



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.08.31(22) Дата подачи заявки
2014.08.20(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С grA33 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/869,528; 61/907,691; 13198859

(32) 2013.08.23; 2013.11.22; 2013.12.20

(33) US; US; EP

(86) PCT/US2014/051793

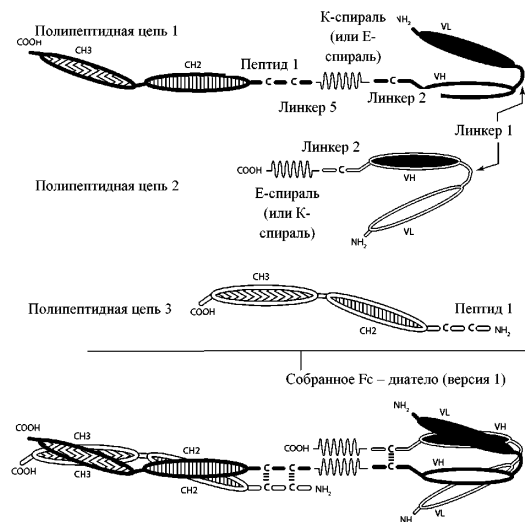
(87) WO 2015/026894 2015.02.26

(88) 2015.04.16

(71) Заявитель:
МАКРОДЖЕНИКС, ИНК. (US)(72) Изобретатель:
Мур Пол А., Ли Джонатан, Чэнь Франсин Чжифэнь, Джонсон Лесли С., Шах Калпана, Бонвини Эцио (US)(74) Представитель:
Карпенко О.Ю., Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Дементьев В.Н., Глухарёва А.О., Клюкин В.А., Строкова О.В., Христофоров А.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидные цепи и которые характеризуются наличием по меньшей мере одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа grA33 (т.е. "grA33 × CD3 биспецифическое моновалентное диатело"). Настоящее изобретение также относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат домен Fc иммуноглобулина ("биспецифические моновалентные Fc диатела") и состоят из трех полипептидных цепей и которые характеризуются наличием по меньшей мере одного сайта

связывания, специфического в отношении эпитопа grA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. "grA33 × CD3 биспецифическое моновалентное Fc-диатело"). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc-диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с grA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc-диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.



БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С gpA33 И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Ссылки на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с заявками на выдачу патентов США №№ 61/869528 (поданной 23 августа 2013 г.; в стадии рассмотрения) и 61/907691 (поданной 22 ноября 2013 г.; в стадии рассмотрения), и заявкой на выдачу Европейского патента № 13198859 (поданной 20 декабря 2013 г.), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает в себя один или несколько перечней последовательностей в соответствии с 37 C.F.R. 1.821 *et seq.*, которые раскрыты как на бумажном, так и на машиночитаемом носителе, и чьи бумажные и машиночитаемые раскрытия полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидных цепи и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического для эпитопа CD3 (т.е. “gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело”). Настоящее изобретение также относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат домен Fc иммуноглобулина (“биспецифические моновалентные Fc - диатела”) и состоит из трех полипептидных цепей и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. “gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное Fc - диатело”). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с gpA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc - диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

I. gpA33

Колоректальный рак принадлежит к числу самых распространенных злокачественных опухолей в западном мире и является ведущей причиной смертельных исходов, вызванных злокачественными опухолями (Silverberg, E. *et al.* (1989) “*Cancer Statistics, 1989*,” *CA Cancer J Clin.* 39(1):3-20). Одной потенциально применимой мишенью для рака толстой кишки является трансмембранный гликопротеин A33 с молекулярной массой 43 кДа (gpA33) ((Heath, J.K. *et al.* (1997) “*The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 94(2):469-474; Ritter, G. *et al.* (1997) “*Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(3):682-686). gpA33 был впервые открыт путем получения моноклональных мышинных антител против происходящей из карциномы поджелудочной железы человека клеточной линии ASPC1. Обнаружили, что одно антитело (MAb A33) реагировало с белком клеточной поверхности с молекулярной массой 43 кДа, который в связи с этим обозначили как “gpA33” (Wong, N.A. *et al.* (2006) “*EpCAM and gpA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia*,” *J. Clin. Pathol.* 59(3):260-263).

gpA33 представляет собой трансмембранный белок семейства адгезивных молекул, обеспечивающих межклеточный контакт; Abud, H.E. *et al.* (2000) “*The Murine A33 Antigen Is Expressed At Two Distinct Sites During Development, The ICM Of The Blastocyst and The Intestinal Epithelium*,” *Mech. Dev.* 98(1-2):111-114; Barendswaard, E.C. *et al.* (1998) “*Rapid and Specific Targeting Of Monoclonal Antibody A33 To A Colon Cancer Xenograft In Nude Mice*,” *Int. J. Oncol.* 12(1):45-53; Panjideh, H. *et al.* (2008) “*Biodistribution and Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer*,” *Int. J. Oncol.* 32(4):925-930). Несмотря на то, что функциональная значимость антигена A33 еще не выяснена, было показано, что он опосредует восстановление слизистой толстой кишки в животной модели колита и равномерно экспрессируется в >95% всех колоректальных карцином. Экспрессия A33 является равномерной в течение всех стадий заболевания, а также при любой степени гистологической дифференциации, и антиген не секретируется или не выделяется в кровотока обнаруживаемым образом (Infante, J.R. *et al.* (2013) “*Safety, Pharmacokinetics*

And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer,” Eur. J. Cancer. 49(6):1169-1175; Panjideh, H. et al. (2008) “*Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv::CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer,*” Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Напротив, было идентифицировано только несколько случаев экспрессии не относящегося к желудочно-кишечному тракту антигена A33 (Johnstone, C.N. et al. (2000) “*Characterization Of Mouse A33 Antigen, A Definitive Marker For Basolateral Surfaces Of Intestinal Epithelial Cells,*” Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 279(3):G500-G510).

В связи с тем, что экспрессия антигена A33 в высокой степени ограничена, исследователи изучали возможность лечения опосредованных A33 злокачественных опухолей с помощью антител (Infante, J.R. et al. (2013) “*Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer,*” Eur. J. Cancer. 49(6):1169-1175; Ackerman, M.E. et al. (2008) “*A33 Antigen Displays Persistent Surface Expression,*” Cancer Immunol. Immunother. 57(7):1017-1027; Barendswaard, E.C. et al. (2001) “*Relative Therapeutic Efficacy Of (125)I- And (131)I-Labeled Monoclonal Antibody A33 In A Human Colon Cancer Xenograft,*” J. Nucl. Med. 42(8):1251-1256; Carrasquillo, J.A. et al. (2011) “*(124)I-huA33 Antibody PET Of Colorectal Cancer,*” J. Nucl. Med. 52(8):1173-1180; Chong, G. et al. (2005) “*Phase I Trial Of 131I-HuA33 In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma,*” Clin. Cancer Res. 11(13):4818-4826; Deckert, P.M. et al. (2000) “*Pharmacokinetics And Microdistribution Of Polyethylene Glycol-Modified Humanized A33 Antibody Targeting Colon Cancer Xenografts,*” Int. J. Cancer. 87(3):382-390; Johnston, A.P. et al. (2012) “*Targeting Cancer Cells: Controlling The Binding And Internalization Of Antibody-Functionalized Capsules*” ACS Nano. 6(8):6667-6674; Koppe, M.J. et al. (2005) “*Radioimmunotherapy And Colorectal Cancer,*” Br. J. Surg. Mar;92(3):264-276; Sakamoto, J. et al. (2006) “*A Phase I Radioimmunolocalization Trial Of Humanized Monoclonal Antibody HuA33 In Patients With Gastric Carcinoma,*” Cancer Sci. 97(11):1248-1254; Scott, A.M. et al. (2005) “*A Phase I Trial Of Humanized Monoclonal Antibody A33 In Patients With Colorectal Carcinoma: Biodistribution, Pharmacokinetics, And Quantitative Tumor Uptake,*” Clin. Cancer Res. 11(13):4810-4817; Tschmelitsch, J. et al. (1997) “*Enhanced Antitumor Activity Of Combination Radioimmunotherapy (¹³¹I-Labeled Monoclonal Antibody A33) With Chemotherapy (Fluorouracil),*” Cancer Res. 57(11):2181-2186). Аналогично фрагменты таких антител также были исследованы в отношении их потенциальной терапевтической роли (Coelho, V. et al. (2007) “*Design, Construction, And In Vitro*

Analysis Of A33scFv::CD γ , A Recombinant Fusion Protein For Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy In Colon Cancer,” *Int. J. Oncol.* 31(4):951-957).

II. CD3

CD3 представляет собой Т - клеточный корцептор, состоящий из четырех различных цепей (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(4):a005140; pages 1-14; Chetty, R. et al. (1994) “*CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice,*” *J. Pathol.* 173:303-307).

У млекопитающих комплекс CD3 содержит цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Указанные цепи связываются с молекулой, известной как Т - клеточный рецептор (TCR), для создания сигнала активации в Т - лимфоцитах. При отсутствии CD3 не происходит правильная сборка TCR, и они распадаются (Thomas, S. et al. (2010) “*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer,*” *Immunology* 129(2):170–177). CD3 обнаружен связанным с мембранами всех зрелых Т - клеток и практически ни с каким другим типом клеток (см. Janeway, C.A. et al. (2005) *B: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE,*” 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216; Sun, Z. J. et al. (2001) “*Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer,*” *Cell* 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) “*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex,*” *Immunity.* 2006 Feb;24(2):133-139).

III. Биспецифические диатела

Способность интактного, немодифицированного антитела (например, IgG) связывать эпитоп антигена зависит от присутствия вариабельных доменов на легких и тяжелых цепях иммуноглобулина (т.е. доменов VL и VH, соответственно). Конструкция диатела основана на одноцепочечном конструкторе Fv (scFv) (см., например, Holliger et al. (1993) “*‘Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,*” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448; патентную публикацию США № 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like*

Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Olafsen, T. *et al.* (2004) “*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*,” Protein Eng. Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. *et al.* (2001) “*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*,” Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano *et al.* (2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region*,” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) “*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*,” Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Взаимодействие легкой цепи антитела и тяжелой цепи антитела и, в частности, взаимодействие его доменов VL и VH формирует один из сайтов связывания с эпитопом антитела. Напротив, конструктор scFv содержит домен VL и VH антитела, содержащиеся в одной полипептидной цепи, причем в домены отделены гибким линкером, длина которого достаточна для обеспечения возможности самосборки двух доменов в функциональный сайт связывания с эпитопом. Если самосборка доменов VL и VH становится невозможной вследствие недостаточной длины линкера (меньше чем приблизительно 12 аминокислотных остатков), два конструктора scFv взаимодействуют друг с другом с образованием бивалентной молекулы, в которой VL одной цепи ассоциируются с VH другой (рассмотрено в Marvin *et al.* (2005) “*Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies*,” Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Природные антитела способны связываться только с одним видом эпитопов (т.е. являются моноспецифическими), хотя они могут связываться с множественными копиями этого вида (т.е. проявляя бивалентность или мультивалентность). В известном уровне техники сообщалось о способности производить диатела, которые отличаются от таких природных антител в том, что они способны связывать два или больше различных видов эпитопов (т.е. проявляя биспецифичность или мультиспецифичность в дополнение к бивалентности или мультивалентности) (см., например, Holliger *et al.* (1993) “*‘Diabodies’: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger *et al.*); US 2004/0220388 (Mertens *et al.*); Alt *et al.* (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. *et al.* (2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*,” J. Biol.

Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens *et al.*); Mertens, N. *et al.*, “*New Recombinant Bi- and Trispecific Antibody Derivatives*,” In: NOVEL FRONTIERS IN THE PRODUCTION OF COMPOUNDS FOR BIOMEDICAL USE, A. VanBroekhoven *et al.* (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208; Wu, A. *et al.* (2001) “*Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange*,” Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano *et al.* (2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region*,” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. *et al.* (2009) “*Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy*,” Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Обеспечение не моноспецифическими диателами предоставляет существенное преимущество: способность колигирования и колокализации клеток, которые экспрессируют различные эпитопы. Таким образом, бивалентные диатела характеризуются широким диапазоном применений, включая в себя терапию и иммунодиагностику. Бивалентность обеспечивает возможность большой гибкости в конструировании и разработке диатела в различных применениях, обеспечивая повышенную авидность в отношении мультимерных антигенов, перекрестную сшивку различных антигенов и направленное нацеленное воздействие на конкретные типы клеток на основании присутствия обоих целевых антигенов. В связи с их повышенной валентностью низкие скорости диссоциации и быстрое выведение из циркуляции (для диател небольшого размера, составляющего ~50 кДа или ниже), известные в настоящей области техники молекулы диател также продемонстрировали конкретное применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald *et al.* (1997) “*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*,” Protein Eng. 10:1221). Особое значение представляет колигирование различных клеток, например, перекрестная сшивка цитотоксических Т - клеток с опухолевыми клетками (Staerz *et al.* (1985) “*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*,” Nature 314:628-631, and Holliger *et al.* (1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” Protein Eng. 9:299-305).

Домены связывания с эпитопом диатела также могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной эффекторной клетки, такой как CD3, CD16, CD32 или CD64, которые экспрессируются на Т - лимфоцитах, клетках - естественных киллерах (NK) или других мононуклеарных клетках. Во многих

исследованиях также обнаружили, что связывание диатела с детерминантами эффекторных клеток, например, рецепторами Fc γ (Fc γ R), активирует эффекторную клетку (Holliger *et al.* (1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger *et al.* (1999) “*Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins*,” *Cancer Res.* 59:2909-2916; международные патентные публикации №№ WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Как правило, активация эффекторных клеток запускается связыванием антигена, связанного антителом, с эффекторной клеткой посредством взаимодействия Fc-Fc γ R; таким образом, в связи с этим, молекулы диател согласно настоящему изобретению могут проявлять Ig-подобную функциональность, независимо от того, содержат ли они домен Fc (например, согласно результатам любого анализа эффекторной функции, известного в настоящей области техники или представленного в качестве примера в настоящем документе (например, анализа ADCC)). Путем перекрестной сшивки опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторную клетку в пространственную близость относительно опухолевых клеток, но приводит к эффективному лизису опухолевых клеток (см., например, Cao *et al.* (2003) “*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*,” *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197).

Тем не менее, вышеперечисленные преимущества сталкиваются с существенной стоимостью. Образование таких не моноспецифических диател требует успешной сборки двух или больше отдельных и различных полипептидов (т.е. такое образование требует, чтобы диатела образовывались посредством гетеродимеризации различных видов полипептидных цепей). Этот факт контрастирует с моноспецифическими диателами, которые образуются посредством гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поскольку необходимо предоставить по меньшей мере два несходных полипептида (т.е. два вида полипептидов) для образования не моноспецифического диатела, и поскольку гомодимеризация таких полипептидов приводит к неактивным молекулам (Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” *Protein Eng.* 13(8):583-588), получение таких полипептидов должно осуществляться таким путем, который предотвратит образование ковалентных связей между полипептидами одного и того же вида (Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” *Protein Eng.* 13(8):583-588). В связи с

этим в настоящей области техники раскрыто нековалентное связывание таких полипептидов (см., например, Olafsen *et al.* (2004) “*Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications*,” Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano *et al.* (2004) “*A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region*,” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. *et al.* (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. *et al.* (2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Тем не менее, в настоящей области техники установлено, что биспецифические моновалентные диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов, являются нестабильными и легко диссоциируются до нефункциональных мономеров (см. например, Lu, D. *et al.* (2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Ввиду такой проблемы, в настоящей области техники добились успеха в разработке стабильных, ковалентно связанных гетеродимерных не моноспецифических диател (см., например, международные патентные публикации №№ WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. *et al.* (2010) “*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion*,” J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. *et al.* (2010) “*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold*,” Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. *et al.* (2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma*,” Blood 117(17):4542-4551; патентные публикации США №№ 2012/0294796 и 2013/0149236). Такие подходы предусматривают конструирование одного или нескольких цистеиновых остатков в каждом из используемых видов полипептидов. Например, было показано, что добавление цистеинового остатка к С-концу таких конструкторов обеспечивает образование дисульфидной связи между полипептидными цепями, стабилизируя полученный гетеродимер, не создавая помехи для характеристик связывания бивалентной молекулы.

Были описаны диатела и другие иммуноглобулины, предположительно характеризующиеся специфичностью в отношении любого или обоих из gpA33 и CD3 (см., например, патентные публикации США №№ 2012/0014957; 2012/0034160; 2012/0087858; 2012/0189541; 2012/0195900; 2012/0201746; 2012/0237442; 2012/0263722; 2012/0258108 и 2012/0276608).

Несмотря на такой успех, получение стабильных, функциональных гетеродимерных, не моноспецифических диател может быть дополнительно усовершенствовано путем тщательного рассмотрения и размещения используемых доменов в полипептидных цепях. Таким образом, настоящее изобретение относится к предоставлению специфических полипептидов, которые детально разработаны для получения, посредством связывания ковалентной связью, гетеродимерных диател и гетеродимерных Fc - диател, которые способны одновременно связывать gpA33 и CD3.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к “gpA33 x CD3 биспецифическим моновалентным диателам”. Согласно конкретным вариантам осуществления диатела согласно настоящему изобретению дополнительно содержат домен Fc - области иммуноглобулина (т.е. “домен Fc”) (“gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела”) или альбуминсвязывающий домен (“ABD”) (“gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела с ABD”) для увеличения периода полужизни *in vivo*. gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению и gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению содержат две различных полипептидных цепи, которые ассоциируются друг с другом гетеродимерным образом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Таким образом, gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела и gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению являются моновалентными в том смысле, что они способны связываться только с одной копией эпитопа gpA33 и только с одной копией эпитопа CD3, но являются биспецифическими в том смысле, что одно диатело способно связываться одновременно с эпитопом gpA33 и с эпитопом CD3.

gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению состоят из двух полипептидных цепей (“первой” и “второй”

полипептидной цепи), которые ковалентно связаны друг с другом, например, с помощью связывания дисульфидным мостиком цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. grA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению состоят из трех полипептидных цепей (“первой”, “второй” и “третьей” полипептидной цепи), причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом. Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с grA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к таким grA33 x CD3 биспецифическим моновалентным диателам и grA33 x CD3 биспецифическим моновалентным Fc - диателам и к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc - диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

В частности, согласно настоящему изобретению предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело, причем биспецифическое моновалентное диатело способно специфически связываться с эпитопом grA33 и с эпитопом CD3, причем биспецифическое моновалентное диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
 - i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (SEQ ID NO:5); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с grA33 (VH_{grA33}) (SEQ ID NO:27); причем субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (SEQ ID NO:1);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой К-спиральный домен (SEQ ID NO:4) или Е-спиральный домен (SEQ ID NO:3), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (SEQ ID NO:2);

- В. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий субдомен (1А), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**), и субдомен (1В), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), причем субдомены (1А) и (1В) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и причем домен 2 первой полипептидной цепи и домен 2 второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена;

и при этом:

- (a) домен VL первой полипептидной цепи и домен VH второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (b) домен VH первой полипептидной цепи и домен VL второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом gpA33.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрен вариант осуществления описанного выше биспецифического моновалентного диатела, в котором первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь содержит альбуминсвязывающий домен (**SEQ ID NO:34**), соединенный на C-конце с доменом 2 или на N-конце с доменом 1А посредством линкера 3 (**SEQ ID NO:32**).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc - диатело, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело способно специфически связываться с эпитопом gpA33 и с эпитопом CD3, и обладает доменом Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третьей полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), причем субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и
 - iii. домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит а цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**) и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG; причем домены 3 и 2 отделены друг от друга спейсерным пептидом (линкером 5) (**SEQ ID NO:33**);
- B. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); причем субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
 - ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**) или E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и причем домен 2 первой полипептидной цепи и домен 2 второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и
- C. третья полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу, домен 3, содержащий:

- (1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**); и
- (2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

и при этом:

- (a) полипептидные части доменов Fc IgG первой и третьей полипептидной цепи образуют домен Fc IgG;
- (b) домен VL первой полипептидной цепи и домен VH второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (c) домен VH первой полипептидной цепи и домен VL второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом gpA33.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc - диатело, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело способно специфически связываться с эпитопом gpA33 и с эпитопом CD3 и обладает доменом Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и первая и третьей полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
 - i. домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**) и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;
 - ii. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VL_{gpA33}) (**SEQ ID NO:26**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с

- CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), причем субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**); причем домены 1 и 3 отделены друг от друга спейсерным пептидом (линкером 4) (**SEQ ID NO:38**);
- iii. домен 2, причем домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и
- B. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); причем субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
- ii. домен 2, причем домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**) или E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**), причем домен 2 отделен от домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и причем домен 2 первой полипептидной цепи и домен 2 второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и
- C. третья полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу, домен 3, содержащий:
- (1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**); и
- (2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;
- и при этом:
- (a) полипептидные части доменов Fc IgG первой и третьей полипептидной цепи образуют домен Fc IgG;

- (b) домен VL первой полипептидной цепи и домен VH второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (c) домен VH первой полипептидной цепи и домен VL второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом gpA33.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены варианты осуществления любого из описанных выше биспецифических моновалентных Fc – диател, в которых субдомен (3B) первой полипептидной цепи содержит последовательность, отличную от последовательности субдомена (3B) третьей полипептидной цепи.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены варианты осуществления описанных выше биспецифических моновалентных Fc – диател, в которых субдомен (3B) первой полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:40**, и субдомен (3B) третьей полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:41**.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены варианты осуществления описанных выше биспецифических моновалентных Fc – диател, в которых субдомен (3B) первой полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:41**, и субдомен (3B) третьей полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:40**.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены варианты осуществления описанных выше биспецифических моновалентных Fc – диател, в которых домен 3 первой полипептидной цепи и/или домен 3 третьей полипептидной цепи содержит вариантную последовательность CH2-CH3, которая проявляет измененное связывание с рецептором Fcγ.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены варианты осуществления любого из описанных выше биспецифических моновалентных диател или любого из описанных выше биспецифических моновалентных Fc - диател, в которых домен 2 первой полипептидной цепи содержит E-спираль (**SEQ ID NO:3**), и домен 2 второй полипептидной цепи содержит K-спираль (**SEQ ID NO:4**).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрены варианты осуществления любого из описанных выше биспецифические моновалентные диатела или любого из описанных выше биспецифические моновалентные Fc - диатела, в

которых домен 2 первой полипептидной цепи содержит К-спираль (**SEQ ID NO:4**), и домен 2 второй полипептидной цепи содержит Е-спираль (**SEQ ID NO:3**).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное диатело, причем биспецифическое моновалентное диатело способно специфически связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом grA33, причем биспецифическое моновалентное диатело содержит следующее:

- (1) первая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:28**, и вторая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:30**; или
- (2) первая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:35**, и вторая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:30**;

причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидной связью.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено биспецифическое моновалентное Fc - диатело, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело способно специфически связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом grA33 и обладает доменом Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело содержит следующее:

- (1) первая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:42**, вторая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:44**, и третья полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:46**; или
- (2) первая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:48**, вторая полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:28**, и третья полипептидная цепь, характеризующаяся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:46**;

причем первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом первой дисульфидной связью, и первая и третьей полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом второй дисульфидной связью.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая любое из описанных выше биспецифических моновалентных диател или любое из описанных выше биспецифических моновалентных Fc - диател; и физиологически приемлемый носитель.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрено применение описанной выше фармацевтической композиции в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией gpA33, и, главным образом, такое применение, при котором злокачественная опухоль представляет собой колоректальный рак, рак толстой кишки, рак желудка или рак поджелудочной железы.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрена клетка, которая экспрессирует полипептидную цепь любого из описанных выше биспецифических моновалентных диател или любого из описанных выше биспецифических моновалентных Fc - диател, а также полинуклеотид, который кодирует такой экспрессированный полипептид.

