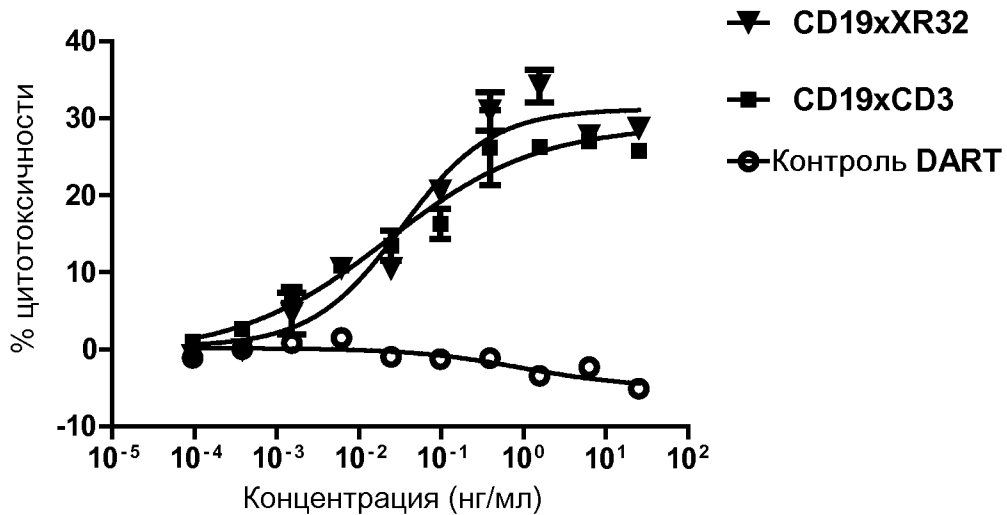
17/21

Клетки В-клеточной лимфомы Raji  
**E:T=30:1**  
Покоящиеся РВМС



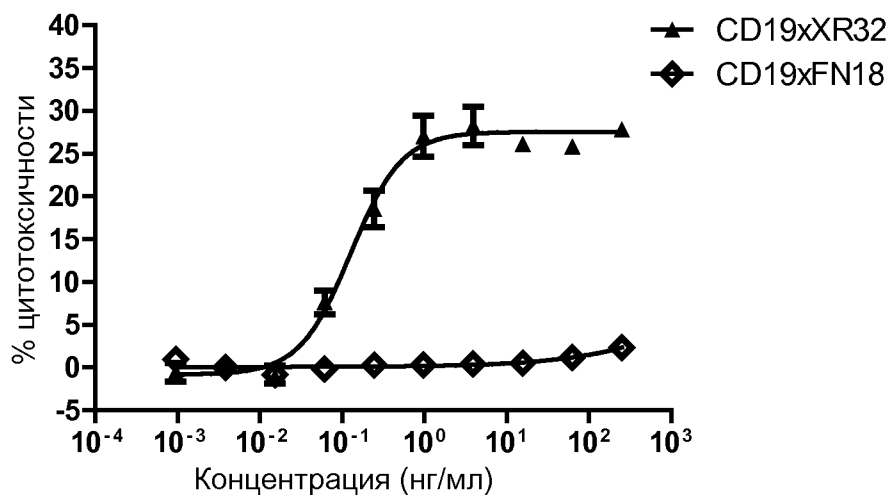
Фиг. 13А

Клетки лимфомы из клеток ткани JeKo-1  
**E:T=30:1**  
Покоящиеся РВМС