Согласно настоящему изобретению дополнительно предусмотрена клетка, которая экспрессирует антитело или его полипептидную часть или фрагмент, причем антитело связывается с gpA33, и при этом антитело или его полипептидная часть или фрагмент содержит:

- (1) CDR1 (SEQ ID NO:14), CDR2 (SEQ ID NO:15) и CDR3 (SEQ ID NO:16) легкой цепи антитела к gpA33 человека;
- (2) CDR1 (SEQ ID NO:18), CDR2 (SEQ ID NO:19) и CDR3 (SEQ ID NO:20) тяжелой цепи антитела к gpA33 человека; или
- (3) как (1), так и (2).

Краткое описание графических материалов

На **фигуре 1** проиллюстрированы структуры первой и второй полипептидных цепей двухцепочечного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела согласно настоящему изобретению.

На **фигурах 2А и 2В** проиллюстрированы структуры двух версий первой, второй и третьей полипептидных цепей трехцепочечного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного Fc - диатела согласно настоящему изобретению (версия 1, **фигура 2А**; версия 2, **фигура 2В**).

На **фигуре 3** продемонстрировано, что диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с CD3 и с gpA33.

На **фигуре 4** проиллюстрирована способность диател согласно настоящему изобретению лечить злокачественную опухоль. Клетки колоректального рака или клетки рака поджелудочной железы инкубировали в присутствии gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (“DART-1) и или PBMC человека (E:T = 25:1), или активированных Т-клеток человека (E:T = 10:1), и измеряли цитотоксичность (**фигура 4A** (клетки колоректального рака Colon CSCL), **фигура 4B** (клетки колоректального рака Colo205), и **фигура 4C** (клетки рака поджелудочной железы ASPC-1).

На **фигурах 5A-5F** показано, что активация Т-клеток CD8 происходила в присутствии биспецифического моновалентного диатела к CD3 (“DART-1) только в присутствии злокачественные клетки (**фигуры 5A-5C**: CD8 Т-клетки + клетки colo205 (**фигура 5A**), Т-клетки CD8 + клетки ASPC-1 (**фигура 5B**), Т-клетки CD8 отдельно (**фигура 5C**); **фигуры 5D-5F**: Т-клетки CD4 + клетки colo205 (**фигура 5D**), Т-клетки CD4+ клетки ASPC-1 (**фигура 5E**), Т-клетки CD8 отдельно (**фигура 5F**).

На **фигурах 6A-6D** показано, что gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела (DART-1 и DART-2) опосредовали эквивалентную цитотоксичность в отношении клеток колоректальной аденокарциномы SW948 (**фигура 6A**) и клеток colo205 (**фигура 6B**) и клеток Colo205-Luc (**фигура 6C**), и что ни одно диатело не опосредовало цитотоксичность gpA33-отрицательной клеточной линии злокачественной опухоли, HCT116 (**фигура 6D**).

На **фигурах 7A-7D** показана способность gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2), gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен (DART-2 с ABD “w/ABD”) и gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (DART-2 с Fc “w/Fc”) стимулировать цитотоксичность злокачественных клеток в присутствии PBMC человека или яванского макака.

На **фигуре 8** продемонстрирована *in vivo* способность gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1) уменьшать объем опухоли в мышинной модели рака толстой кишки Colo205.

На **фигурах 9A-9D** показаны данные сцинтиграфии опухолей у мышей NOD (страдающих диабетом без ожирения) scid (с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью) гамма (NSG), которым имплантировали клетки Colo205 через два

дня после получения инертного носителя (**фигура 9A**) или grA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-1) (**фигура 9B**), и через 12 дней после получения инертного носителя (**фигура 9C**) или DART-1 (**фигура 9D**).

На **фигуре 10** продемонстрирована *in vivo* способность grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1) уменьшать объем опухоли в мышинной модели рака поджелудочной железы ASPC-1.

На **фигуре 11** показана способность grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (версия 1DART-2 w/Fc) опосредовать резкое снижение объема опухоли в *in vivo* модели рака толстой кишки.

На **фигуре 12** показана способность grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (версия 1DART-2 w/Fc) опосредовать снижение объема опухоли в *in vivo* модели рака толстой кишки даже в крайне низких дозах.

На **фигуре 13** показана фармакокинетика grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2) и grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc иммуноглобулина IgG (версия 1DART-2 w/Fc) у яванских макак.

На **фигурах 14A-14B** показан анализ SPR связывания версии 1 DART-2 w/Fc с иммобилизированным CD3 человека и яванского макака. Черные пунктирные линии представляют глобальную аппроксимацию 1:1 модели Ленгмюра кривых связывания, полученных при концентрациях DART-2 w/Fc, составляющих 0, 6,25, 12,5, 25, 50 или 100 нМ. Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

На **фигурах 15A-15B** показан анализ SPR связывания версии 1 DART-2 w/Fc с захваченным grA33 человека и яванского макака. Черные пунктирные линии представляют глобальную аппроксимацию 1:1 модели Ленгмюра кривых связывания, полученных при концентрации версии 1 DART-2 w/Fc, составляющей 0, 6,25, 12,5, 25, 50 или 100 нМ. Данные являются репрезентативными для трех независимых экспериментов.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат две полипептидных цепи и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа grA33, и

одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. “gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело”). Настоящее изобретение также относится к биспецифическим моновалентным диателам, которые содержат домен Fc иммуноглобулина (“биспецифические моновалентные Fc - диатела”) и состоят из трех полипептидных цепей и которые характеризуются наличием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3 (т.е. а “gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное Fc - диатело”). Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению способны одновременно связываться с gpA33 и CD3. Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат такие биспецифические моновалентные диатела или такие биспецифические моновалентные Fc - диатела. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам применения таких диател в лечении злокачественной опухоли и других заболеваний и состояний.

gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению состоят из двух полипептидных цепей, которые ассоциируются друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа gpA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Отдельные полипептидные цепи диатела ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Каждая полипептидная цепь содержит антигенсвязывающий домен варибельного домена легкой цепи, антигенсвязывающий домен варибельного домена тяжелой цепи и домен гетеродимеризации. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антигенсвязывающий домен варибельного домена легкой цепи от антигенсвязывающего домена варибельного домена тяжелой цепи. Антигенсвязывающий домен варибельного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом варибельного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или gpA33, или CD3). Аналогично, антигенсвязывающий домен варибельного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом варибельного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго

антигена (т.е. или grA33, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор антигенсвязывающего домена переменного домена легкой цепи и антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидных цепи совместно содержали антигенсвязывающие домены переменных доменов легкой и тяжелой цепи, способные связываться с grA33 и CD3.

grA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению состоят из первой полипептидной цепи, второй полипептидной цепи и третьей полипептидной цепи. Первая и вторая полипептидные цепи ассоциируются друг с другом с образованием одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа grA33, и одного сайта связывания, специфического в отношении эпитопа CD3. Первая полипептидная цепь и третья полипептидная цепь ассоциируются друг с другом с образованием домена Fc иммуноглобулина. Первая и вторая полипептидные цепи биспецифического моновалентного Fc - диатела ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Первая и третьей полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах каждой полипептидной цепи. Каждая из первой и второй полипептидных цепей содержит антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи, антигенсвязывающий домен переменного домена тяжелой цепи и домен гетеродимеризации. Промежуточный линкерный пептид (линкер 1) отделяет антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи от антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи. Антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи первой полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи второй полипептидной цепи с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или grA33, или CD3). Аналогично, антигенсвязывающий домен переменного домена легкой цепи второй полипептидной цепи взаимодействует с антигенсвязывающим доменом переменного домена тяжелой цепи первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или grA33, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор

антигенсвязывающего домена переменного домена легкой цепи и антигенсвязывающего домена переменного домена тяжелой цепи первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидных цепи совместно содержали антигенсвязывающие домены переменных доменов легкой и тяжелой цепи, способные связываться с gpA33 и CD3. Каждая из первой и третьей полипептидных цепей содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) **SEQ ID NO:39**; и частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полного домена Fc иммуноглобулина и цистеинсодержащий пептид. Некоторая часть или весь домен CH2 и/или некоторая часть или весь домен CH3 ассоциируются с образованием домена Fc иммуноглобулина биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению. Первая и третья полипептидные цепи биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению ковалентно связаны друг с другом, например, путем связывания дисульфидной связью цистеиновых остатков, расположенных в пределах цистеинсодержащего пептида полипептидных цепей.

Образование гетеродимеров первой и второй полипептидных цепей биспецифического моновалентного диатела или биспецифического моновалентного Fc – диатела может управляться доменами гетеродимеризации. Такие домены включают в себя GVEPKSC (**SEQ ID NO:54**) (или VEPKSC; **SEQ ID NO:55**) на одной полипептидной цепи и GFNRGEC (**SEQ ID NO:56**) (или FNRGEC; **SEQ ID NO:57**) на другой полипептидной цепи (US2007/0004909). Альтернативно, такие домены могут быть сконструированы так, чтобы они содержали спирали противоположных зарядов. Домен гетеродимеризации одной из полипептидных цепей содержит последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми положительно заряженных аминокислот, и домен гетеродимеризации другой полипептидной цепи содержит последовательность по меньшей мере из шести, по меньшей мере из семи или по меньшей мере из восьми отрицательно заряженных аминокислот. Например, первый или второй домен гетеродимеризации может содержать последовательность, содержащую восемь положительно заряженных аминокислот, и другие из доменов гетеродимеризации могут содержать последовательность, содержащую восемь отрицательно заряженных аминокислот. Положительно заряженная аминокислота может представлять собой лизин, аргинин, гистидин и т.д. и/или отрицательно заряженная аминокислота может представлять собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и т.д.

Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой лизин и/или отрицательно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой глутаминовую кислоту.

Биспецифические моновалентные диатела и биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению сконструированы так, чтобы такие первые и вторые полипептидные цепи были ковалентно связаны друг с другом посредством цистеиновых остатков вдоль их длины. Такие цистеиновые остатки могут быть введены в промежуточный линкер, который отделяет домены VL и VH полипептидов. Альтернативно и более предпочтительно, второй пептид (линкер 2) введен в каждую из полипептидных цепей, например, на амино-конце полипептидных цепей или в положении, которое помещает линкер 2 между доменом гетеродимеризации и антигенсвязывающим доменом варибельного домена легкой цепи или варибельного домена тяжелой цепи.

Как указано выше, gpA33 экспрессируется клетками колоректального рака. Антитела, способные иммуноспецифически связываться с gpA33, способны связываться с такими клетками. CD3 экспрессируется на Т-клетках. Таким образом, антитела, способные иммуноспецифически связываться как с gpA33, так и с CD3, способны направлять Т-клетки на клетки колоректального рака и другие злокачественные клетки, которые экспрессируют gpA33 (например, клетки карциномы толстой кишки, клетки рака поджелудочной железы и т.д.) и, таким образом, обеспечивать улучшенную терапию для таких злокачественных опухолей.

I. Предпочтительные gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела согласно настоящему изобретению

A. gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предусмотрены gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела, которые состоят из первой полипептидной цепи и второй полипептидной цепи, чьи последовательности позволяют полипептидным цепям ковалентно связаться друг с другом с образованием ковалентно-ассоциированного комплекса, который способен одновременно связываться как с gpA33, так и CD3.

Первая полипептидная цепь предпочтительных gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател содержит, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с CD3, или с gpA33 (т.е.

или VL_{CD3} , или VL_{gpA33}), первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD3}), или с CD3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{gpA33}), цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен и С-конец (**фигура 1**).

Вторая полипептидная цепь предпочтительных gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател содержит, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL_{gpA33} , или VL_{CD3} , в зависимости от домена VL, выбранного для первой полипептидной цепи диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться ли с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{gpA33}), или с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{CD3}), цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен и С-конец (**фигура 1**).

Домен VL первой полипептидной цепи предпочтительных gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател взаимодействует с доменом VH второй полипептидной цепи предпочтительных gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател с образованием первого функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении первого антигена (т.е. или CD3, или gpA33). Аналогично, домен VL второй полипептидной цепи взаимодействует с доменом VH первой полипептидной цепи с образованием второго функционального антигенсвязывающего сайта, который является специфическим в отношении второго антигена (т.е. или gpA33, или CD3, в зависимости от идентичности первого антигена). Таким образом, выбор доменов VL и VH первой и второй полипептидных цепей скоординирован так, чтобы две полипептидных цепи предпочтительных gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател совместно содержали домены VL и VH, способные связываться с gpA33 и CD3 (т.е. они содержат VL_{CD3}/VH_{CD3} и VL_{gpA33}/VH_{gpA33}).

Длина промежуточного линкерного пептида (линкера 1, который отделяет такие домены VL и VH) наиболее предпочтительно выбрана так, чтобы существенно или полностью предотвращать связывание доменов VL и VH полипептидной цепи друг с другом. Таким образом, домены VL и VH первой полипептидной цепи существенно или полностью не способны связываться друг с другом. Аналогично, домены VL и VH

второй полипептидной цепи существенно или полностью не способны связываться друг с другом. Предпочтительный промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) характеризуется последовательностью (**SEQ ID NO:1**): GGGSGGGG.

Цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) будет содержать 1, 2, 3 или больше цистеинов. Предпочтительный цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:2**: GGCGGG.

Стимулирующие образование гетеродимера домены первого и второго полипептидов отличаются друг от друга и сконструированы, чтобы ассоциироваться друг с другом так, чтобы стимулировать ассоциацию первой и второй полипептидных цепей. Таким образом, согласно предпочтительному варианту осуществления одна из этих полипептидных цепей будет сконструирована, чтобы содержать стимулирующий образование гетеродимера “Е-спиральный” домен (**SEQ ID NO:3**):

EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

чьи остатки будут формировать отрицательный заряд при pH 7, тогда как другая из двух полипептидных цепей буде сконструирована так, чтобы содержать стимулирующий образование гетеродимера “К-спиральный” домен (**SEQ ID NO:4**):

KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

чьи остатки будут формировать положительный заряд при pH 7. Присутствие таких заряженных доменов стимулирует ассоциацию между первым и вторым полипептидами и, таким образом, способствует гетеродимеризации. Несущественно, какая спираль обеспечивается какой цепью, при условии, что спирали, используемые на первой и второй полипептидных цепях различаются так, чтобы способствовать гетеродимеризации между такими цепями.

1. gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, “DART-1”

Первая и вторая полипептидные цепи предпочтительного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, обозначенного в настоящем документе как “DART-1”, содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями:

Домен VL антитела, которое связывает CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**):

QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQOKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTIITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Антигенсвязывающий домен VL_{CD3} содержит CDR1 с последовательностью: **(SEQ ID NO:6)** RSSTGAVTTSNYAN; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:7)**: GTNKRAP; и CDR3 с последовательностью **(SEQ ID NO:8)**: ALWYSNLWV.

Домен VH антитела, которое связывает CD3 (VH_{CD3}) **(SEQ ID NO:9)**:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGL
VTVSS

Антигенсвязывающий домен VH_{CD3} содержит: CDR1 с последовательностью **(SEQ ID NO:10)**: TYAMN; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:11)** RIRSKYNNYATYYADSVKD; и CDR3 с последовательностью **(SEQ ID NO:12)**: HGNFGNSYVSWFAY.

Домен VL мышиноного антитела, которое связывает gpA33 (VL_{gpA33}) **(SEQ ID NO:13)**:

QIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELK

Антигенсвязывающий домен VL_{gpA33} содержит CDR1 с последовательностью **(SEQ ID NO:14)**: SARSSISFMY; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:15)**: DTSNLAS; и CDR3 с последовательностью **(SEQ ID NO:16)**: QQWSSYPLT.

Домен VH мышиноного антитела, которое связывает gpA33 (VH_{gpA33}) **(SEQ ID NO:17)**:

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGETNY
NGKFKDKATLTADKSSTTAYMELSSLTSDSAVYFCARIYGNNVYFDVWVWAGTTVTVSS

Антигенсвязывающий домен VH_{gpA33} содержит CDR1 с последовательностью **(SEQ ID NO:18)**: GSWMN; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:19)**: RIYPGDGETNYNGKFKD; и CDR3 с последовательностью **(SEQ ID NO:20)**: IYGNNVYFDV.

Первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) характеризуется последовательностью **(SEQ ID NO:1)**: GGGSGGGG. Цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:2**: GGCGGG.

Стимулирующий образование гетеродимера домен первой полипептидной цепи представляет собой “Е-спиральный” домен **(SEQ ID NO:3)**. Стимулирующий образование гетеродимера домен второй полипептидной цепи представляет собой “К-спиральный” домен **(SEQ ID NO:4)**.

Таким образом, первая полипептидная цепь DART-1 характеризуется последовательностью (**SEQ ID NO:21**):

QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTIITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQV
QLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG
KFKDKATLTADKSSTTAYMELSSLTSDSAVYFCARIYGNNVYFDVWGAGTTVTVSSGGC
GGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Следует принимать во внимание, что остатки 1-110 **SEQ ID NO:21** представляют собой домен VL антитела, которое связывает CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**); остатки 111-118 **SEQ ID NO:21** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 119-237 **SEQ ID NO:21** представляют собой домен VH мышинового антитела, которое связывает gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:17**), остатки 238-243 **SEQ ID NO:21** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**) и остатки 244-271 **SEQ ID NO:21** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “Е-спиральный” домен (**SEQ ID NO:3**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь DART-1, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:22**):

caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccctg
acatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgacagcag
aagccaggacaggcaccsaaggggcctgatcgggggtacaaacaaaagggtccctggacc
cctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattaccggggca
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc
gggggtggcacaactgactgtgctgggaggtggatccggcggagggtggacaggctc
cagctgcagcagctctggacctgagctggtgaagcctggggcctcagtgaaatctcctgc
aaagcttcaggctacacattcagtggtctcttgatgaactgggtgaagcagaggcctgga
cagggtcttgagtggattggacggatctaccctggagatggagaaactaactacaatggg
aagtttaaggacaaggccacactgactgcagacaaatcatccaccacagcctacatggag
ctcagcagcctgacctctgtggactctgcggtctatctctgtgcaagaatctatggtaat
aacgtttacttctgatgtctggggcgcaggaccacgggtcaccgtgtcttccggaggatgt
ggcgggtggagaagtggccgactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgct
gcacttgaagaggaggtcgcagccctggagaaa

Вторая полипептидная цепь DART-1 характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:23**):

QIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSARSSISFMYWYQOKPGSSPRLLIYDTSNLSGVPVR
FSGSGSGTSYSLTISRMEAEADAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELKRGGSGGGGEVQLV
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADS
VKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS
GGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Следует принимать во внимание, что остатки 1-107 **SEQ ID NO:23** представляют собой домен VL мышинового антитела, которое связывает gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:13**); остатки 108-115 **SEQ ID NO:23** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 116-240 **SEQ ID NO:23** представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:9**), остатки 241-246 **SEQ ID NO:23** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**) и остатки 247-274 **SEQ ID NO:23** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “К-спиральный” домен (**SEQ ID NO:4**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь DART-1, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:24**):

```

Саааттгтттсacccagtctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaggggtcacc
atgacctgcagtgccagggtcaagtataagtttcatgtactgggtaccagcagaagccagga
tcctccccagactcctgatttatgacacatccaacctggcttctggagtccctgttcgc
ttcagtggcagtgggtctgggacctcttattctctcacaatcagccgaatggagggtgaa
gatgctgccacttattactgccagcagtggagttagttaccactcacgttcggttctggg
accaagctggagctgaaacgggggtggaggatccggcggaggcggagaggtgcagctgggtg
gagtctgggggaggcttgggtccagcctggagggtccctgagactctctgtgcagcctct
ggattcaccttcaacacatacgtatgaattgggtccgccagggtccagggaaaggggtg
gagtgggttgcaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactct
gtgaaggatagattcaccatctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatg
aacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggc
aattcttacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttcc
ggaggatgtggcggtggaaaagtggccgactgaaggagaaagttgctgctttgaaagag
aaggctcgccgacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

```

2. gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, “DART-2”

Первая и вторая полипептидные цепи второго предпочтительного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, обозначенного в настоящем документе как “DART-2,” содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями:

Домен VL антитела, которое связывает CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**):

```

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTIITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

```

Антигенсвязывающий домен **VL_{CD3}** содержит CDR1 с последовательностью: (**SEQ ID NO:6**) RSSTGAVTTSNYAN; CDR2 с последовательностью (**SEQ ID NO:7**): GTNKRAP; и CDR3 с последовательностью (**SEQ ID NO:8**): ALWYSNLWV

Домен VH антитела, которое связывает CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIIRSKYNNYAT
YYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL
VTVSS

Антигенсвязывающий домен VH_{CD3} содержит CDR1 с последовательностью **(SEQ ID NO:10)**: TYAMN; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:11)**: RIRSKYNNYATYYADSVKD; и CDR3 с последовательностью:**(SEQ ID NO:12)** HGNFGNSYVSWFAY.

Обсуждаемое выше мышинное антитело, которое связывается с gpA33 человека, гуманизировали для получения доменов VL и VH предпочтительного диатела DART-2. Указанные гуманизированные домены представлены ниже:

Домен VL гуманизированного антитела, которое связывает gpA33 (VL_{gpA33}) **(SEQ ID NO:26)**:

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSELEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK

Антигенсвязывающий домен VL_{gpA33} содержит CDR1 с последовательностью **(SEQ ID NO:14)**: SARSSISFMY; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:15)**: DTSNLAG; и CDR3 с последовательностью **(SEQ ID NO:16)**: QQWSSYPLT.

Домен VH гуманизированного антитела, которое связывает gpA33 (VH_{gpA33}) **(SEQ ID NO:27)**:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNY
NGKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTITVTVSS

Антигенсвязывающий домен VH_{gpA33} содержит CDR1 с последовательностью **(SEQ ID NO:18)**: GSWMN; CDR2 с последовательностью **(SEQ ID NO:19)**: RIYPGDGETNYNGKFKD; и CDR3 с последовательностью **(SEQ ID NO:20)**: IYGNNVYFDV.

Первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) характеризуется последовательностью **(SEQ ID NO:1)**: GGGSGGGG. Цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:2**: GGCGGG.

Стимулирующий образование гетеродимера домен первой полипептидной цепи представляет собой “Е-спиральный” домен **(SEQ ID NO:3)**. Стимулирующий образование гетеродимера домен второй полипептидной цепи представляет собой “К-спиральный” домен **(SEQ ID NO:4)**.

Таким образом, первая полипептидная цепь DART-2 характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:28**):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQOKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTIITGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQV
QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG
KFKDRVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTITVTVSSGGC
GGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK

Следует принимать во внимание, что остатки 1-110 **SEQ ID NO:28** представляют собой домен VL антитела, которое связывает CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**); остатки 111-118 **SEQ ID NO:28** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 119-237 **SEQ ID NO:28** представляют собой домен VH антитела, которое связывает gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**), остатки 238-243 **SEQ ID NO:28** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**) и остатки 244-271 **SEQ ID NO:28** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “Е-спиральный” домен (**SEQ ID NO:3**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь DART-2, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:29**):

caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgaccctg
acatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcag
aagccaggacagggcaccgaaggggctgatcgggggtacaaacaaaagggctccctggacc
cctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaggccgctctgactattaccggggca
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc
gggggtggcacaaaaactgactgtgctgggaggtgggtggatccggcgagggtggacaggtc
cagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaccgagcaagcgtgaaggtctcctgc
aaagcatcaggctatacatattacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccagga
cagggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaaactaactataatgga
aagttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggag
ctgagctccctgcggtctgaagataaccgccgtctactattgcgctagaatttacggaac
aatgtctattttgacgtgtggggcgagggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgt
ggcgggtggagaagtggccgactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgct
gcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaa

Вторая полипептидная цепь DART-2 характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:30**):

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSARSSISFMYWYQOKPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV
KDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQTLTVTVSSG
GCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Следует принимать во внимание, что остатки 1-106 **SEQ ID NO:30** представляют собой домен VL антитела, которое связывает gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**); остатки 107-114 **SEQ ID NO:30** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 115-239 **SEQ ID NO:30** представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**), остатки 240-245 **SEQ ID NO:30** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**) и остатки 246-273 **SEQ ID NO:30** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “К-спиральный” домен (**SEQ ID NO:4**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь DART-2, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:31**):

```
Gacattcagctgactcagtcctccctcttttctgtccgcatccgtcggagatcgagtgact
attacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggtatcagcagaagccggc
aaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctccgggggtgccatctcgg
ttctctggcagtgggtcaggaactgagtttacctgacaattagctccctggaggctgaa
gatgccgctacctaactattgccagcagtgaggcagctatcctctgaccttcggacagggg
actaaactggaaatcaaggggtggaggatccggcggcggaggcgagggtgcagctggaggag
tctgggggaggcttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctgga
ttcaccttcagcacatacgtatgaattgggtccgccaggctccagggaaggggctggag
tgggttggaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtg
aaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaataaac
agcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaat
tcttacgtgtcttgggttgcttattggggacaggggacactgggtgactgtgtcttccgga
ggatgtggcgggtggaaaagtggccgcactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaag
gtcggccgacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag
```

3. gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (ABD) (“DART-2 w/ABD”)

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело будет содержать альбуминсвязывающий домен (“ABD”) (gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело с ABD”).

Как раскрыто в международной патентной публикации WO 2012/018687, для улучшения *in vivo* фармакокинетических свойств молекул диател молекулы могут быть модифицированы так, чтобы они содержали полипептидную часть белка, связывающегося с сывороточными белками, на одном или нескольких концах молекулы диатела. Наиболее предпочтительно, такая полипептидная часть белка, связывающегося с сывороточными белками, будет встроена на С-конце молекулы диатела. Особенно предпочтительная полипептидная часть белка, связывающегося с

сывороточными белками, для этой цели представляет собой альбуминсвязывающий домен (ABD) из белка G стрептококка. Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма Streptococcus G148 является особенно предпочтительным.

Альбуминсвязывающий домен 3 (ABD3) белка G штамма Streptococcus G148 состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих стабильный трехспиральную структуру и характеризуется широкой альбуминсвязывающей специфичностью (Johansson, M.U. *et al.* (2002) “*Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules,*” J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120). Альбумин представляет собой наиболее распространенный белок в плазме и характеризуется периодом полувыведения, составляющим 19 дней у людей. Альбумин содержит несколько низкомолекулярных сайтов связывания, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и, тем самым, продлевать их периоды полужизни в сыворотке.

Таким образом, первая полипептидная цепь или вторая полипептидная цепь grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен, содержит третий линкер (линкер 3), который отделяет E-спираль (или K-спираль) такой полипептидной цепи от альбуминсвязывающего домена. Предпочтительная последовательность такого линкера 3 представляет собой GGGG (SEQ ID NO:32) или GGGNS (SEQ ID NO:33). Предпочтительный альбуминсвязывающий домен (ABD) характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:34):

LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAALP

Чтобы проиллюстрировать этот аспект настоящего изобретения, первая полипептидную цепь описанного выше DART-2 модифицировали так, чтобы она содержала альбуминсвязывающий домен, приводя в результате к образованию grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего ABD, обозначенного в настоящем документе как “DART-2 w/ABD.”

Первая полипептидная цепь такого DART-2 w/ABD характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (SEQ ID NO:35):

QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTI TGAQAEDEADYICALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGQV
QLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSMNWRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG
KFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGT TTVTVSSGGC
GGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGSLAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLI
DNAKSAEGVKALIDEILAALP

Следует принимать во внимание, что остатки 1-271 **SEQ ID NO:35** являются идентичными остаткам 1-271 DART-2 и, таким образом, представляют, в направлении от N-конца к С-концу, домен VL антитела, которое связывает CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**); первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); домен VH антитела, которое связывает gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:27**), цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**), стимулирующий образование гетеродимера “Е-спиральный” домен (**SEQ ID NO:3**) и С-конец. Остатки 272-275 представляют собой линкер 3 (**SEQ ID NO:32**), и остатки 276-321 представляют собой альбуминсвязывающий домен (**SEQ ID NO:34**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь DART-2 w/ABD, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:36**):

```
caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccctg
acatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcag
aagccaggacaggcaccsaaggggcctgatcgggggtacaaacaaaagggtccctggacc
cctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattaccggggca
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc
gggggtggcacaaaactgactgtgctgggaggggggtggatccggcgagggtggacaggtc
cagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctctcctgc
aaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccagga
cagggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaaactaactataatgga
aagttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggag
ctgagctccctgcggtctgaagataccgccgtctactattgcgctagaatttacggaac
aatgtctattttgacgtgtgggggaggggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgt
ggcgggtggagaagtggccgcaactggagaaagaggttgctgctttggagaaggaggtcgt
gcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaaggcggcggtctctggcccaggcaaaa
gaggcagccatccgcgaactggataaatatggcgtgagcgattattataagaacctgatt
gacaacgcaaaatccgcggaaggcgtgaaagcactgattgatgaaattctggccgcctg
cct
```

Вторая полипептидная цепь DART-2 w/ABD является такой же, как обсуждаемая выше вторая полипептидная цепь DART-2 (**SEQ ID NO:30**).

В. gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела, содержащие домен Fc IgG (“DART-2 w/Fc”)

Согласно дополнительному варианту осуществления настоящее изобретение предусматривает gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела, содержащие домен Fc IgG. Соответственно, такие диатела в настоящем документе называется “gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела”. Домен Fc Fc - диател согласно настоящему изобретению может представлять собой либо полную область Fc

(например, полную область Fc IgG) или только фрагмент полной области Fc. Хотя домен Fc биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению может обладать способностью связываться с одним или несколькими рецепторами Fc (например, FcγR), более предпочтительно такой домен Fc будет вызывать сниженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет существенно устранять способность такого домена Fc связываться с таким(и) рецептором(ами). Домен Fc биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению может включать в себя частично или полностью домен CH2 и/или частично или полностью домен CH3 полной области Fc или может содержать вариантную последовательность CH2 и/или вариантную последовательность CH3 (которая может включать в себя, например, одну или несколько вставок и/или одну или несколько делеций относительно доменов CH2 или CH3 полной области Fc). Домен Fc биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению может содержать не относящиеся к Fc полипептидные части, или может содержать части не встречающихся в природе полных областей Fc, или может содержать не встречающиеся в природе ориентации доменов CH2 и/или CH3 (такие как, например, два домена CH2 или два домена CH3, или, в направлении от N-конца к C-концу, домен CH3, соединенный с доменом CH2, и т.д.).

Согласно первому варианту осуществления, обозначенному как “версия 1” и показанному на **фигуре 2А**, первая полипептидная цепь иллюстративного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного Fc - диатела будет содержать, в направлении от N-конца к C-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL_{gpA33}, или VL_{CD3}), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD3}), или с CD3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{gpA33}), цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера доменов, спейсерный пептид (линкер 5), цистеинсодержащий пептид (пептид 1), домен Fc IgG (предпочтительно, все или часть доменов CH2 и CH3 области Fc антитела) и C-конец.

Согласно второму варианту осуществления, обозначенному как “версия 2” и показанному на **фигуре 2В**, первая полипептидная цепь иллюстративного gpA33 x CD3

биспецифического моновалентного Fc - диатела будет содержать, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, цистеинсодержащий пептид (пептид 1), домен Fc IgG (предпочтительно, все или часть доменов CH2 и CH3 области Fc антитела), промежуточный спейсерный пептид (линкер 4); домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL_{gpA33}, или VL_{CD3}), промежуточный спейсерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{CD3}), или с CD3 (если такая первая полипептидная цепь содержит VL_{gpA33}), цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен и С-конец.

Предпочтительно, согласно любому варианту осуществления домен Fc первой полипептидной цепи будет вызывать сниженное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIA (CD16a) или FcγRIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет существенно устранять способность такого домена Fc связываться с таким(и) рецептором(ами). Варианты и мутантные формы Fc, способные опосредовать такое измененное связывание, хорошо известны в настоящей области техники и включают в себя аминокислотные замены в положениях 234 и 235, замену в положении 265 или замену в положении 297 (см., например, патент США № 5624821, включенный в настоящий документ посредством ссылки). Согласно предпочтительному варианту осуществления домен CH2 и CH3 включает в себя замену в положении 234 на аланин и в положении 235 на аланин.

Вторая полипептидная цепь таких иллюстративных gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател (версии 1 и версии 2) будет содержать, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец, домен VL моноклонального антитела, способного связываться или с gpA33, или с CD3 (т.е. или VL_{gpA33}, или VL_{CD3}, в зависимости от домена VL, выбранного для первой полипептидной цепи диатела), промежуточный линкерный пептид (линкер 1), домен VH моноклонального антитела, способного связываться или с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{gpA33}), или с CD3 (если такая вторая полипептидная цепь содержит VL_{CD3}), цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2), стимулирующий образование гетеродимера домен (предпочтительно К-спиральный домен) и С-конец.

Иллюстративные gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела (версия 1 и версия 2) будут дополнительно содержать третью полипептидную цепь, которая будет содержать, в направлении от N-конца к С-концу, N-конец,

цистеинсодержащий пептид (пептид 1), домен Fc IgG (предпочтительно, все или часть доменов CH2 и CH3 области Fc антитела), характеризующийся таким же изотипом, что и домен Fc первой полипептидной цепи, и С-конец. Домен Fc третьей полипептидной цепи предпочтительно будет вызывать снижение связывания с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа) или будет существенно устранять способность такого домена Fc связываться с таким(и) рецептором(ами), как обсуждалось выше, по отношению к первой полипептидной цепи иллюстративных grA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател.

Необязательно присутствующий промежуточный спейсерный пептид (линкер 4) будет предпочтительно содержать аминокислотную последовательность (**SEQ ID NO:37**): APSSS и более предпочтительно характеризуется аминокислотной последовательностью (**SEQ ID NO:38**): APSSSPME.

Цистеинсодержащий пептид (пептид 1) первой и третьей полипептидных цепей и могут состоять из одной и той же аминокислотной последовательности или из различных аминокислотных последовательностей и будут содержать 1, 2, 3 или больше цистеиновых остатков. Особенно предпочтительный пептид 1 характеризуется аминокислотной последовательностью (**SEQ ID NO:39**): DKTHTCPPCR.

Промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) предпочтительно характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:1**, описанной выше. Цистеинсодержащий второй промежуточный спейсерный пептид (линкер 2) предпочтительно характеризуется последовательностью **SEQ ID NO:2**, описанной выше.

Стимулирующий образование гетеродимера домен первой и второй полипептидных цепей grA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател будет предпочтительно представлять собой описанный выше E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) и K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), и будет выбран так, чтобы одна из таких полипептидных цепей содержала E-спиральный домен, тогда как другая содержала K-спиральный домен, как обсуждалось выше.

Предпочтительный спейсерный пептид (линкер 5) характеризуется последовательностью (**SEQ ID NO:33**) GGG.

Домены CH2 и/или CH3 первого и третьего полипептидов необязательно должны быть идентичными и предпочтительно модифицированы так, чтобы

содействовать образованию комплекса между двумя полипептидами. Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена на аминокислоту, содержащую объемную боковую группу, образующую ‘выступ’, например, триптофан) может быть введена в домен CH2 или CH3 так, чтобы стерическое влияние предотвращало взаимодействие с аналогично мутированным доменом и вынуждало мутированный домен образовывать пару с доменом, в котором была сконструирована комплементарная, или обеспечивающая размещение мутация, т.е. ‘впадина’ (например, замена на глицин). Такие наборы мутаций можно сконструировать в любой паре полипептидов, содержащих молекулу биспецифического моновалентного Fc - диатела, и, кроме того, сконструировать в любой части полипептидных цепей указанной пары. Способы белковой инженерии, чтобы способствовать гетеродимеризации вместо гомодимеризации, хорошо известны в настоящей области техники, в частности, в отношении инженерии иммуноглобулиноподобных молекул, и предусмотрены в настоящем документе (см., например, Ridgway *et al.* (1996) “*Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,*” *Protein Engr.* 9:617-621, Atwell *et al.* (1997) “*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,*” *J. Mol. Biol.* 270: 26-35, и Xie *et al.* (2005) “*A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,*” *J. Immunol. Methods* 296:95-101; каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки). Предпочтительно, что ‘выступ’ конструируют в доменах CH2-CH3 первой полипептидной цепи, а ‘впадину’ конструируют в доменах CH2-CH3 третьей полипептидной цепи. Таким образом, ‘выступ’ будет содействовать в предотвращении гомодимеризации первой полипептидной цепи посредством своих доменов CH2 и/или CH3. Поскольку третья полипептидная цепь предпочтительно содержит замену, обеспечивающую образование ‘впадины’, она будет гетеродимеризоваться с первой полипептидной цепью, а также гомодимеризоваться самим с собой. Предпочтительный выступ создается путем модификации домена Fc нативной области Fc IgG так, чтобы она содержала модификацию T366W. Предпочтительная впадина создается путем модификации домена Fc нативной области Fc IgG, чтобы она содержала модификацию T366S, L368A и Y407V. Для содействия в очищении гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифического моновалентного Fc – диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, сайт связывания с белком А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно подвергают мутации с помощью

аминокислотной замены в положении 435 (H435R). Для содействия в очищении третьей полипептидная цепь гомодимера третьей полипептидной цепи от конечного биспецифического моновалентного Fc - диатела, содержащего первую, вторую и третью полипептидные цепи, сайт связывания с белком А доменов CH2 и CH3 третьей полипептидной цепи предпочтительно подвергают мутации с помощью аминокислотной замены. Таким образом, гомодимер третьей полипептидной цепи не будет связываться с белком А, тогда как биспецифическое моновалентное Fc - диатело будет сохранять свою способность связывать белок А через сайт связывания с белком А на первой полипептидной цепи.