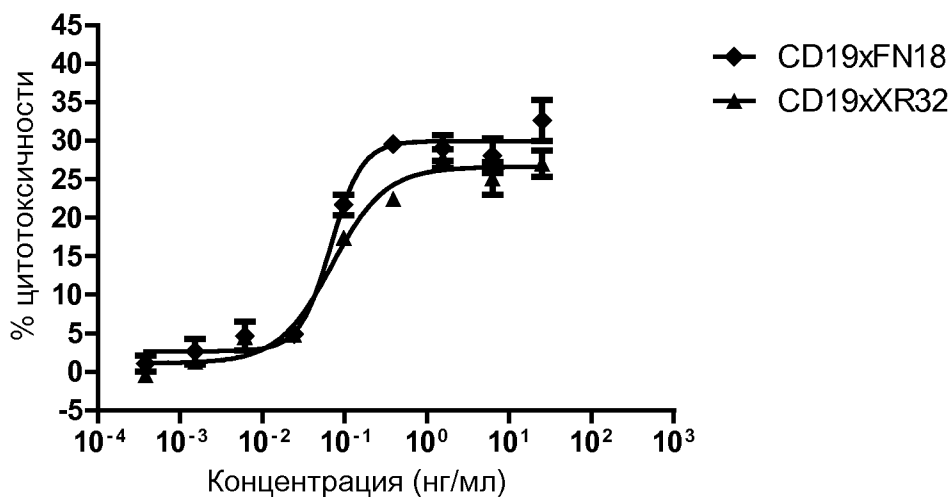
Фиг. 13В

Клетки рака толстой кишки HT-29-мишени  
PBMC человека-эфффекторы



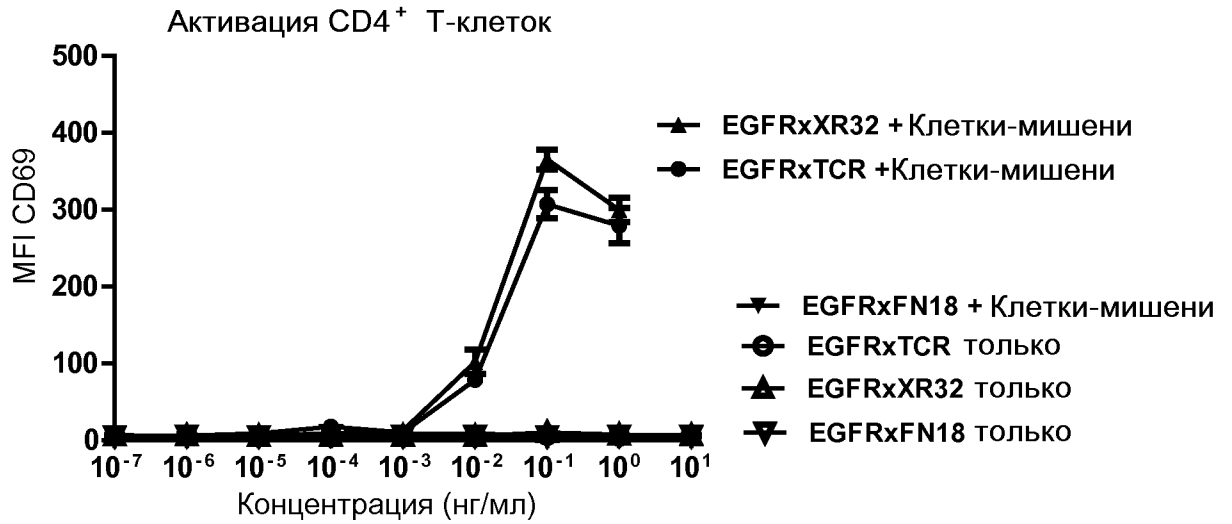
Фиг. 14А

Клетки рака толстой кишки HT-29-мишени  
Линия Т-клеток яванского макака-эфффекторов