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела, присутствующего в первой полипептидной цепи, представляет собой (**SEQ ID NO:40**):

```

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

Предпочтительная последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела, присутствующего в третьей полипептидной цепи, представляет собой (**SEQ ID NO:41**):

```

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTT
LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL
TVDKSRWQQGNVDFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

```

1. Версия 1 DART-2 w/Fc

Первая, вторая и третья полипептидные цепи предпочтительного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного Fc - диатела, обозначенного в настоящем документе как “версия 1 DART-2 w/Fc”, содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями:

Первая полипептидная цепь такой версии 1 DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (**SEQ ID NO:42**):

```

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSARSSISFMYWYQQKPKAPKLLIYDTSNLAGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISLSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVE
SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSV
KDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSG
GCGGGEVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTTLPPSREEMTKNQVSL

```

LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Следует принимать во внимание, что остатки 1-106 **SEQ ID NO:42** представляют собой домен VL антитела, которое связывает gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**); остатки 107-114 **SEQ ID NO:42** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 115-239 **SEQ ID NO:42** представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**); остатки 240-245 **SEQ ID NO:42** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**); остатки 246-273 **SEQ ID NO:42** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “E-спиральный” домен (**SEQ ID NO:3**); остатки 274-276 представляют собой спейсерный пептид (линкер 5) (**SEQ ID NO:33**); остатки 277-286 представляют собой пептид 1 (**SEQ ID NO:39**), остатки 277-503 представляют собой последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела (**SEQ ID NO:40**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует первую полипептидную цепь версии 1 DART-2 w/Fc, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:43**):

gacattcagctgactcagtcctccctcttttctgtccgcatccgctcggagatcgagtgact
attacttgctctgctaggtcctcaatcagcttcatgtactggatcagcagaagccggc
aaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctccggggtgccatctcgg
ttctctggcagtgggctcaggaactgagtttacctgacaattagctccctggaggctgaa
gatgccgctacctactattgccagcagtgaggcagctatcctctgaccttcggacagggg
actaaactggaaatcaaggggtggaggatccggcggcggaggcgaggtgcagctggagg
tctgggggaggcttgggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctgga
ttcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgcccaggctccaggggaaggggctggag
tgggttggaaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtg
aaggatagattcaccatctcaagagatgattcaaagaactcactgtatctgcaaataaac
agcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttcggcaat
tcttacgtgtcttggtttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtcttccgga
ggatgtggcgggtggagaagtggccgcaactggagaaagaggttgctgctttggagaaggag
gtcgtgcaacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaaggcggcggggacaaaactcac
acatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgccccgggaccgctcagctcttctcttcccc
cscaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctgtgggtg
gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggagggtg
cataatgccaagacaaagccgccccggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctcc
aacaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
gaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagc
ctgtgggtgcctgggtcaaggcttctatcccagcgcacatcgccgtggagtgaggagcaat
gggagccgggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccgacggctccttc
ttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctca

tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtct
ccgggtaaa

Вторая полипептидная цепь такой версии 1 DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (**SEQ ID NO:44**):

QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWT
PARFSGSLLGGKAALTIITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGQV
QLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTGSMNWRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG
KFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVYFDVWVGQGTTVTSSGGC
GGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Следует принимать во внимание, что остатки 1-110 **SEQ ID NO:44** представляют собой домен VL антитела, которое связывает CD3 (**VL_{CD3}**) (**SEQ ID NO:5**); остатки 111-118 **SEQ ID NO:44** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 119-237 **SEQ ID NO:44** представляют собой домен VH антитела, которое связывает gpA33 (**VH_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:27**), остатки 238-243 **SEQ ID NO:44** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**) и остатки 244-271 **SEQ ID NO:44** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “К-спиральный” домен (**SEQ ID NO:4**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует вторую полипептидную цепь версии 1 DART-2 w/Fc, характеризуется последовательностью (**SEQ ID NO:45**):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaaactgtgaccctg
acatgcagatccagcacaggcgcagtgaccacatctaactacgccaattgggtgcagcag
aagccaggacaggcaccgaaggggctgatcggggtacaaacaaaagggtccctggacc
cctgcacgggttttctggaagtctgctgggcggaaaggccgctctgactattaccggggca
caggccgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttc
gggggtggcacaaaactgactgtgctgggagggggtggatccggcggagggtggacaggtc
cagctggtccagagcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctcctgc
aaagcatcaggctatacatttacaggcagctggatgaactgggtgaggcaggctccagga
cagggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaactaactataatgga
aagttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggag
ctgagctccctgcggtctgaagataccgcccgtctactattgcgctagaatttacggaaac
aatgtctattttgacgtgtgggggaggggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgt
ggcgggtgaaaagtggccgactgaaggagaaagttgctgctttgaaagagaaggctcgc
gcacttaaggaaaaggctcgcagccctgaaagag

Третья полипептидная цепь такой версии 1DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (**SEQ ID NO:46**):

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

Следует принимать во внимание, что остатки 1-10 **SEQ ID NO:46** представляют собой пептид 1 (**SEQ ID NO:39**) и остатки 11-227 представляют собой домены CH2 и CH3 домена Fc антитела (**SEQ ID NO:41**).

Предпочтительный полинуклеотид, который кодирует третью полипептидную цепь версии 1 DART-2 w/Fc, характеризуется следующей последовательностью (**SEQ ID NO:47**):

```
Gacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagccgcggggggaccgtcagtc
ttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcaca
tgcggtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggac
ggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtac
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaag
tgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaa
gggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaag
aaccaggtcagcctgagttgcgagtcacaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggag
tgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactcc
gacggctccttcttctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggg
aacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccgctacacgcagaagagc
ctctccctgtctccgggtaa
```

2. Версия 2 DART-2 w/Fc

Первая, вторая и третья полипептидные цепи второго предпочтительного gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного Fc - диатела, обозначенного в настоящем документе как “версия 2 DART-2 w/Fc”, содержат полипептидные домены, характеризующиеся следующими последовательностями. Среди прочих отличий, версия 1 DART-2 w/Fc отличается от версии 2 DART-2 w/Fc в расположении последовательностей CH2 и CH3 первой полипептидной цепи; указанные последовательности расположены на С-конце относительно последовательностей VL и VH версии 1 DART-2 w/Fc, тогда как они расположены на N-конце относительно последовательностей VL и VH версии 2 DART-2 w/Fc.

Первая полипептидная цепь такой версии 2 DART-2 w/Fc характеризуется следующей аминокислотной последовательностью (**SEQ ID NO:48**):

```
DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDL
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPSSSPMEDIQLT
QSPSFLSASVGDRVTITCSARSSISFMYWYQQKPKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFT
ISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFVNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSSGGCGGG
KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE
```

Следует принимать во внимание, что остатки 1-10 **SEQ ID NO:48** представляют собой пептид 1 (**SEQ ID NO:39**); остатки 11-227 **SEQ ID NO:48** представляют собой последовательность для доменов CH2 и CH3 домена Fc антитела (**SEQ ID NO:40**); остатки 228-235 **SEQ ID NO:48** представляют собой промежуточный спейсерный пептид (линкер 4) (**SEQ ID NO:38**); остатки 236-341 **SEQ ID NO:48** представляют собой домен VL антитела, которое связывает gpA33 (**VL_{gpA33}**) (**SEQ ID NO:26**); остатки 342-349 **SEQ ID NO:48** представляют собой первый промежуточный спейсерный пептид (линкер 1) (**SEQ ID NO:1**); остатки 350-474 **SEQ ID NO:48** представляют собой домен VH антитела, которое связывает CD3 (**VH_{CD3}**) (**SEQ ID NO:25**); остатки 475-480 **SEQ ID NO:48** представляют собой цистеинсодержащий спейсерный пептид (линкер 2) (**SEQ ID NO:2**); и остатки 481-508 **SEQ ID NO:48** представляют собой стимулирующий образование гетеродимера “К-спиральный” домен (**SEQ ID NO:4**).

Вторая полипептидная цепь такой версии 2 DART-2 w/Fc характеризуется аминокислотной последовательностью первой полипептидной цепи DART-2 (т.е. **SEQ ID NO:28**) (описанной выше).

Третья полипептидная цепь такой версии 2 DART-2 w/Fc характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:46** (описанной выше).

Фармацевтические композиции

Композиции согласно настоящему изобретению включают в себя композиции нерасфасованного лекарственного средства, пригодные в производстве фармацевтических композиций (например, неочищенных или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е. композиций, которые являются подходящими для введения субъекту или пациенту), которые можно использовать в получении стандартных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател или gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc – диател, раскрытых в настоящем документе, и дополнительное терапевтическое средство и фармацевтически приемлемый носитель. Композиции согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одной или нескольких молекул согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие такие gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела

или grA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела и второе терапевтическое антитело (например, специфическое к антигену злокачественной опухоли моноклональное антитело), которое является специфическим в отношении конкретного антигена, связанного со злокачественной опухолью, и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно конкретному варианту осуществления термин “фармацевтически приемлемый” означает одобренный регуляторным органом федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у людей. Термин “носитель” относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному и неполному), вспомогательное вещество или инертный носитель, с которым водят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут представлять собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая в себя масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и подобное. Вода представляет собой предпочтительный носитель, если фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и растворы глицерина также можно использовать в качестве жидких носителей, в частности, для инъекционных растворов. Подходящие фармацевтические вспомогательные вещества включают в себя крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицерин моностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и подобное. Композиция при необходимости также может содержать незначительные количества смачивающих средств или эмульгаторов, или рН буферных средств. Указанные композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, драже, капсул, порошков, составов замедленного высвобождения и подобное.

Как правило, ингредиенты композиций согласно настоящему изобретению поставляются либо отдельно, либо смешанными вместе в стандартной лекарственной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере, таком как ампула или саше с указанием количества активного средства. Если композиция предназначена для введения с помощью инфузии, она может продаваться с инфузионным флаконом, содержащим стерильную воду или солевой раствор фармацевтической степени

чистоты. Если композиция предназначена для введения с помощью инъекции, ампула со стерильной водой для инъекций или солевым раствором может быть предоставлена с тем, чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть введены в состав в виде нейтральных или солевых форм. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя без ограничения соли, образованные такими анионами, как анионы, происходящие из соляной, ортофосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и т.д., и соли, образованные катионами, такими как катионы, происходящие из натрия, калия, аммония, кальция, гидроксидов железа, изопропиламина, триэтиламина, 2-этиламиноэтанола, гистидина, прокаина и т.д.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрен фармацевтический пакет или набор, содержащий одна или несколько контейнеров, заполненных такими раскрытыми grA33 x CD3 биспецифическими моновалентными диателами или grA33 x CD3 биспецифическими моновалентными Fc - диателами (отдельно или с дополнительным(и) терапевтическим(и) средством(ами)) и таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтический пакет или набор. Согласно настоящему изобретению также предусмотрен фармацевтический пакет или набор, содержащий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению. Необязательно такой(ие) контейнер(ы) может сопровождать уведомление в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических средств или биологических продуктов, причем указанное уведомление отражает разрешение соответствующим органом производства, применения или продажи для введению людям.

Согласно настоящему изобретению предусмотрены наборы, которые можно использовать в описанных выше способах. Согласно одному варианту осуществления набор содержит одну или несколько молекул согласно настоящему изобретению. Согласно другому варианту осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько других профилактических или терапевтических средств, пригодных для лечения злокачественной опухоли, в одном или нескольких контейнерах. Согласно другому варианту осуществления набор дополнительно содержит одно или несколько антител, которые связывают один или несколько антигенов, ассоциированных со

злокачественной опухолью. Согласно определенным вариантам осуществления другое профилактическое или терапевтическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство. Согласно другим вариантам осуществления профилактическое или терапевтическое средство представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

Применения композиций согласно настоящему изобретению

gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению характеризуются способностью осуществлять лечение любого заболевания или состояния, связанного с экспрессией gpA33 или характеризующегося его экспрессией. Таким образом, без ограничения фармацевтические композиции, содержащие такие молекулы, можно использовать в диагностике или лечении злокачественных опухолей толстой кишки, колоректальных злокачественных опухолей и злокачественных опухолей поджелудочной железы.

Способы введения

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть предусмотрены для лечения, профилактики и уменьшения интенсивности одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием, нарушением или инфекцией, путем введения субъекту эффективного количества фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. Согласно предпочтительному аспекту такие композиции являются по существу очищенными (т.е. по существу не содержат веществ, которые ограничивают ее действие или производят нежелательные побочные эффекты). Согласно конкретному варианту осуществления субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, такое как не относящееся к приматам млекопитающее (например, корова, лошадь, кошка, собака, грызун и т.д.) или примат (например, обезьяна, такая как, яванский макак, человек и т.д.). Согласно предпочтительному варианту осуществления субъект представляет собой человека.

Известны различные системы доставки и их можно использовать для введения композиций согласно настоящему изобретению, например, инкапсулирование в липосомах, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или слитый белок, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu *et al.* (1987) "*Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A*

Soluble DNA Carrier System,” J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкция из нуклеиновой кислоты в виде части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател или gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения парентеральное введение (например, интрадермальное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и мукозальное введение (например, интраназальный и пероральный пути). Согласно конкретному варианту осуществления молекулы согласно настоящему изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным путем, например, с помощью инфузии или болюсной инъекции, путем поглощения через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую ротовой полости, слизистую прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, пульмонарное введение также можно использовать, например, с помощью применения ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным средством. См., например, патенты США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 и 4880078 и международные патентные публикации согласно PCT №№ WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно настоящему изобретению также предусмотрено, что gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению упакованы в такой герметически запаянный контейнер, как ампула или саше, с указанием количества таких молекул. Согласно одному варианту осуществления gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела или gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению поставляют в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически запаянном контейнере и его можно развести, например, водой или солевым раствором до соответствующей концентрации для введения субъекту. gpA33 x CD3 диатела или gpA33 x CD3 Fc - диатела согласно настоящему изобретению предпочтительно поставляют в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметически запаянном контейнере в стандартной дозировке, составляющей по меньшей мере 5 мкг, более предпочтительно по меньшей мере 10 мкг, по меньшей мере

15 мкг, по меньшей мере 25 мкг, по меньшей мере 50 мкг, по меньшей мере 100 мкг или по меньшей мере 200 мкг.

Лиофилизированные grA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела или grA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению необходимо хранить при температуре от 2 до 8°C в их оригинальном контейнере и молекулы необходимо вводить не позднее чем через 12 часов, предпочтительно не позднее чем через 6 часов, не позднее чем через 5 часов, не позднее чем через 3 часа или не позднее чем через 1 час после их разведения. Согласно альтернативному варианту осуществления grA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела или grA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению поставляют в жидкой форме в герметически запаянном контейнере с указанием количества и концентрации молекулы, слитого белка или конъюгированной молекулы. Жидкую форму таких биспецифических моновалентных диател или биспецифических моновалентных Fc - диател предпочтительно поставляют в герметически запаянном контейнере, в котором молекулы находятся в концентрации, составляющей по меньшей мере 1 мкг/мл, более предпочтительно по меньшей мере 2,5 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл или по меньшей мере 100 мкг/мл.

Количество grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател или grA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению, которое будет эффективным в лечении, профилактике или уменьшении интенсивности одного или нескольких связанных с нарушением симптомов, можно определить с помощью стандартных клинических техник. Точная доза, применяемая в составе, также будет зависеть от пути введения и серьезности состояния, и должна определяться в соответствии с решением лечащего врача и всех соответствующих обстоятельств пациента. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых зависимости от дозы из *in vitro* тестовых систем или тестовых систем - животных моделей.

Для grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател или grA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател, предусмотренных настоящим изобретением, вводимая пациенту дозировка составляет, как правило, по меньшей мере приблизительно 0,01 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,05 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 1 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 2 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 3 мкг/кг,

по меньшей мере приблизительно 5 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 10 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 20 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 30 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 50 мкг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,1 мг/кг, по меньшей мере приблизительно 0,15 мг/кг массы тела субъекта или больше.

Дозировку и частоту введения биспецифических моновалентных диател или биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению можно снизить или изменить путем усиления поглощения и проникновения биспецифических моновалентных Fc - диател в ткани с помощью таких модификаций, как, например, липидизация.

Согласно одному варианту осуществления вводимую пациенту дозировку gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател или gpA33 x CD3 Fc биспецифических моновалентных диател согласно настоящему изобретению можно рассчитать для применения в качестве монотерапии. Согласно другому варианту осуществления биспецифические моновалентные диатела или биспецифические моновалентные Fc - диатела согласно настоящему изобретению используют в комбинации с другими терапевтическими композициями, и вводимая пациенту дозировка является ниже, чем при использовании такие биспецифических моновалентных диател или биспецифических моновалентных Fc - диател в качестве монотерапии.

Согласно конкретному варианту осуществления может быть необходимым введение фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению местно в нуждающуюся в лечении область; этого можно достичь, например, без ограничения с помощью местной инфузии, инъекции или посредством имплантата, причем указанный имплантат изготовлен из пористого, непористого или желатинообразного материала, включая в себя такие мембраны, как мембраны Sialastic, или волокна. При введении молекулы согласно настоящему изобретению предпочтительно необходимо уделить внимание применению материалов, которые не абсорбируют молекулу.

Согласно другому варианту осуществления композиции могут быть доставлены в везикуле, в частности липосоме (см. Langer (1990) "*New Methods Of Drug Delivery*," Science 249:1527-1533); Treat *et al.*, в Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 3 17-327; см., главным образом, там же).

Согласно другому варианту осуществления композиции могут быть доставлены в системе контролируемого или замедленного высвобождения. Любую технику, известная специалисту в настоящей области техники, можно использовать для

получения составов замедленного высвобождения, содержащих одну или несколько молекул согласно настоящему изобретению. См., например, патент США № 4526938; международные патентные публикации согласно PCT №№ WO 91/05548; WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) “*Intratatumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,*” *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.* (1995) “*Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,*” *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) “*Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,*” *Pro. Int’l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam *et al.* (1997) “*Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,*” *Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно одному варианту осуществления насос можно использовать в системе контролируемого высвобождения (См. Langer, *панее*; Sefton, (1987) “*Implantable Pumps,*” *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240; Buchwald *et al.* (1980) “*Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis,*” *Surgery* 88:507-516; и Saudek *et al.* (1989) “*A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery,*” *N. Engl. J. Med.* 321:574-579). Согласно другому варианту осуществления полимерные материалы можно использовать для достижения контролируемого высвобождения антител (см., например, *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *CONTROLLED DRUG BIOAVAILABILITY, DRUG PRODUCT DESIGN AND PERFORMANCE*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy *et al.* (1985) “*Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate,*” *Science* 228:190-192; During *et al.* (1989) “*Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization,*” *Ann. Neurol.* 25:351-356; Howard *et al.* (1989) “*Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits,*” *J. Neurosurg.* 7(1):105-112); патенты США №№ 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; международные патентные публикации согласно PCT №№ WO 99/15154 и WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в составах замедленного высвобождения, включают в себя без ограничения полимер 2-гидроксиэтилметакрилата, полимер метилметакрилата, полимер акриловой кислоты, сополимер этилена и винилацетата, полимер метакриловой кислоты, полигликолиды (PLG), полиангидриды, полимер N-

винилпирролидона, полимер винилового спирта, полиакриламид, полиэтиленгликоль, полилактиды (PLA), сополимер лактидов и гликолидов (PLGA) и полиортоэфир. Согласно другому варианту осуществления систему контролируемого высвобождения можно разместить вблизи к терапевтической мишени (например, легким), таким образом, будет необходима только доля системной дозы (см., например, Goodson, in *MEDICAL APPLICATIONS OF CONTROLLED RELEASE*, *ранее*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Согласно другому варианту осуществления полимерные композиции, пригодные в качестве имплантатов контролируемого высвобождения, используются согласно Dunn с соавт. (см. патент США № 5945155). Указанный конкретный способ основан на терапевтическом эффекте *in situ* контролируемого высвобождения биоактивного материала из полимерной системы. Имплантация, как правило, происходит в любом месте в организме пациента, нуждающегося в терапевтическом лечении. Согласно другому варианту осуществления используют неполимерную систему замедленной доставки, при помощи которой неполимерный имплантат в организме субъекта используется в качестве системы доставки лекарственного средства. При имплантации в организм органический растворитель имплантата будет рассеиваться, диспергироваться или выщелачиваться из композиции в окружающую тканевую жидкость, и неполимерный материал будет постепенно коагулировать или оседаться с образованием твердой, микропористой матрицы (см. патент США № 5888533).

Системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, *"New Methods Of Drug Delivery,"* Science 249:1527-1533). Любую технику, известную специалисту в настоящей области техники, можно использовать для получения составов замедленного высвобождения, содержащих одно или несколько терапевтических средств согласно настоящему изобретению. См., например, патент США №4526938; международные патентные публикации №№ WO 91/05548 и WO 96/20698; Ning *et al.* (1996) *"Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel,"* Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song *et al.* (1995) *"Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions,"* PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) *"Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application,"* Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854; и Lam *et al.* (1997) *"Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery,"* Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно конкретному варианту осуществления в случае, если композиция согласно настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое моновалентное диатело или биспецифическое моновалентное Fc - диатело согласно настоящему изобретению, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo* для стимуляции экспрессии кодируемого ею биспецифического моновалентного диатела или биспецифического моновалентного Fc - диатела, путем конструирования ее в виде части соответствующего нуклеиновокислотного экспрессионного вектора и введения ее так, чтобы она стала внутриклеточной, например, путем применения ретровирусного вектора (см. патент США № 4980286), или путем прямой инъекции, или путем использования бомбардировки микрочастицами (например, генной пушки; Biolistic, Dupont), или покрытия липидами, или рецепторами клеточной поверхности, или средствами трансфекции, или путем введения ее, соединенной с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot *et al.* (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1864-1868) и т.д. Альтернативно, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и встроена в ДНК клетки - хозяина для экспрессии путем гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта с помощью терапевтически или профилактически эффективного количества grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател или grA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател согласно настоящему изобретению может включать в себя однократное лечение или предпочтительно может включать в себя серию лечений. Согласно предпочтительному примеру субъект получает лечение с помощью молекул согласно настоящему изобретению один раз в неделю приблизительно 1 - 10 недель, предпочтительно 2 - 8 недель, более предпочтительно приблизительно 3 - 7 недель и даже более предпочтительно в течение приблизительно 4, 5 или 6 недель. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению вводят один раз в день, два раза в день или три раза в день. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтические композиции вводят один раз в неделю, два раза в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, каждые шесть недель, один раз в два месяца, дважды в год или один раз в год. Также следует понимать, что эффективная дозировка молекул, используемых для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в течение курса конкретного лечения.

Представив описание настоящего изобретения в общих чертах, оно станет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые представлены для иллюстрации и не предусмотрено, что они ограничивают настоящее изобретение, если не указано иное.

Пример 1

Характеристики моноклонального антитела к grA33 человека

Мышиное моноклональное антитело, способное специфически связываться с grA33 человека, подвергали химеризации и гуманизации. Цепи VL и VH исходного мышиного антитела характеризуются последовательностями **SEQ ID NO:13** и **17**, соответственно. Цепи VL и VH гуманизованного антитела характеризуются последовательностями **SEQ ID NO:26** и **27**, соответственно.

Антигенсвязывающий домен VL_{grA33} содержит CDR1 с последовательностью (**SEQ ID NO:14**): SARSSISFMY; CDR2 с последовательностью (**SEQ ID NO:15**): DTSNLAS; и CDR3 с последовательностью (**SEQ ID NO:16**): QQWSSYPLT.

Антигенсвязывающий домен VH_{grA33} содержит CDR1 с последовательностью (**SEQ ID NO:18**): GSWMN; CDR2 с последовательностью (**SEQ ID NO:19**): RIYPGDGETNYNGKFKD; и CDR3 с последовательностью (**SEQ ID NO:20**): IYGNNVYFDV.

В **таблице 1** показан эффект таких изменений на кинетику связывания.

Таблица 1			
Антитело	KD	ka	kd
Мышиное mAb 1	2,3 нМ	$3,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^{-4}$
Химерное mAb 1	2,4 нМ	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$
Гуманизованное mAb 1	3,4 нМ	$5,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-3}$

Данные показывают, что модификации, приводящие к гуманизации доменов VL и VH антитела, не оказывают существенное влияние на кинетику связывания с grA33.

Пример 2

Конструкция grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател и Fc - диател и контрольных диател

В **таблице 2** содержится перечень последовательностей полипептидных цепей предпочтительных grA33 x CD3 диател и grA33 x CD3 Fc – диател, которые

экспрессировали и очищали. Обнаружили, что диатела способны одновременно связываться с gpA33 и CD3, судя по обнаружению такого одновременного связывания иллюстративными gpA33 x CD3 биспецифическими моновалентными диателами, DART-1 и DART-2, и иллюстративным gpA33 x CD3 биспецифическим моновалентным Fc - диателом (DART-2 w/Fc). Кроме того, получили контрольное биспецифическое моновалентное диатело (“контрольное DART”), которое являлось биспецифическим моновалентным в отношении CD3 и FITC, и было обнаружено, что оно способно одновременно связываться с CD3 и FITC.

Таблица 2	
Диатело	Полипептиды - заместители (в направлении от N-конца к С-концу)
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-1)	SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:23
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-2)	SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:30
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD), содержит альбуминсвязывающий домен (ABD) для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:30
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее версию 1 домена Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc), содержит домен Fc для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:42 SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:46
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее версию 2 домена Fc IgG (версия 2 DART-2 w/Fc), содержит домен Fc для увеличения периода полужизни <i>in vivo</i>	SEQ ID NO:48 SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:46

gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух полипептидных цепей (одна цепь каждой перечисленной последовательности), и gpA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела представляют собой гетеродимеры, состоящие из трех полипептидных цепей (одна цепь каждой перечисленной аминокислотной последовательности). Способы образования биспецифических моновалентных диател представлены в

международных патентных публикациях №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 и WO 2012/162067.

Было обнаружено, что контрольное CD3 x FITC биспецифическое моновалентное диатело способно одновременно связываться с CD3 и с FITC. Было обнаружено, что описанные выше grA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела и grA33 x CD3 биспецифические моновалентные Fc - диатела способны одновременно связываться с grA33 и с CD3. Чтобы продемонстрировать такое одновременное связывание, grA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 инкубировали в присутствии растворимого фрагмента CD3, который был иммобилизован на твердой подложке. Обнаружение связывания оценивали с помощью способности иммобилизованных антител дополнительно связывать grA33. Результаты подтверждают способность описанных выше grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател и grA33 x CD3 биспецифических моновалентных Fc - диател опосредовать одновременное связывание с grA33 и CD3 (**фигура 3**).

Пример 3

grA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела являются цитотоксическими в отношении злокачественных клеток

Способность grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател согласно настоящему изобретению лечить злокачественную опухоль проиллюстрировали путем инкубации клеток колоректального рака или клеток рака поджелудочной железы в присутствии grA33 x CD3 биспецифического моновалентного DART-1 и либо PBMC человека (E:T = 25:1), либо активированных Т-клеток человека (E:T = 10:1). grA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 проявило сильную способность к перенаправленному цитолизу с концентрациями, требующими достижения 50% максимальной активности (EC50) в диапазоне от суб-нг/мл до приблизительно 1 нг/мл. Напротив, цитотоксичность не наблюдалась при использовании grA33-отрицательных клеточных линий злокачественной опухоли (например, HCT116). Результаты исследования показаны на **фигуре 4А** (клетки колоректального рака, сходные со стволовыми (клетки Colon CSCL), на **фигуре 4В** (клетки колоректального рака Colo205) и на **фигуре 4С** (клетки рака поджелудочной железы ASPC-1). Результаты обобщенно представлены в **таблице 3**.

Таблица 3			
Целевая клеточная линия	EC50 grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (нг/мл)	Эффектор:мишень (Е:Т)	Максимальный наблюдаемый цитолиз в %
Colon CSLC	0,9015	25:1	38
Colo205	0,5853	10:1	35
ASPC-1	1,142	10:1	25

Пример 4

Т-клеточная активация в присутствии grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател

Для того чтобы дополнительно показать способность диател согласно настоящему изобретению лечить злокачественную опухоль, дремлющие Т-клетки человека инкубировали с grA33 x CD3 биспецифическими моновалентными DART-1 в присутствии или при отсутствии злокачественных клеток (colo205 или ASPC-1). Для получения характеристик Т-клеточной активации во время опосредованного grA33 x CD3 биспецифическим моновалентным диателом (DART-1) процесса перенаправленного цитолиза, Т-клетки из анализов перенаправленного цитолиза окрашивали в отношении маркера Т-клеточной активации CD25 и анализировали с помощью FACS. CD25 подвергался положительной регуляции в CD8 (**фигуры 5A-5B**) и CD4 (**фигуры 5D-5E**) Т-клетках зависимым от дозы образом, указывая на то, что grA33 x CD3 биспецифические моновалентные диатела индуцировали Т-клеточную активацию в процессе перенаправленного цитолиза. Напротив, при отсутствии клеток - мишеней не наблюдалась активация CD8 (**фигура 5C**) или CD4 (**фигура 5F**) Т-клеток, что указывает на то, что gr-A33 x CD3 диатела не активируют Т-клетки при отсутствии клеток - мишеней. Аналогично, CD8 или CD4 Т-клетки не были активированы при инкубации с клетками - мишенями и контрольным биспецифическим моновалентным диателом (контрольным DART) (**фигуры 5A-5B** и **фигуры 5D-5F**, соответственно), что указывает на необходимость перекрестной сшивки Т-клетки и клетки - мишени с grA33 x CD3 биспецифическими моновалентными диателами.

Пример 5

Эквивалентность gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-1), характеризующегося последовательностями мышинового варибельного домена антитела к gpA33 человека, и gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2), характеризующегося последовательностями гуманизированного варибельного домена антитела к gpA33 человека

Как обсуждалось выше, gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 содержит домены VL_{gpA33} и VH_{gpA33} мышинового моноклонального антитела, тогда как gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-2 содержит гуманизированный домен VL_{gpA33} и гуманизированный домен VH_{gpA33} того же мышинового антитела. Чтобы продемонстрировать способность гуманизированных доменов VL_{gpA33} и VH_{gpA33} стимулировать нацеливание Т-клеток на экспрессирующие gpA33 злокачественные клетки, злокачественные клетки, которые экспрессируют gpA33, инкубировали в присутствии дремлющих Т-клеток (анализ LDH; Е:Т = 10:1) в присутствии либо DART-1, DART-1, либо контрольного биспецифического моновалентного диатела (контрольного DART). Результаты настоящего анализа (показанного на **фигурах 6А-6D**) показали, что DART-1 и DART-2 опосредовали эквивалентную цитотоксичность в отношении клеток колоректальной аденокарциномы SW948 (**фигура 6А**) и клеток colo205 (**фигура 6В**). Как DART-1, так и DART-2 опосредовали цитотоксичность экспрессирующей люциферазу клеточной линии Colo205, которая была стабильно трансфектирована с геном люциферазы светлячка (luc2) (Colo205-Luc), что измеряли по сниженной люминесценции (**фигура 6С**). Ни DART-1, ни DART-2 не опосредовали цитотоксичность gpA33-отрицательной клеточной линии злокачественной опухоли, HCT116 (**фигура 6D**). Как показано в **таблице 4**, DART-1 и DART-2 проявили сходную эквивалентную биоактивность против множественных опухолевых клеточных линий.

Таблица 4					
Эффектор/мишень		Анализ LDH		Люциферазный анализ	
Донорная Т-клетка	Опухолевая клеточная линия	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1
D54677	SW948	0,79	1,34		

D54677	Colo205	1,17	2,52		
D51031	Colo205-Luc	2,29	3,53	2,53	4,55
D41440	Colo205	2,29	3,37		
D41440	Colo205-Luc	2,80	4,26	2,57	3,26

Пример 6

Перекрестная реактивность grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател, grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател, содержащих альбуминсвязывающий домен, и grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател, содержащих домен Fc IgG, с PBMC яванского макака

Как показано выше, гуманизированный домен $V_{L_{grA33}}$ и гуманизированный домен $V_{H_{grA33}}$ grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела DART-2 опосредуют цитотоксичность grA33-экспрессирующих злокачественных клеток в присутствии Т-клеток человека. Неожиданно обнаружили, что домены $V_{L_{CD3}}$ и $V_{H_{CD3}}$ grA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател согласно настоящему изобретению также способны связываться с CD3 Т-клеток яванского макака и перенаправлять указанные клетки на уничтожение экспрессирующих grA33 клеток.

Как показано на **фигурах 7A-7D**, было обнаружено, что все из grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела DART-2, grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD), и grA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела DART-2, содержащего домен Fc IgG (DART-2 w/Fc) были способны стимулировать цитотоксичность злокачественных клеток в присутствии PBMC человека или яванского макака. На **фигурах 7A-7B** показана способность трех диател опосредовать цитотоксичность клеток Colo205-Luc, которые инкубировали с PBMC человека, которую измеряли с помощью анализа LDH (**фигура 7A**) или люциферазного анализа (**фигура 7B**). На **фигурах 7C-7D** показана соответствующая способность трех диател опосредовать цитотоксичность клеток Colo205-Luc, которые инкубировали с PBMC яванского макака, которую измеряли с помощью анализа LDH (**фигура 7A**) или люциферазного анализа (**фигура 7B**).

Как показано в **таблице 5**, grA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-2 и grA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD), проявляли сопоставимую CTL -

активность. Биспецифические моновалентные диатела проявили сходную активность в отношении эффекторных клеток РВМС как человека, так и яванского макака (суно).

Таблица 5				
	EC50 – CTL активность (нг/мл) Клетки - мишени Colo205			
	Анализ LDH		Люциферазный анализ	
DART	РВМС человека	РВМС суно	РВМС человека	РВМС суно
gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-2)	4,09	3,81	2,73	1,55
gpA33 x CD3 биспецифическое диатело, содержащее альбуминсвязывающий домен (DART-2 w/ABD)	5,52	4,63	3,07	1,63

Пример 7

***in vivo* реактивность gpA33 x CD3 диатела в мышинной модели опухоли толстой кишки**

Чтобы продемонстрировать *in vivo* способность gpA33 x CD3 диател согласно настоящему изобретению обеспечивать лечение злокачественной опухоли, клетки colo205 имплантировали совместно с активированными Т-клетками в страдающих диабетом без ожирения с тяжелой комбинированной иммунной недостаточностью гамма мышей (Agliano, A. *et al.* (2008) “*Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/LtSz-Scid/IL-2Rgamma Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains,*” *Int. J. Cancer* 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. *et al.* (2009) “*A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia,*” *Leukemia* 23(11):2109-2117; Racki, W.J. *et al.* (2010) “*NOD-Scid IL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection,*” *Transplantation* 89(5):527-536; Choi, B. *et al.* (2011) “*Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2Rγ(Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan,*” *J. Clin. Immunol.* 31(2):253-264; Sartelet, H. *et al.* (2012) “*Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/IL2rg Null (NSG) Mice,*” *In Vivo* 26(1):19-29; Spranger, S. *et al.* (2012) “*NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To*

Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies in vivo,” J. Transl. Med. 10:30; von Bonin, M. et al. (2013) “*in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice,*” PLoS One. 8(4):e60680).

gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 вводили внутривенно мышам один раз в день в течение 4 дней (QDx4), начиная со дня имплантации. Обнаружили, что объем опухоли Colo205 увеличился у мышей, получающих контроль - инертный носитель (**фигура 8**). Тем не менее, обнаружили, что животные, получающие DART-1, проявляли пониженный объем опухоли Colo205 или ее отсутствие (**фигура 8**).

Изображение мышей NSG, которым имплантировали клетки Colo205, показало, что на 2 день лечение мыши, получающие инертный носитель (**фигура 9A**) или gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1 (**фигура 9B**), характеризовались наличием значительных опухолей. Тем не менее, на 12 день лечения мыши, получающие gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1, характеризовались резко уменьшенными объемами опухолей (**фигура 9D**). На 12 день лечения мыши, получающие инертный носитель, продемонстрировали увеличенный объем опухоли (**фигура 9C**).

В качестве дополнительного доказательства *in vivo* способности gpA33 x CD3 диател согласно настоящему изобретению обеспечивать лечение злокачественной опухоли, описанную выше модель опухоли проводили с использованием клеток опухоли поджелудочной железы ASPC-1 и активированных Т-клеток человека (E:T = 1:1). gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело DART-1, контрольное биспецифическое моновалентное диатело (контрольное DART) или инертный носитель вводили внутривенно один раз в день в течение 9 дней (QDx9), начиная со дня имплантации. Обнаружили, что объем опухоли ASPC-1 увеличивался у мышей, получающих контроль - инертный носитель (**фигура 10**). Тем не менее, обнаружили, что животные, получающие DART-1, проявляли уменьшенный объем опухоли, зависимым от дозы образом (**фигура 10**).

Пример 8**Определение эффективности версии 1 gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc)**

Для определения эффективности версии 1 gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc), мышам проводили инфузию (с использованием осмотических насосов) в течение 7 дней с описанной выше версией 1 DART-2 w/Fc при различных уровнях дозировки. Через 48 ч после имплантации насоса (т.е. в присутствии устойчивого уровня циркулирующей в крови версии 1DART-2 w/Fc), смесь опухолевых клеток Colo205 и Т-клеток имплантировали подкожно в организм мышей и осуществляли мониторинг степени роста опухоли. В **таблице 6** обобщенно представлена схема исследования; каждая группа содержала по 8 самок мышей.

Таблица 6				
Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь / Схема	Клеточный(е) имплантат(ы)
1	Инертный носитель	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	gpA33xCD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее домен Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc)	3,1	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
3	Версия 1 DART-2 w/Fc	1,5	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
4	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,75	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
5	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,375	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
6	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,5	IV/QDx5	COLO205 (5E6)

Таблица 6				
Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь / Схема	Клеточный(е) имплантат(ы)
				hT-клетки (5E6)

Результаты настоящего исследования показаны на **фигуре 11** и указывают на то, что введение описанных выше gpA33 x CD3 биспецифических моновалентных диател, содержащих домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc), опосредовало резкое снижение объема опухоли во всех исследованных дозировках.

В свете резкого снижения объема опухоли, полученного в представленном выше исследовании, провели дополнительное исследование для оценки эффективности в намного меньших дозах. В **таблице 7** обобщенно представлена схема этого дополнительного исследования; каждая группа содержала по 8 самок мышей.

Таблица 7				
Группа	Лечение	Доза (мг/кг)	Путь / Схема	Клеточный(е) имплантат(ы)
1	Инертный носитель	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	gpA33xCD3 биспецифическое Моновалентное диатело, содержащее домен Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc)	0,2	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
3	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,04	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
4	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,008	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
5	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,0016	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)
6	Версия 1 DART-2 w/Fc	0,5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-клетки (5E6)

Результаты этого дополнительного исследования показаны на **фигуре 12**. На **фигуре 12** каждый символ обозначает животное, которое получило указанную дозировку описанного выше gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (версии 1 DART-2 w/Fc), или инертного носителя. Данные показывают эффективность во всех исследованных дозировках.

Пример 9

Фармакокинетический профиль gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела (DART-2) и gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного диатела, содержащего домен Fc IgG (DART-2 w/Fc), у яванского макака

Способность доменов VL_{CD3} и VH_{CD3} диател согласно настоящему изобретению связываться с CD3 яванского макака обеспечивает возможность применения этих животных для измерения *in vivo* фармакокинетики диател согласно настоящему изобретению.

Для измерения таких фармакокинетических параметров описанное выше gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело (DART-2) или gpA33 x CD3 биспецифическое моновалентное диатело, содержащее домен Fc IgG (версия 1 DART-2 w/Fc) вводили с помощью инъекции яванским макакам (10 мкг/кг/день) и подвергали мониторингу концентрацию таких молекул, оставшихся в кровотоке. На **фигуре 13** показан результат этого исследования и указано, что DART-2 и версия 1 DART-2 w/Fc проявляют кинетику выведения первого порядка.

Пример 10

Анализ SPR связывания gpA33 x CD3 биспецифического моновалентного Fc - диатела (версии 1 DART-1 w/Fc) с CD3 и gpA33 человека и яванского макака

Связывание gpA33 x CD3 биспецифического Fc - диатела (версии 1 DART-2 w/Fc) с растворимыми версиями рецептора CD3 человека и яванского макака анализировали с помощью SPR на биосенсоре VIAcore 3000 (GE, Healthcare). Рецепторы иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 согласно процедуре, рекомендуемой производителем. Кратко, карбоксильные группы на поверхности сенсорного чипа активировали инъекцией раствора, содержащего 0,2 М N-этил-N-(3-диэтиламино-пропил)карбодиимида и 0,05 М N-гидрокси-сукцинимида. Рецептор растворимого CD3 (1 мкг/мл) затем впрыскивали на активированную поверхность CM5

в 10 мМ ацетата натрия, рН 5,0, с объемной скоростью потока, составляющей 5 мл/мин, с последующим добавлением 1 М этаноламина для деактивации.

Растворимые версии CD3 яванского макака и человека, используемые в таком анализе, экспрессировали в клетках млекопитающих в виде CD3ε / CD3δ гетеродимера, стабилизированного противоположно заряженными стимулирующими образование гетеродимера E-спиральными и K-спиральными последовательностями на их C-концах. Растворимый CD3ε яванского макака содержал первые 118 аминокислотных остатков CD3ε яванского макака с аллелем V35 (FN18+), за которым следовал описанный выше E-спиральный домен (SEQ ID NO:3) на карбокси-конце. Аминокислотная последовательность аллеля V35 (FN18+) CD3ε яванского макака представляет собой следующее (SEQ ID NO:49):

```
MQSGTRWRVL GLCLLSIGVW GQDGNEEMGS ITQTPYQVSI SGTTVILTCS
QHLGSEAQWQ HNGKNKEDSG DRLFLPEFSE MEQSGYYVCY PRGSNPEDAS
HNLYLKARVC ENCMEMDVMA VATIVIVDIC ITLGLLLLVIY YWSKNRKAKA
KPVTRGAGAG GRQRGQNKER PPPVNPDIYE PIRKGQQDLY SGLNQRRI
```

Растворимый CD3δ яванского макака содержал первые 101 аминокислотный остаток CD3δ яванского макака, за которым следовал описанный выше K-спиральный домен (SEQ ID NO:4) на карбокси-конце. Аминокислотная последовательность CD3δ яванского макака представляет собой следующее (SEQ ID NO:50):

```
MEHSTFLSGL VLATLLSQVS PFKIPVEELE DRVFKCNTS VTWVEGTVGT
LLTNNTRLDL GKRILDPGI YRCNGTDIYK DKESAVQVHY RMCQNCVELD
PATLAGIIVT DVIATLLLLAL GVFCFAGHET GRLSGAADTQ ALLRNDQVYQ
PLRDRDDAQY SRLGGNWARN K
```

Два белка коэкспрессировали в клетках CHO-S млекопитающего и очищали с использованием mAb к E/K-спирали, прикрепленном к SEPHAROSE®.

Растворимый CD3ε человек содержал остатки 1-127 CD3ε человека с C119S и C122S, за которыми следовал описанный выше E-спиральный домен (SEQ ID NO:3) на карбокси-конце. Аминокислотная последовательность CD3ε человека представляет собой следующее (SEQ ID NO:51):

```
MQSGTHWRVL GLCLLSVGVW GQDGNEEMGG ITQTPYKVSI SGTTVILTCP
QYPGSEILWQ HNDKNIGGDE DDKNIGSDED HLKSLKEFSEL EQSGYYVCYP
RGSKPEDANF YLYLRARVCE NCMEMDVMSV ATIVIVDICI TGGLLLLVIYY
WSKNRKAKAK PVTRGAGAGG RQRGQNKERP PPVNPDIYEP IRKGQRDLYS
GLNQRRI
```

Растворимый CD3δ человека содержал остатки 1-101 CD3δ человека, за которыми следовал описанный выше K-спиральный домен (SEQ ID NO:4) на

карбокси-конце. Два белка коэкспрессировали в клетках CHO-S млекопитающего и очищали с использованием с использованием аффинной колонки к E/K-спирали. Аминокислотная последовательность CD3 δ человека представляет собой следующее (SEQ ID NO:52):