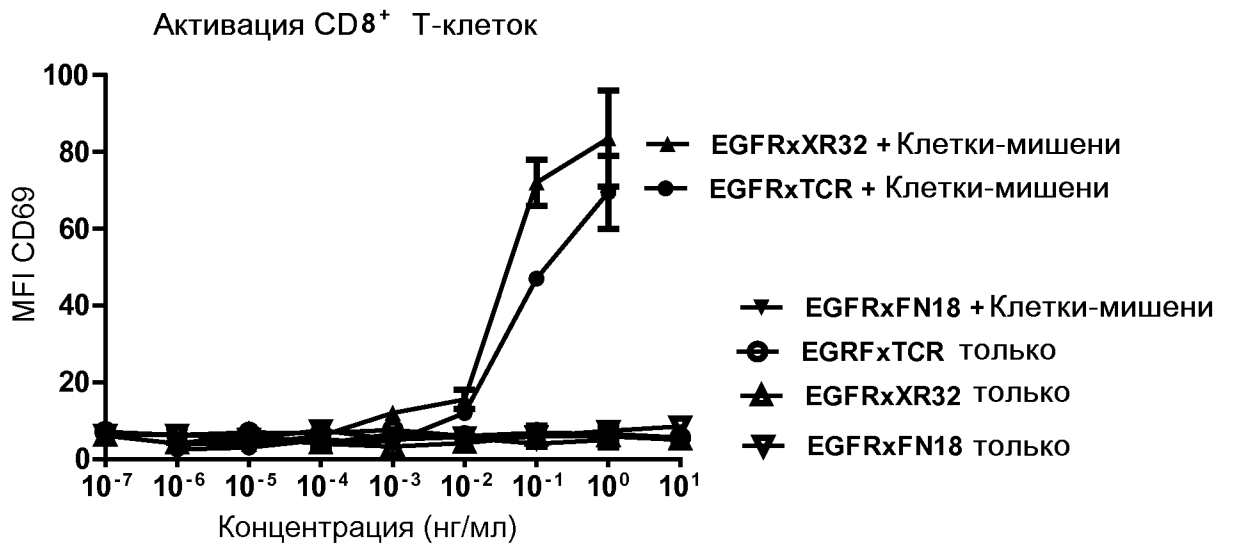


Фиг. 14В

19/21

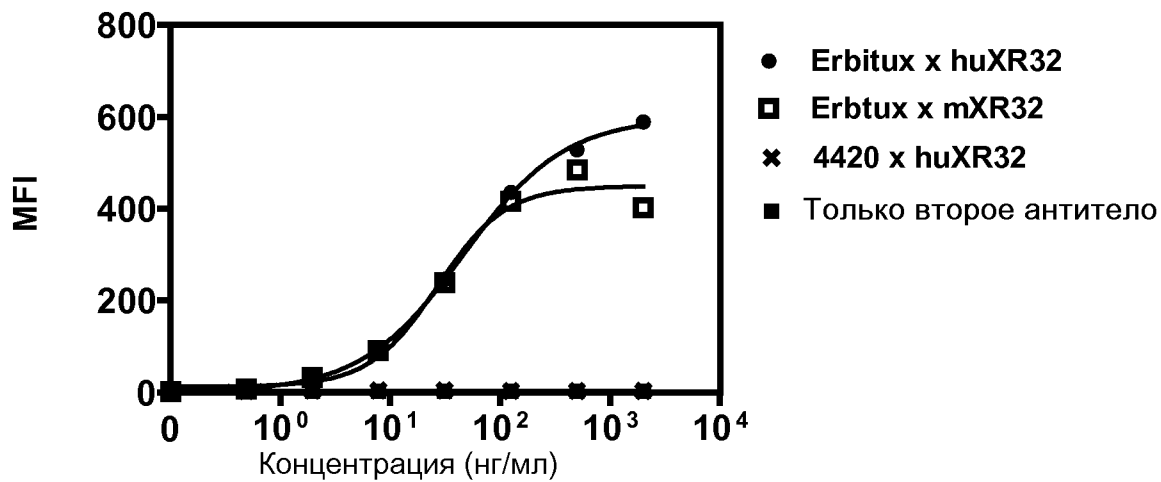


Фиг. 15А

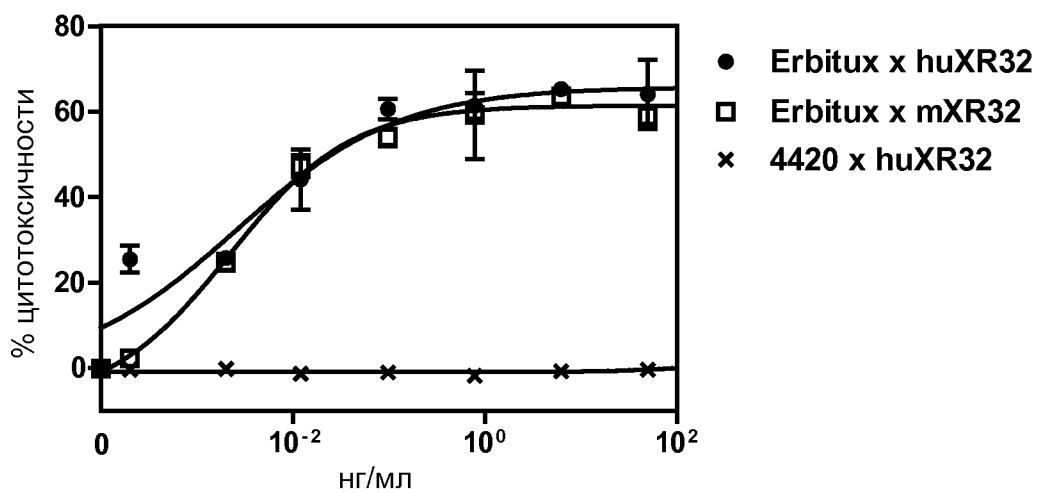


Фиг. 15В

## Связывание с клетками A498

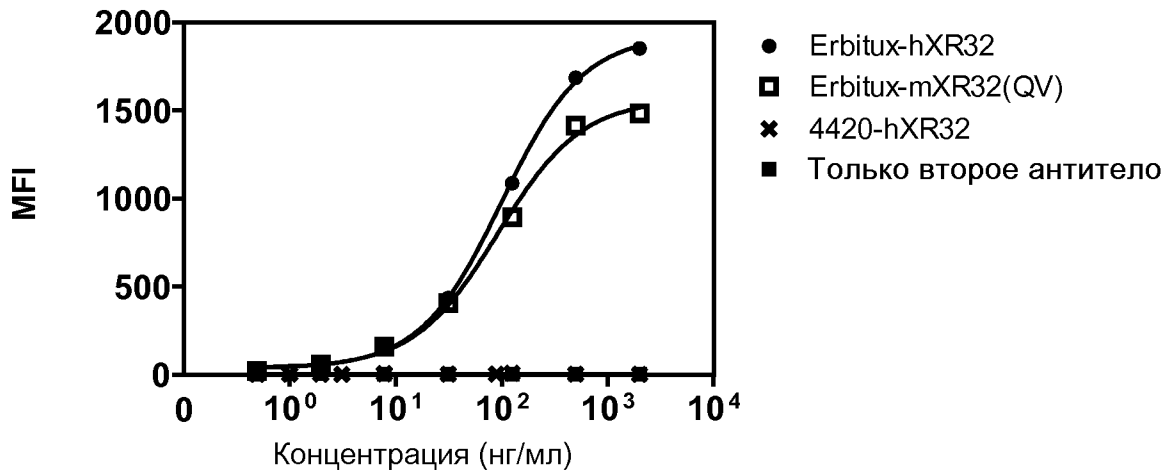