```
FKIPIEELE   DRVFNVCNTS   ITWVEGTVGT   LLSDITRLDL   GKRILDPRGI
YRCNGTDIYK   DKESTVQVHY   RMCQSCVELD   PATVAGIIVT   DVIATLLLLAL
GVFCFAGHET   GRLSGAADTQ   ALLRNDQVYQ   PLRDRDDAQY   SHLGGNWARN K
```

Растворимый gpA33 человека содержал остатки 1-235 gpA33 человека с (SEQ ID NO:53) повторами нннннн (“6His”) на карбокси-конце. Растворимый gpA33 яванского макака содержал остатки 1-314 gpA33 яванского макака от Met 1 до Gln 314 с 6 His повторами на карбокси-конце. Белки экспрессировали в клетках CHO-S млекопитающего и очищали с использованием Ni SEPHAROSE®.

Эксперименты по связыванию проводили в буфере HBS-EP, который содержит 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активное вещество P20. Связывание версии 1 DART-2 w/Fc анализировали (в двух параллелях) в концентрациях, составляющих 0, 6,25, 12,5, 25, 50 и 100 нМ, впрыскиваемых в течение 120 секунд с объемной скоростью потока, составляющей 30 мкл/мин.

Восстановление поверхности иммобилизованного рецептора проводили путем импульсной инъекции 10 mM глицина, pH 1,5. Стандартные кривые получали путем впрыскивания каждого разведения DART-2 w/Fc на обработанную поверхность без иммобилизованного белка. Кривые связывания в нулевой концентрации вычитали как фон. Данные KD определяли путем глобальной аппроксимации кривых связывания с моделью связывания 1:1 Ленгмюра (программное обеспечение BIAevaluation™ v4.1).

Анализ SPR связывания gpA33 x CD3 биспецифического Fc - диатела (версии 1 DART-2 w/Fc) с CD3 и gpA33 человека и яванского макака продемонстрировал существенное сходство молекул из двух различных видов (**фигуры 14А-14В; фигуры 15А-15В**). В **таблице 8** представлены равновесные константы диссоциации (KD), рассчитанные путем глобальной аппроксимации к константам аффинности и кинетическим константам 1:1 модели Ленгмюра для взаимодействий DART-2 w/Fc. Значения KD версии 1 DART-2 w/Fc для CD3 человека и яванского макака являются почти идентичными при 23 и 26 нМ, соответственно, несмотря на некоторое различие в реакциях максимального связывания между двумя антигенами. Случайная ориентация антигенов с различными аминокислотными последовательностями, непосредственно иммобилизованными на поверхности, может привести к различным плотностям

доступных сайтов связывания на поверхности. Значения K_D для взаимодействия версии 1 DART-2 w/Fc с gpA33 человека и обезьяны представляют собой 2,2 нМ и 12 нМ, соответственно (таблица 8). Различие в аффинности является результатом небольшого снижения константы скорости ассоциации и увеличения константы скорости диссоциации для взаимодействия версии 1 DART-2 w/Fc с gpA33 яванского макака (таблица 8). Данные представляют собой средние значения от трех независимых экспериментов в двух параллелях (SD = стандартное отклонение; h, человек; cyno, яванский макак).

Антигены	k_a (\pmSD) ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (\pmSD) (c^{-1})	K_D (\pmSD) (нМ)
hCD3 ϵ/δ	$1,5(\pm 0,1) \times 10^5$	$3,5(\pm 0,06) \times 10^{-3}$	$23 \pm 2,0$
cynoCD3 ϵ/δ	$1,3(\pm 0,02) \times 10^5$	$3,4(\pm 0,02) \times 10^{-3}$	$26 \pm 0,6$
hgpA33-His	$4,2(\pm 0,3) \times 10^5$	$9,0(\pm 0,5) \times 10^{-4}$	$2,2 \pm 0,2$
cynogpA33-His	$2,3(\pm 0,2) \times 10^5$	$2,8(\pm 0,1) \times 10^{-3}$	$12 \pm 1,0$

Все упомянутые в настоящем описании изобретения публикации и патенты включены в настоящий документ в той же степени, как если бы было предусмотрено, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и индивидуально включена посредством ссылки во всей своей полноте. Наряду с тем, что настоящее изобретение было описано с использованием конкретных его вариантов осуществления, следует понимать, что возможны дополнительные модификации, и предусмотрено, что настоящая заявка охватывает любые изменения, применения или адаптации настоящего изобретения, следуя в целом принципам настоящего изобретения и включая в себя такие отклонения от настоящего раскрытия, которые согласуются с известной или общепринятой практикой в настоящей области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение, и которые могут быть применены к основным признакам, изложенным выше в настоящем документе.

Перечень последовательностей

<110> МАКРОДЖЕНИКС, ИНК.
Moore, Paul
Li, Jonathan
Chen, Francine
Johnson, Leslie
Shah, Kalpana
Bonvini, Ezio

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ МОНОВАЛЕНТНЫЕ ДИАТЕЛА, КОТОРЫЕ СПОСОБНЫ СВЯЗЫВАТЬСЯ С
GPA33

И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 1301.0112PCT

<150> US 61/869,528

<151> 2013-08-23

<150> US 61/907,691

<151> 2013-11-22

<150> EP 13198859

<151> 2013-12-20

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 1 Polypeptide

<400> 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 2 Polypeptide

<400> 2

Gly Gly Cys Gly Gly Gly
1 5

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E-Coil Domain

<400> 3

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> K-Coil Domain

<400> 4

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 5

<211> 110

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(110)

<223> Light Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 5

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> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(14)
<223> CDR1 of Light Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 6

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

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

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)
<223> CDR2 of Light Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 7

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDR3 of Light Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 8

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
1 5

<210> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(125)

<223> Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 9

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> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(5)

<223> CDR1 of Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 10

Thr Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 11

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> CDR2 of Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 11

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(14)

<223> CDR3 of Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-CD3 Antibody

<400> 12

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Light Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 13

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
100 105

<210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(10)
<223> CDR1 of Light Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 14

Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met Tyr
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> CDR2 of Light Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 15

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(9)
<223> CDR3 of Light Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 17
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(119)

<223> Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 17

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> CDR1 of Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 18

Gly Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> CDR2 of Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 19

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<223> CDR3 of Heavy Chain Variable Domain of Murine Anti-gpA33 Antibody

<400> 20

Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 21
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of DART-1

<400> 21

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> 22
<211> 813
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-1

<400> 22
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180
cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggtggtggat ccggcggagg tggacaggtc 360
cagctgcagc agtctggacc tgagctggtg aagcctgggg cctcagtgaa gatttctctg 420
aaagcttcag gctacacatt cagtggctct tggatgaact ggggtgaagca gaggcctgga 480
cagggctctg agtggattgg acggatctac cctggagatg gagaaactaa ctacaatggg 540

aagtttaagg acaagggccac actgactgca gacaaatcat ccaccacagc ctacatggag 600
ctcagcagcc tgacctctgt ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaat ctatggtaat 660
aacgtttact tcgatgtctg gggcgcaggg accacgggtca ccgtgtcttc cggaggatgt 720
ggcgggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttgagaaa ggaggtcgct 780
gcacttgaiaa aggaggtcgc agccctggag aaa 813

<210> 23
<211> 274
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of DART-1

<400> 23

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> 24
<211> 822
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding Second Polypeptide Chain of DART-1

<400> 24
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gagggtcacc 60
atgacctgca gtgccaggtc aagtataagt ttcatgtact ggtaccagca gaagccagga 120
tcctcccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180
ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcttat tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa 240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cactcacggt cggttctggg 300
accaagctgg agctgaaacg ggggtggagga tccggcggag gcggagaggt gcagctggtg 360
gagtctgggg gaggcttggc ccagcctgga gggtcctga gactctcctg tgcagcctct 420
ggattcacct tcaacacata cgctatgaat tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg 480
gagtggggtg caaggatcag gtccaagtac aacaattatg caacctacta tgccgactct 540
gtgaaggata gattcacat ctcaagagat gattcaaaga actcactgta tctgcaaagt 600
aacagcctga aaaccgagga cacggccgtg tattactgtg tgagacacgg taacttcggc 660
aattcttacg tgtcttgggt tgcttattgg ggacagggga cactgggtgac tgtgtcttcc 720
ggaggatgtg gcgggtgaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc tttgaaagag 780

aaggctgccc cacttaagga aaaggctgca gccctgaaag ag

822

<210> 25
<211> 125
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Heavy Chain Variable Domain of Anti-CD3 Antibody

<400> 25

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> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain Variable Domain of Humanized Anti-gpA33 Antibody

<400> 26

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 Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met

20

25

30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn 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 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 27

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain Variable Domain of Humanized Anti-gpA33 Antibody

<400> 27

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 Gly Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly 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 Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 28
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of DART-2

<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 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 Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala 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 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 Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe

210

215

220

Asp Val Trp Gly Gln 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> 29
<211> 813
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-2

<400> 29
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc 180
cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggtggtggat ccggcggagg tggacaggtc 360
cagctggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaaccggag caagcgtgaa ggtctcctgc 420
aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga 480
cagggactgg agtggatcgg ggcgatctac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgga 540
aagttcaaag accgagtgac catcacagcc gataagtcta ctagtaccgc ctacatggag 600
ctgagctccc tgcggtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac 660
aatgtctatt ttgacgtgtg ggggcagggg acaactgtga ctgtctctc cggaggatgt 720
ggcgggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttgagaaa ggaggtcgct 780
gcacttghaa aggaggtcgc agccctggag aaa 813

<210> 30
<211> 273
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of DART-2

<400> 30

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 Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn 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 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

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

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
130 135 140

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
145 150 155 160

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
165 170 175

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
180 185 190

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
210 215 220

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

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

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys

Glu

<210> 31
 <211> 819
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Nucleic Acid Molecule Encoding Second Polypeptide Chain of DART-2

<400> 31
 gacattcagc tgactcagtc cccctctttt ctgtccgcat ccgtcggaga tcgagtgact 60
 attacttgct ctgctaggtc ctcaatcagc ttcattgtact ggtatcagca gaagcccggc 120
 aaagcaccta agctgctgat ctacgacaca agcaacctgg cctccggggg gccatctcgg 180
 ttctctggca gtgggtcagg aactgagttt accctgacaa ttagctccct ggaggctgaa 240
 gatgccgcta cctactattg ccagcagtg agcagctatc ctctgacctt cggacagggg 300
 actaaactgg aaatcaaggg tggaggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtggag 360
 tctggggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccttgagac tctcctgtgc agcctctgga 420
 ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 480
 tgggttgaa ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 540
 aaggatagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 600
 agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat 660
 tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tgggtgactgt gtcttcogga 720
 ggatgtggcg gtggaaaagt ggccgcactg aaggagaaag ttgctgcttt gaaagagaag 780
 gtcgccgcac ttaaggaaaa ggtcgcagcc ctgaaagag 819

<210> 32
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Linker 3 Polypeptide

<400> 32

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Linker 3 Polypeptide

<400> 33

Gly Gly Gly Asn Ser
1 5

<210> 34
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Albumin Binding Domain

<400> 34

Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Ile Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 35
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of DART-2 w/ABD

<400> 35

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 Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala 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 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 Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe
210 215 220

Asp Val Trp Gly Gln 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 Gly
260 265 270

Gly Gly Ser Leu Ala Gln Ala Lys Glu Ala Ala Ile Arg Glu Leu Asp
275 280 285

Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys
290 295 300

Ser Ala Glu Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu
305 310 315 320

Pro

<210> 36
<211> 963
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-2
w/ABD

<400> 36

```
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc      180
cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggg atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtgat cggcgaggagg tggacaggtc      360
cagctggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaaccggag caagcgtgaa ggtctctctgc      420
aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga      480
cagggactgg agtggatcgg ggcgatctac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgga      540
aagttcaaag accgagtgac catcacagcc gataagtcta ctagtaccgc ctacatggag      600
ctgagctccc tgcgggtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac      660
aatgtctatt ttgacgtgtg ggggcagggg acaactgtga ctgtctctc cggaggatgt      720
ggcgggtggg aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttggagaa ggaggtcgct      780
gcacttghaa aggaggtcgc agccctggag aaaggcggcg ggtctctggc ccaggcaaaa      840
gaggcagcca tccgcgaact ggataaatat ggcgtgagcg attattataa gaacctgatt      900
gacaacgcaa aatccgcgga aggcgtgaaa gcactgattg atgaaattct ggccgccttg      960
cct                                                                                   963
```

<210> 37

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 4 Polypeptide

<400> 37

```
Ala Pro Ser Ser Ser
1           5
```

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 4 Polypeptide

<400> 38

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide 1

<400> 39

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 40

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CH2 and CH3 Domains of Modified Fc Domain of First DART
Polypeptide Chain

<400> 40

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130

135

140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 41
<211> 217
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CH2 and CH3 Domains of Modified Fc Domain of Third DART
Polypeptide Chain

<400> 41

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 42

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of DART-2 w/Fc Version 1 Construct

<400> 42

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 Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn 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 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 Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
100 105 110

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

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 130 135 140

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 145 150 155 160

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 165 170 175

Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys
 180 185 190

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
 210 215 220

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

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

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

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 43
<211> 1509
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic Acid Molecule Encoding First Polypeptide Chain of DART-2
w/Fc Version 1 Construct

<400> 43
gacattcagc tgactcagtc ccctctttt ctgtccgcat ccgtcggaga tcgagtgact 60
attacttgct ctgctaggtc ctcaatcagc ttcatgtact ggtatcagca gaagcccggc 120
aaagcaccta agctgctgat ctacgacaca agcaacctgg cctccggggg gccatctcgg 180
ttctctggca gtgggtcagg aactgagttt accctgacaa ttagctccct ggaggctgaa 240
gatgccgcta cctactattg ccagcagtgg agcagctatc ctctgacctt cggacagggg 300
actaaactgg aatcaaggg tggaggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtggag 360
tctgggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 420
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 480
tgggttgaa ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 540

aaggatagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 600
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat 660
tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tggtgactgt gtcttcogga 720
ggatgtggcg gtggagaagt ggccgcactg gagaaagagg ttgctgcttt ggagaaggag 780
gtcgctgcac ttgaaaagga ggtcgcagcc ctggagaaag gcggcgggga caaaactcac 840
acatgccac cgtgccagc acctgaagcc gcggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg 960
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1140
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgtggtgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccagc cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaa 1509

<210> 44
<211> 271
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of DART-2 w/Fc Version 1 Construct

<400> 44

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 Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala 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 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 Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe
210 215 220

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys
225 230 235 240

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

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

<210> 45

<211> 813

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Nucleic Acid Molecule Encoding Second Polypeptide Chain of DART-2
w/Fc Version 1 Construct

<400> 45

caggctgtgg tgactcagga gccttactg accgtgtccc caggcggaac tgtgacctg 60

acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120

aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc ggggggtacaa acaaaagggc tccttgacc 180

cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat cgggcggagg tggacaggtc 360
 cagctggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaaccggag caagcgtgaa ggtctcctgc 420
 aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga 480
 cagggactgg agtggatcgg gcgcatctac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgga 540
 aagttcaaag accgagtgc catcacagcc gataagtcta ctagtaccgc ctacatggag 600
 ctgagctccc tgcggtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac 660
 aatgtctatt ttgacgtgtg ggggcagga acaactgtga ctgtctctc cggaggatgt 720
 ggcggtggaa aagtggccgc actgaaggag aaagttgctg ctttgaaaga gaaggtcgcc 780
 gcacttaagg aaaaggtcgc agccctgaaa gag 813

<210> 46

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of DART-2 w/Fc Version 1 Construct

<400> 46

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 47
<211> 681
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nucleic acid Molecule Encoding Third Polypeptide Chain of DART-2
w/Fc Version 1 Construct

<400> 47
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaag ccgcgggggg accgtcagtc 60
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
tgcggtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 180
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 360
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 420
aaccaggtca gcctgagttg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 540
gacggctcct tcttctcgt cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accgctacac gcagaagagc 660
ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 48
<211> 508
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of DART-2 w/Fc Version 2 Construct

<400> 48

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

210						215										220
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Met	Glu	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	
				245					250					255		
Thr	Cys	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Ser	Phe	Met	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	
			260					265						270		
Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	
		275					280					285				
Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	
	290					295					300					
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	
305					310					315					320	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	
				325					330						335	
Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Gln	
			340					345					350			
Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	
		355					360						365			
Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	Ala	Met	Asn	
	370					375					380					
Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Gly	Arg	Ile	
385					390					395					400	
Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	
				405					410						415	
Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	
			420					425					430			
Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	
		435					440						445			
Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe	Ala	Tyr	Trp	
	450					455					460					
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Gly	

465 470 475 480

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
485 490 495

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
500 505

<210> 49
<211> 198
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(198)
<223> V35 allele (FN18+) of CD3 epsilon

<400> 49

Met Gln Ser Gly Thr Arg Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Ile Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Gln Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Ser Gln His Leu Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys
50 55 60

Asn Lys Glu Asp Ser Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu
65 70 75 80

Met Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro
85 90 95

Glu Asp Ala Ser His His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn
100 105 110

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
115 120 125

Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
130 135 140

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
145 150 155 160

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
 165 170 175

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly
 180 185 190

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195

<210> 50
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> *Macaca fascicularis*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(171)
 <223> CD3 delta

<400> 50

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Val Glu Glu Leu Glu Asp Arg
 20 25 30

Val Phe Val Lys Cys Asn Thr Ser Val Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
 35 40 45

Gly Thr Leu Leu Thr Asn Asn Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
 50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
 65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Ala Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys
 85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Leu Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
 100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
 115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
 130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
 145 150 155 160

Ser Arg Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 51
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(207)
<223> CD3 epsilon

<400> 51

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 52
<211> 150
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(150)
<223> CD3 delta

<400> 52

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys
1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly
35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr
50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro
65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu
85 90 95

Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His Glu Thr Gly Arg Leu
100 105 110

Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr
115 120 125

Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly
130 135 140

Asn Trp Ala Arg Asn Lys
145 150

<210> 53
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 6His Peptide

<400> 53

His His His His His His
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heterodimerization Domain

<400> 54

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heterodimerization Domain

<400> 55

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heterodimerization Domain

<400> 56

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Heterodimerization Domain

<400> 57

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое моновалентное диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное диатело способно специфически связываться с эпитопом grA33 и с эпитопом CD3, причем биспецифическое моновалентное диатело содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
 - i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с grA33 (VH_{grA33}) (**SEQ ID NO:27**); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
 - ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой К-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**) или Е-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**);
- B. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