Фиг. 16А

Перенаправленное уничтожение клеток A498  
Е:Т 30:1

Фиг. 16В

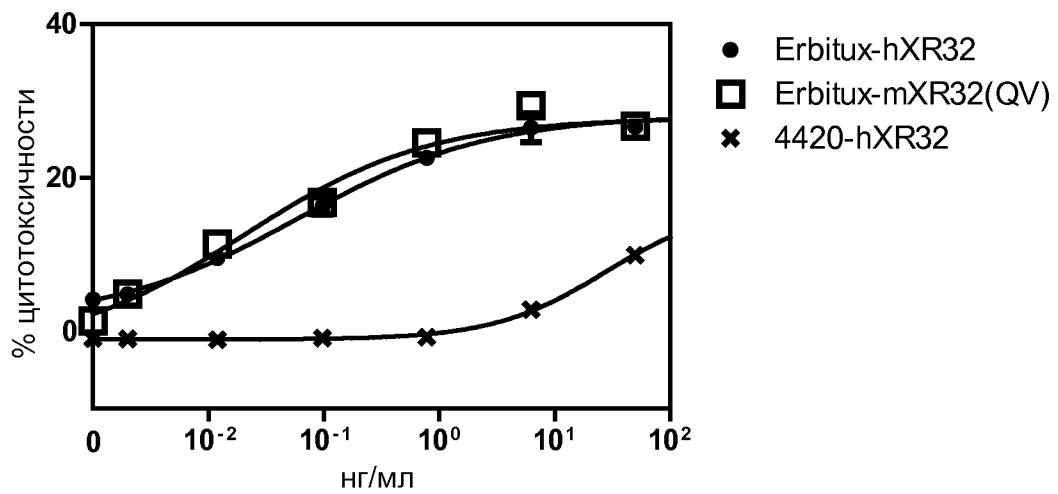
## Связывание с клетками A431



Фиг. 16С

## Перенаправленное уничтожение клеток A431

Е:Т 30:1



Фиг. 16D