 - i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с grA33 (VL_{grA33}) (**SEQ ID NO:26**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
 - ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой Е-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) или К-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и причем

указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена;

и при этом:

- (a) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (b) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом grA33.

2. Биспецифическое моновалентное диатело по п. 1, в котором указанная первая полипептидная цепь содержит альбуминсвязывающий домен (**SEQ ID NO:34**), причем указанный домен расположен на C-конце по отношению к указанному домену 2 и отделен от указанного домена 2 линкером 3 (**SEQ ID NO:32**).

3. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc - диатело способно специфически связываться с эпитопом grA33 и с эпитопом CD3 и содержит домен Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
 - i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с grA33 (VL_{grA33}) (**SEQ ID NO:26**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), причем указанные субдомены (1A)

- и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
- ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и
 - iii. домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**) и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG; причем указанные домены 3 и 2 отделены друг от друга спейсерным пептидом (линкер 5) (**SEQ ID NO:33**);
- B.** вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
 - ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**) или E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и
- C.** третья полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу, домен 3, содержащий:
- (1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**); и

- (2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;

и при этом:

- (a) указанные полипептидные части доменов Fc IgG указанной первой и третьей полипептидной цепи образуют указанный домен Fc IgG;
- (b) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (c) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом grA33.

4. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc - диатело способно специфически связываться с эпитопом grA33 и с эпитопом CD3 и содержит домен Fc IgG, причем биспецифическое моновалентное Fc - диатело содержит первую полипептидную цепь, вторую полипептидную цепь и третью полипептидную цепь, причем указанная первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом, и при этом:

- A. первая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 3, содержащий субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**), и субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;
- ii. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с grA33 (VL_{grA33}) (**SEQ ID NO:26**), и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VH_{CD3}) (**SEQ ID NO:25**), причем указанные субдомены (1A)

- и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
- причем указанные домены 1 и 3 отделены друг от друга спейсерным пептидом (линкер 4) (**SEQ ID NO:38**);
- iii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**) или K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и
- В. вторая полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу:
- i. домен 1, содержащий субдомен (1A), который содержит домен VL моноклонального антитела, способного связываться с CD3 (VL_{CD3}) (**SEQ ID NO:5**); и субдомен (1B), который содержит домен VH моноклонального антитела, способного связываться с gpA33 (VH_{gpA33}) (**SEQ ID NO:27**); причем указанные субдомены (1A) и (1B) отделены друг от друга пептидным линкером (**SEQ ID NO:1**);
- ii. домен 2, причем указанный домен 2 представляет собой K-спиральный домен (**SEQ ID NO:4**) или E-спиральный домен (**SEQ ID NO:3**), причем указанный домен 2 отделен от указанного домена 1 пептидным линкером (**SEQ ID NO:2**); и причем указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи не представляют собой оба E-спиральных домена или оба K-спиральных домена; и
- С. третья полипептидная цепь содержит, в направлении от N-конца к C-концу, домен 3, содержащий:
- (1) субдомен (3A), который содержит цистеинсодержащий пептид (пептид 1) (**SEQ ID NO:39**); и
 - (2) субдомен (3B), который содержит полипептидную часть домена Fc IgG, содержащую домены CH2 и CH3 домена Fc иммуноглобулина IgG;
- и при этом:
- (а) указанные полипептидные части доменов Fc IgG указанной первой и третьей полипептидной цепи образуют указанный домен Fc IgG;

- (b) указанный домен VL указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VH указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом CD3; и
- (c) указанный домен VH указанной первой полипептидной цепи и указанный домен VL указанной второй полипептидной цепи образуют антигенсвязывающий домен, способный специфически связываться с эпитопом grA33.

5. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело по любому из пп. 3-4, в котором указанный субдомен (3B) указанной первой полипептидной цепи содержит последовательность, отличную от последовательности указанного субдомена (3B) указанной третьей полипептидной цепи.

6. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело по п. 5, в котором указанный субдомен (3B) указанной первой полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:40**, и указанный субдомен (3B) указанной третьей полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:41**.

7. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело по п. 5, в котором указанный субдомен (3B) указанной первой полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:41**, и указанный субдомен (3B) указанной третьей полипептидной цепи характеризуется аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:40**.

8. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело по любому из пп. 3-4, в котором указанный домен 3 указанной первой полипептидной цепи и/или указанный домен 3 указанной третьей полипептидной цепи содержит вариантную последовательность CH2-CH3, которая проявляет измененное связывание с рецептором Fcγ.

9. Биспецифическое моновалентное диатело по любому из пп. 1-2 или биспецифическое моновалентное Fc - диатело по любому из пп. 3-8, в котором

указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи содержит E-спираль (**SEQ ID NO:3**), и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит K-спираль (**SEQ ID NO:4**).

10. Биспецифическое моновалентное диатело по любому из пп. 1-2 или биспецифическое моновалентное Fc - диатело по любому из пп. 3-8, в котором указанный домен 2 указанной первой полипептидной цепи содержит K-спираль (**SEQ ID NO:4**), и указанный домен 2 указанной второй полипептидной цепи содержит E-спираль (**SEQ ID NO:3**).

11. Биспецифическое моновалентное диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное диатело способно специфически связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом grA33, причем указанное биспецифическое моновалентное диатело содержит:

- (1) первую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:28**, и вторую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:30**; или
- (2) первую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:35**, и вторую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:30**;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом дисульфидной связью.

12. Биспецифическое моновалентное Fc - диатело, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc - диатело способно специфически связываться с эпитопом CD3 и с эпитопом grA33 и содержит домен Fc IgG, причем указанное биспецифическое моновалентное Fc - диатело содержит:

- (1) первую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:42**, вторую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:44**, и третью полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:46**; или

- (2) первую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:48**, вторую полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:28**, и третью полипептидную цепь, характеризующуюся аминокислотной последовательностью **SEQ ID NO:46**;

причем указанная первая и указанная вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом первой дисульфидной связью, и указанная первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом второй дисульфидной связью.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое моновалентное диатело по любому из пп. 1-2 или 9-12 или биспецифическое моновалентное Fc - диатело по любому из пп. 3-10; и физиологически приемлемый носитель.

14. Применение фармацевтической композиции по п. 13 в лечении злокачественной опухоли, характеризующейся экспрессией gpA33.

15. Применение по п. 14, при котором указанная злокачественная опухоль представляет собой колоректальный рак, рак толстой кишки, рак желудка или рак поджелудочной железы.

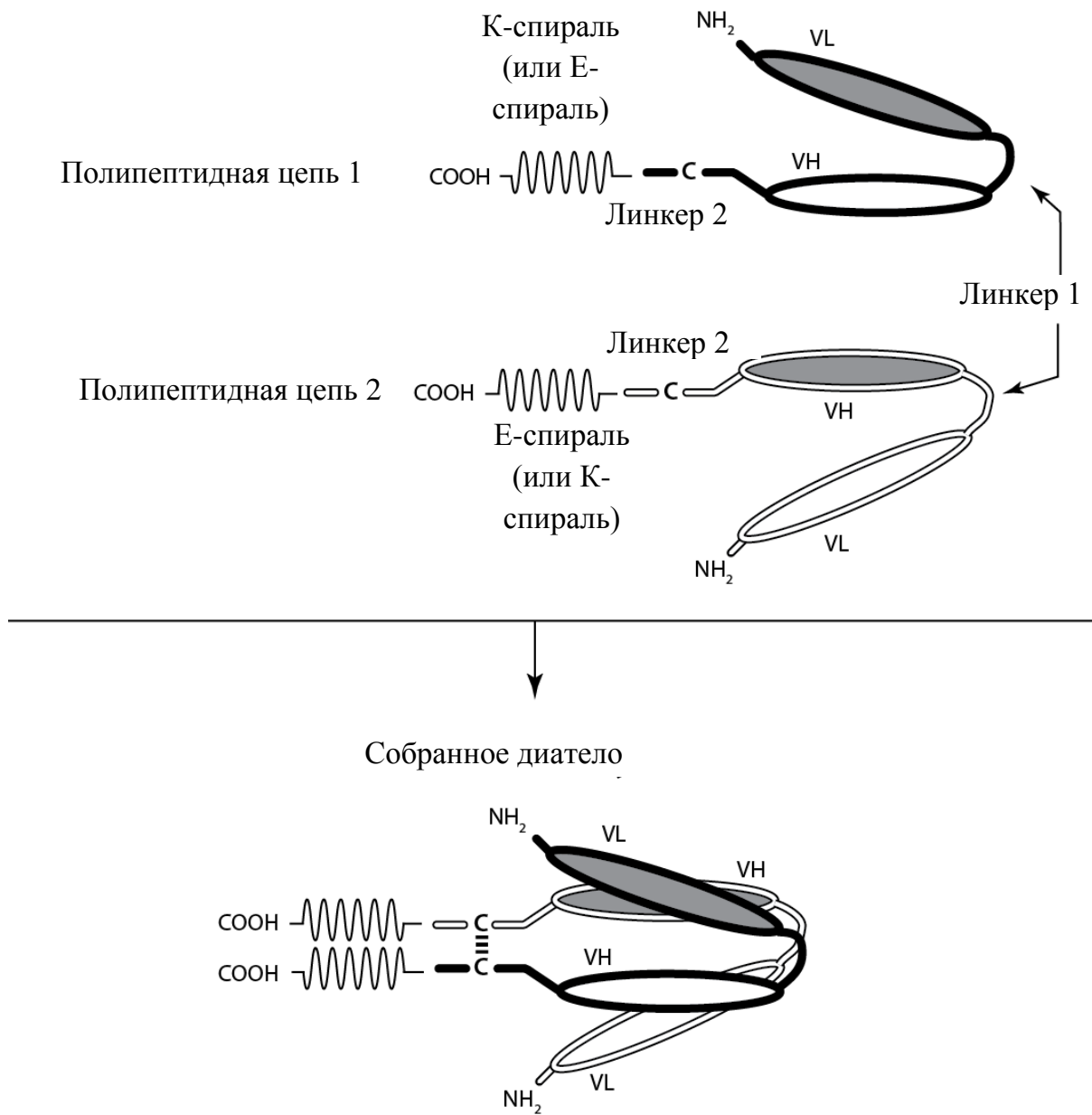
16. Клетка, которая экспрессирует полипептидную цепь любого из биспецифических моновалентных диател по пп. 1-2 или 9-12 или полипептидную цепь любого из биспецифических моновалентных Fc - диател по пп. 3-10.

17. Полинуклеотид, который кодирует полипептид по п. 16.

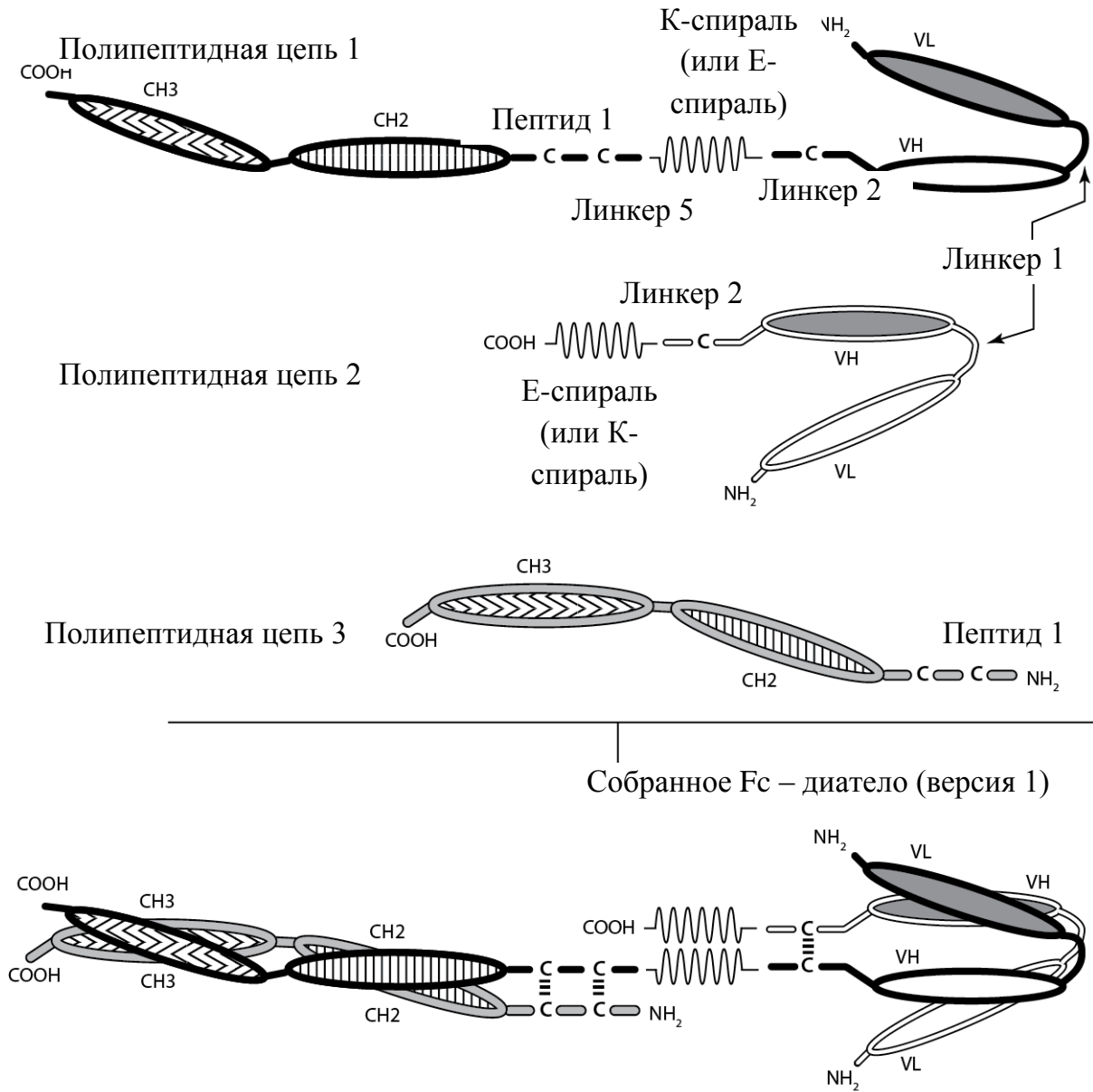
18. Клетка, которая экспрессирует антитело или его полипептидную часть или фрагмент, причем антитело связывается с gpA33, и при этом антитело или его полипептидная часть или фрагмент содержит:

- (1) CDR1 (**SEQ ID NO:14**), CDR2 (**SEQ ID NO:15**) и CDR3 (**SEQ ID NO:16**) легкой цепи антитела к gpA33 человека;

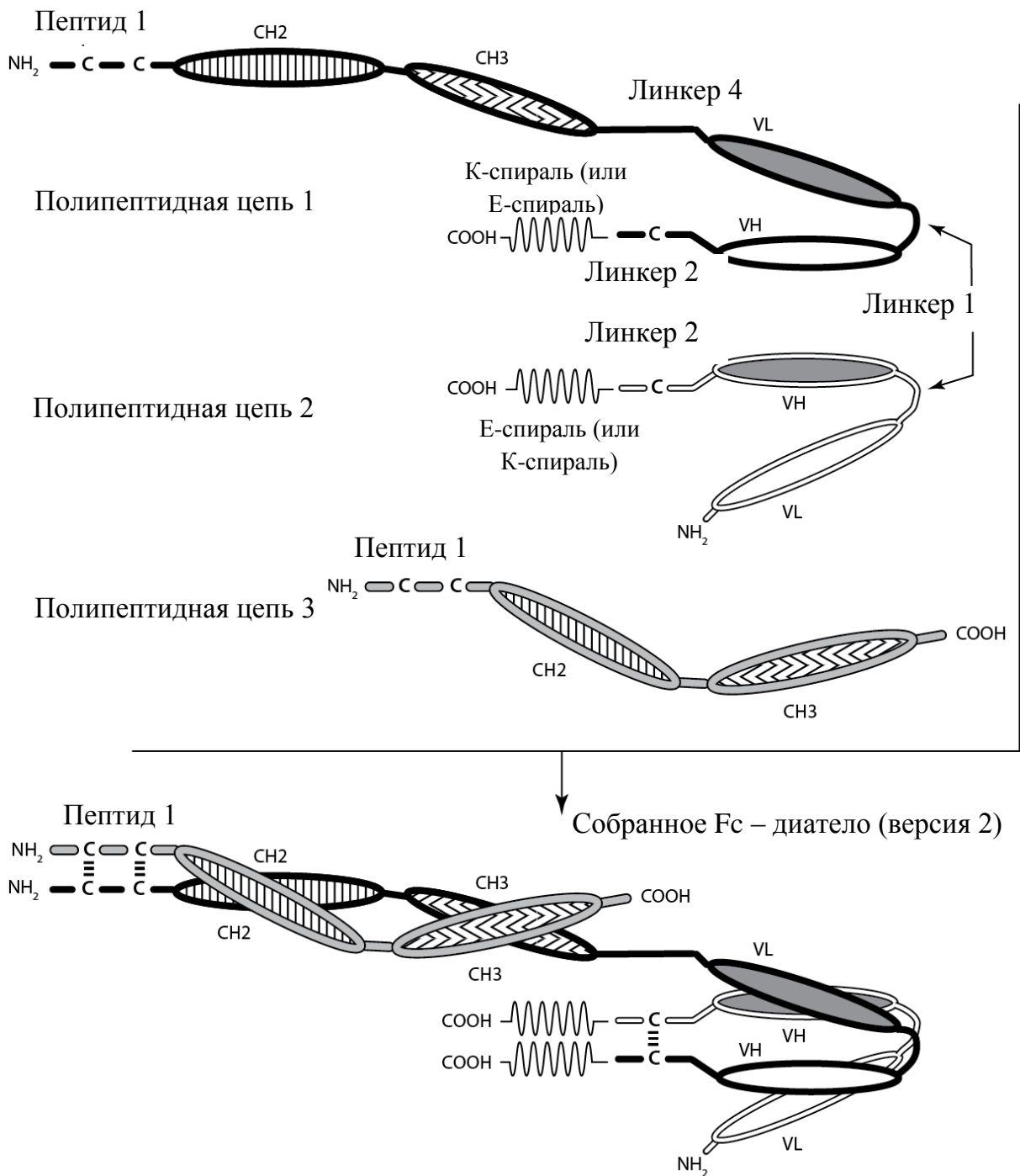
- (2) CDR1 (**SEQ ID NO:18**), CDR2 (**SEQ ID NO:19**) и CDR3 (**SEQ ID NO:20**) тяжелой цепи антитела к grA33 человека; или
- (3) как (1), так и (2).



ФИГУРА 1

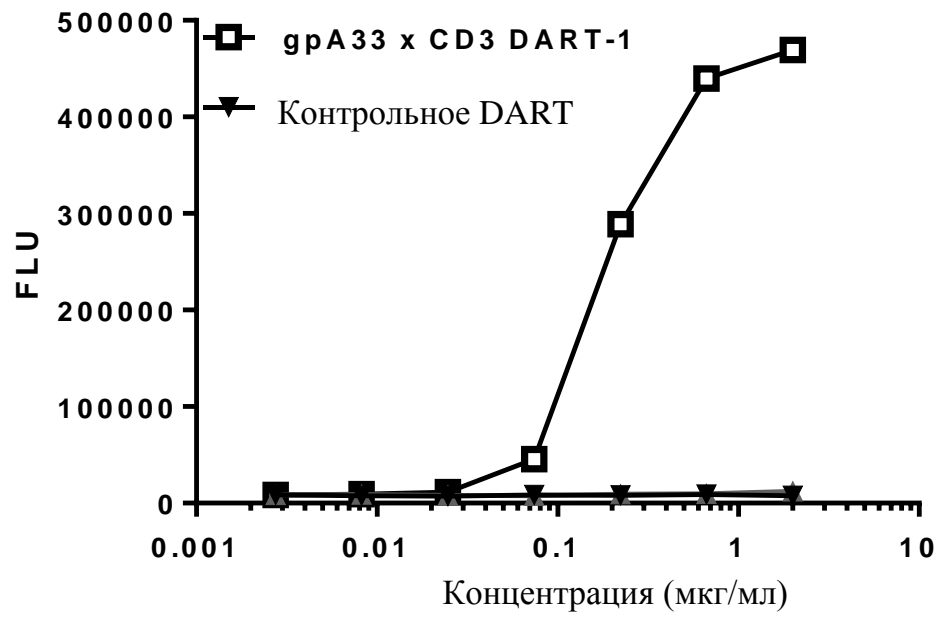


ФИГУРА 2А



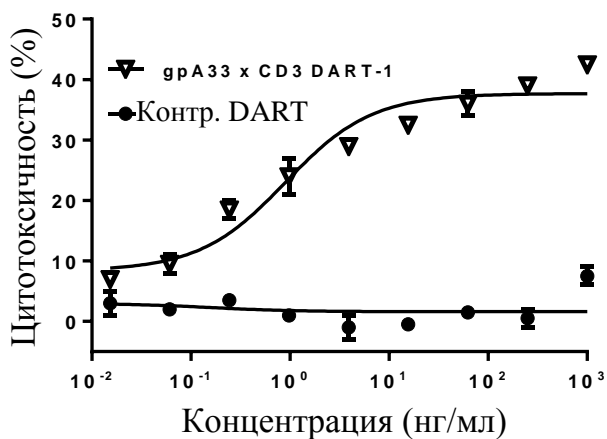
ФИГУРА 2В

Захват shCD3/обнаружение gpA33



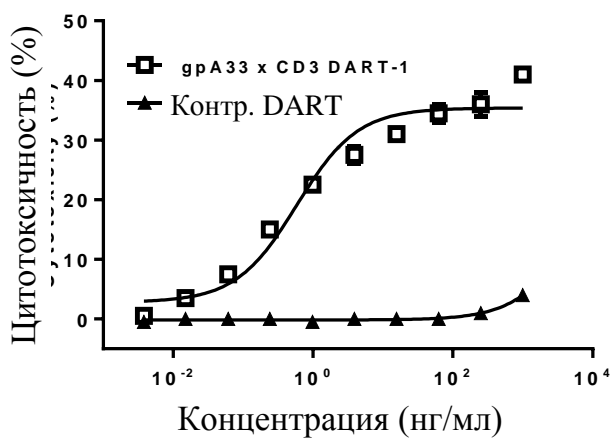
ФИГУРА 3

Клетки CSLC толстой кишки
PBMC человека – E:E=25:1



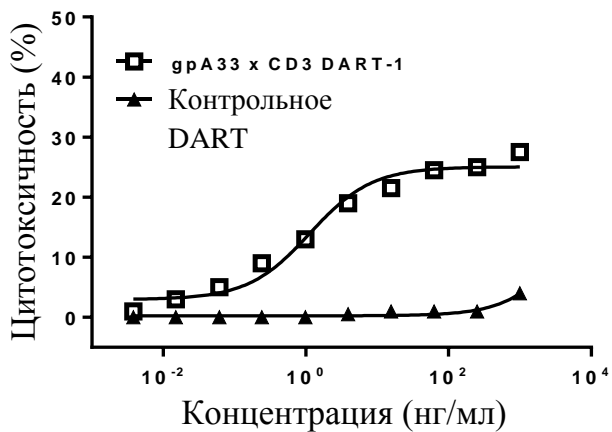
ФИГУРА 4А

Клетки колоректального рака Colo205
Активированные Т-клетки – E:E=10:1

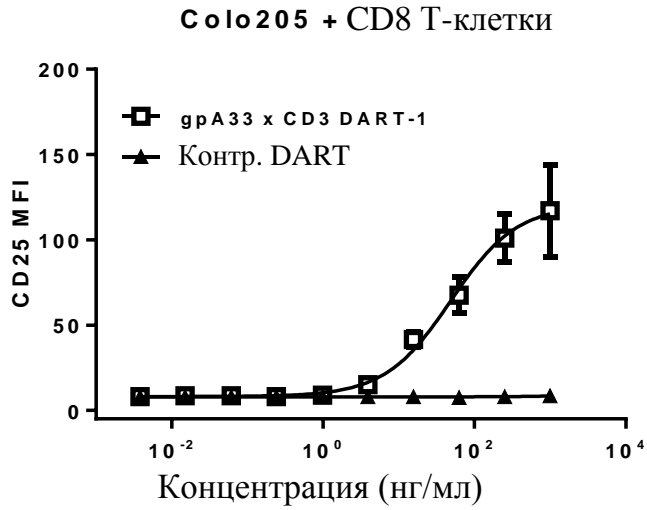


ФИГУРА 4В

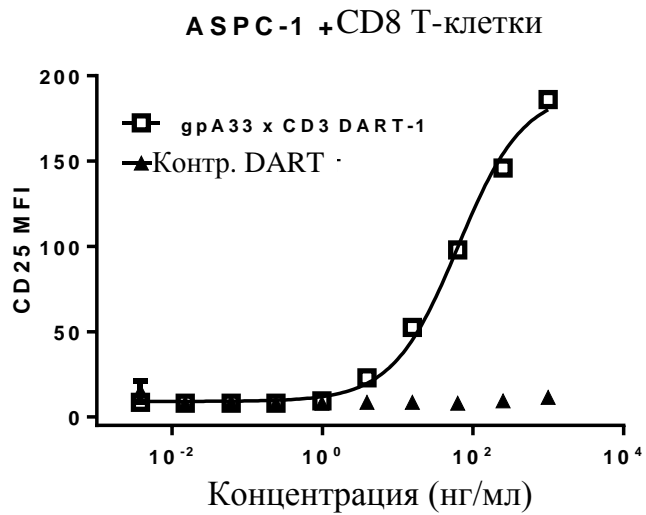
Клетки рака поджелудочной железы ASPC
Активированные Т-клетки – E:E=10:1



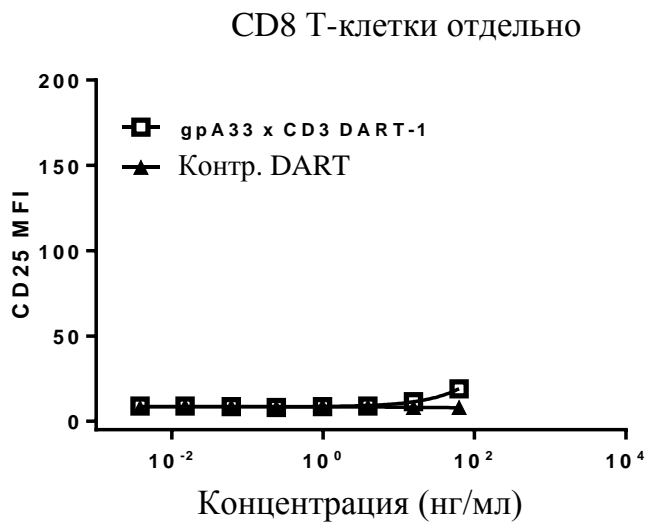
ФИГУРА 4С



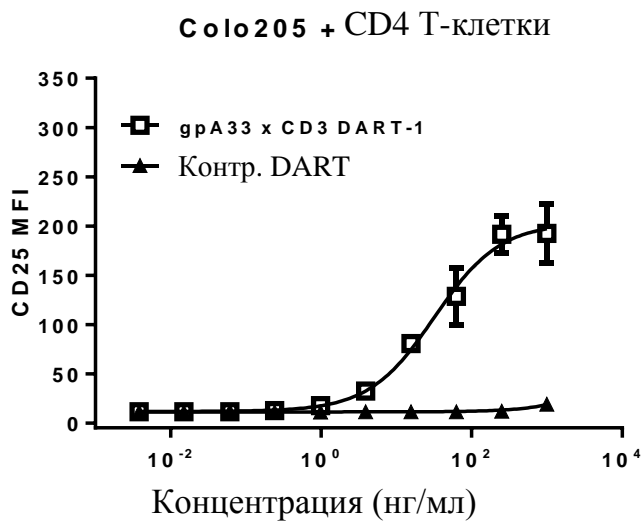
ФИГУРА 5А



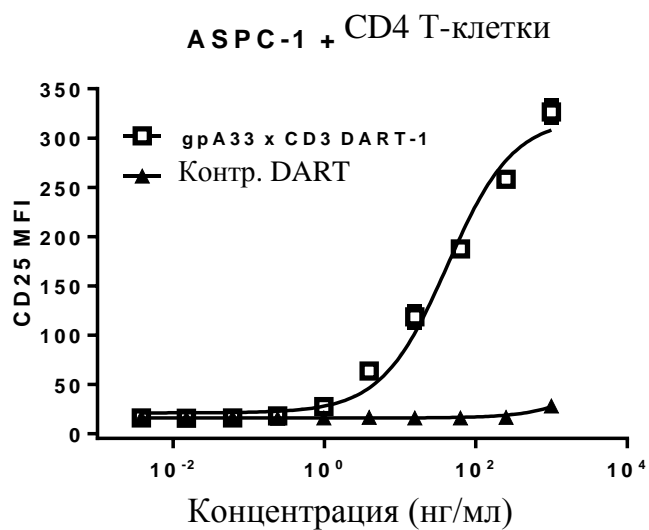
ФИГУРА 5В



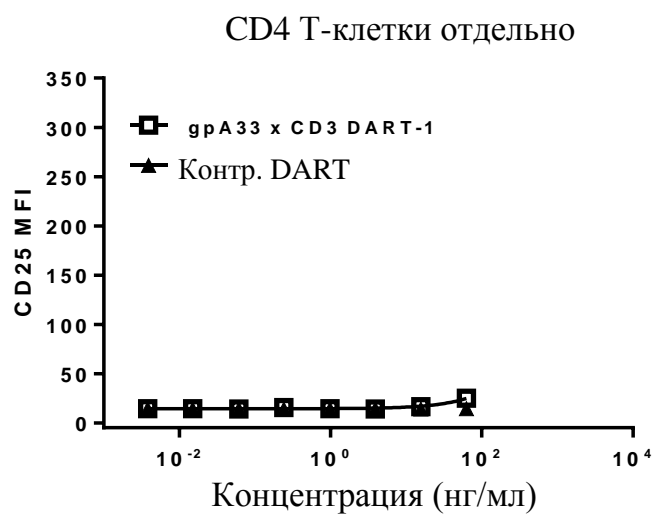
ФИГУРА 5С



ФИГУРА 5D

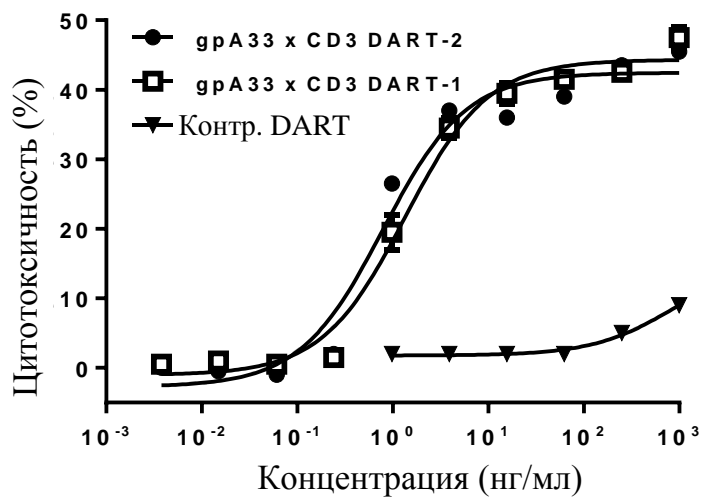


ФИГУРА 5E



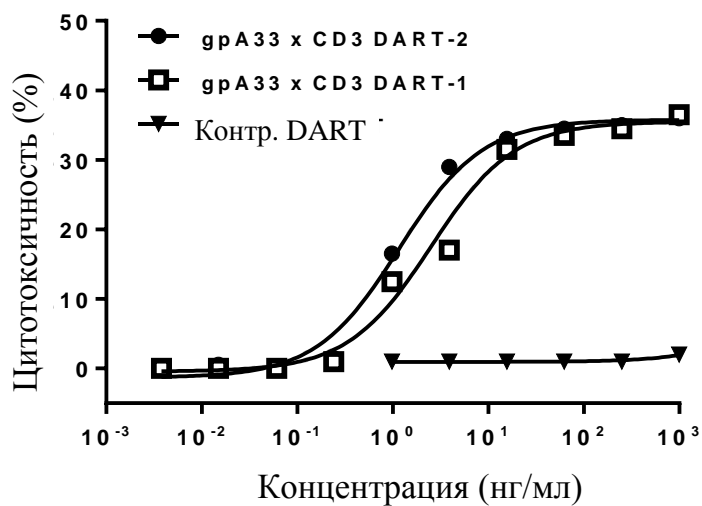
ФИГУРА 5F

SW 948 + дремлющие Т-клетки
(LDH) E:T=10:1



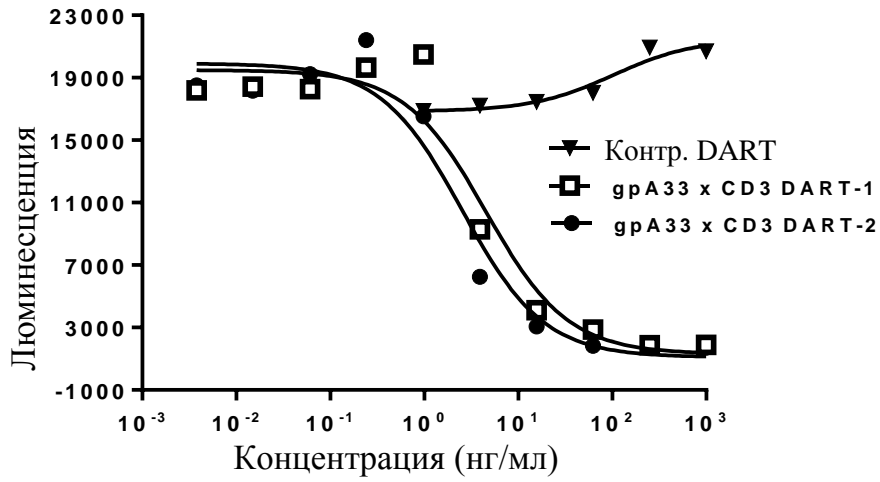
ФИГУРА 6А

Colo205 + дремлющие Т-клетки
(LDH) E:T=10:1



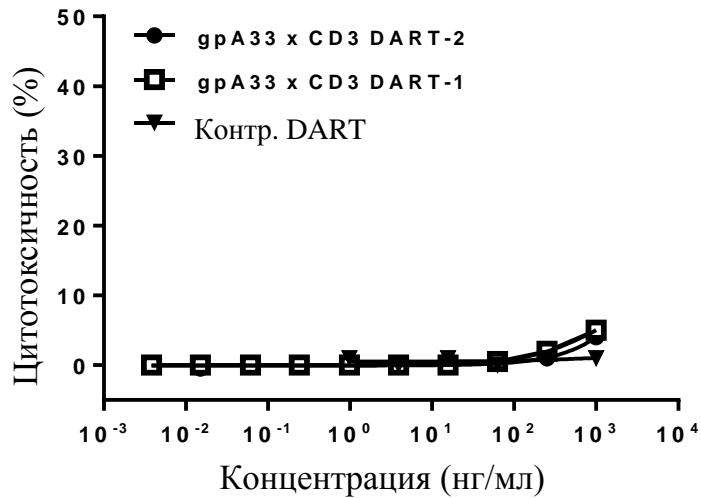
ФИГУРА 6В

Colo205-Luc + дремлющие Т-клетки
(LUM) E:T=10:1



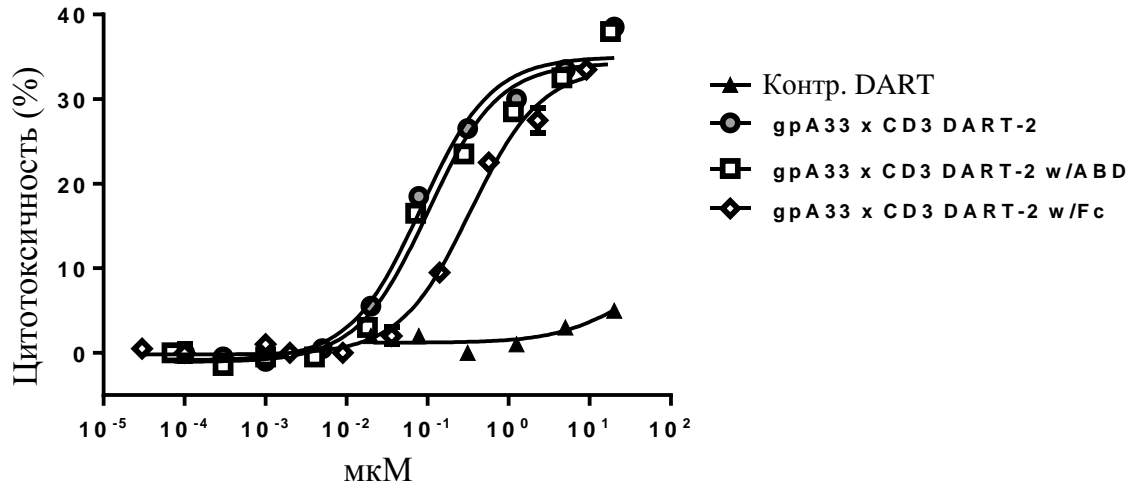
ФИГУРА 6С

НСТ116 (A33-ve) + дремлющие Т-клетки
(LDH) E:T=10:1



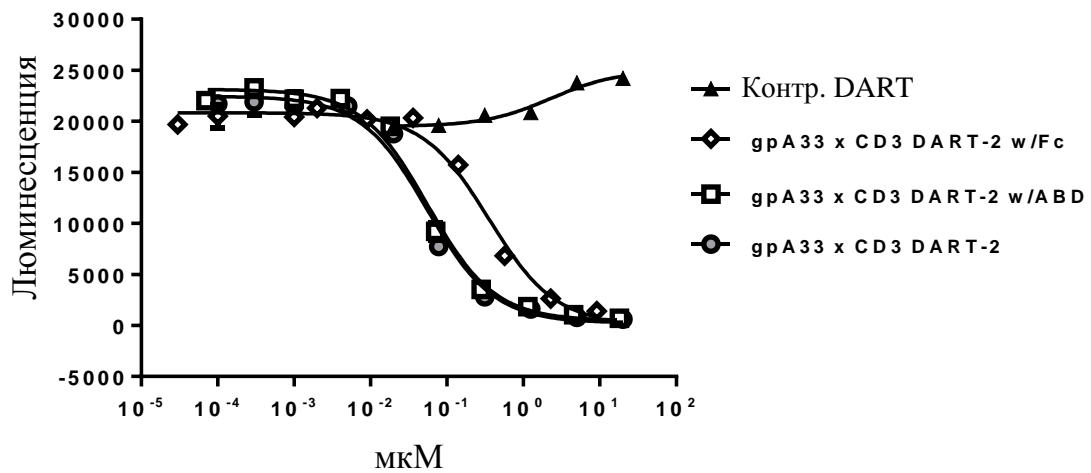
ФИГУРА 6D

Colo205-Luc + PBMC человека
(LDH) E:T=30:1 24 ч



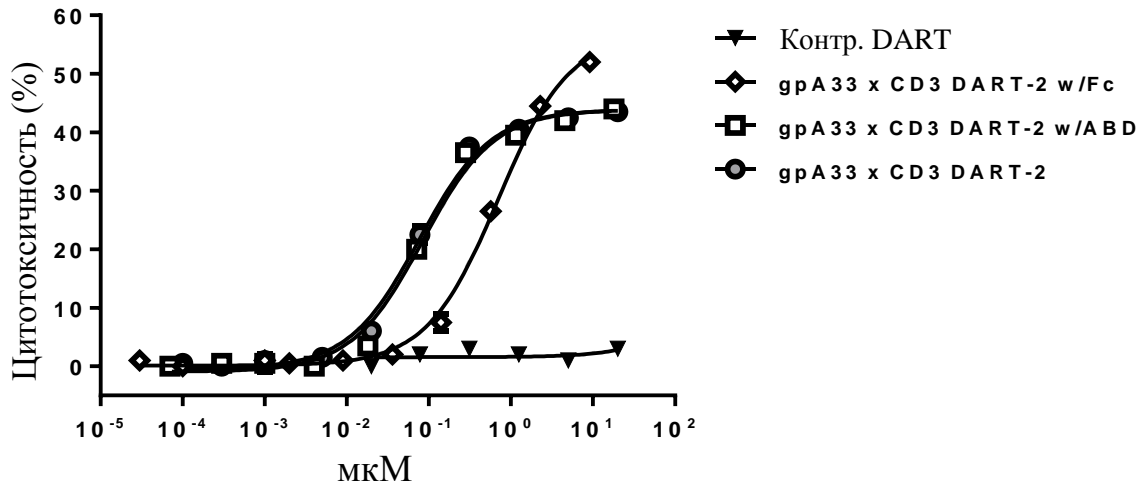
ФИГУРА 7А

Colo205-Luc + PBMC человека
(LUM) E:T=30:1 24 ч



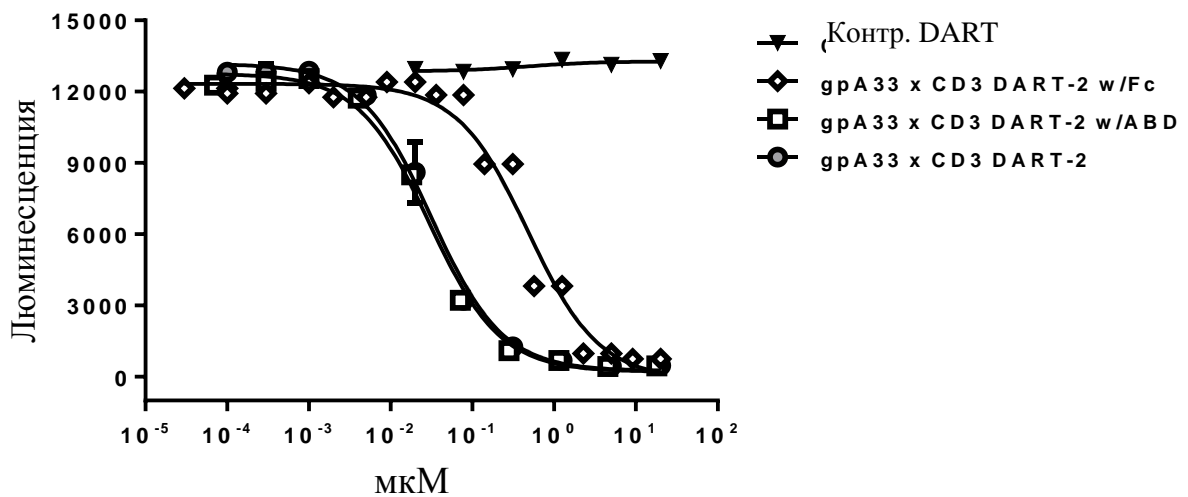
ФИГУРА 7В

Colo205-Luc + РВМС яванского макака
(LDH) E:T=30:1 24 ч

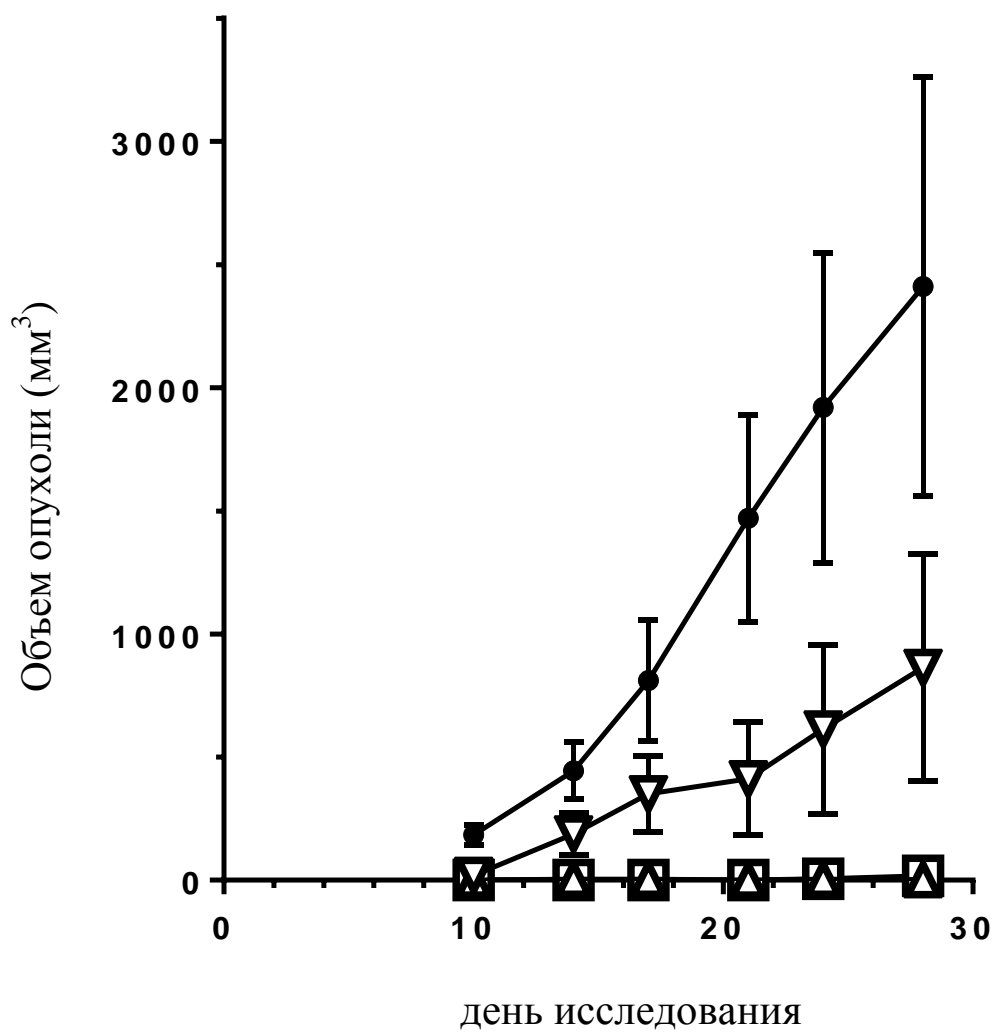


ФИГУРА 7С

Colo205-Luc + РВМС яванского макака
(LUM) E:T=30:1 24 ч



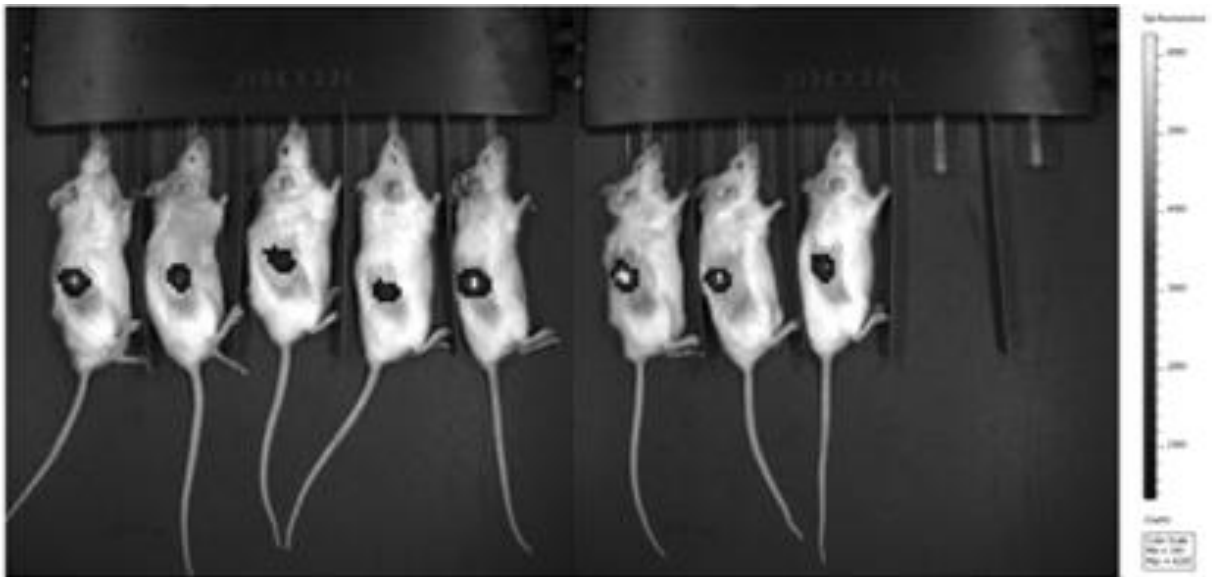
ФИГУРА 7D



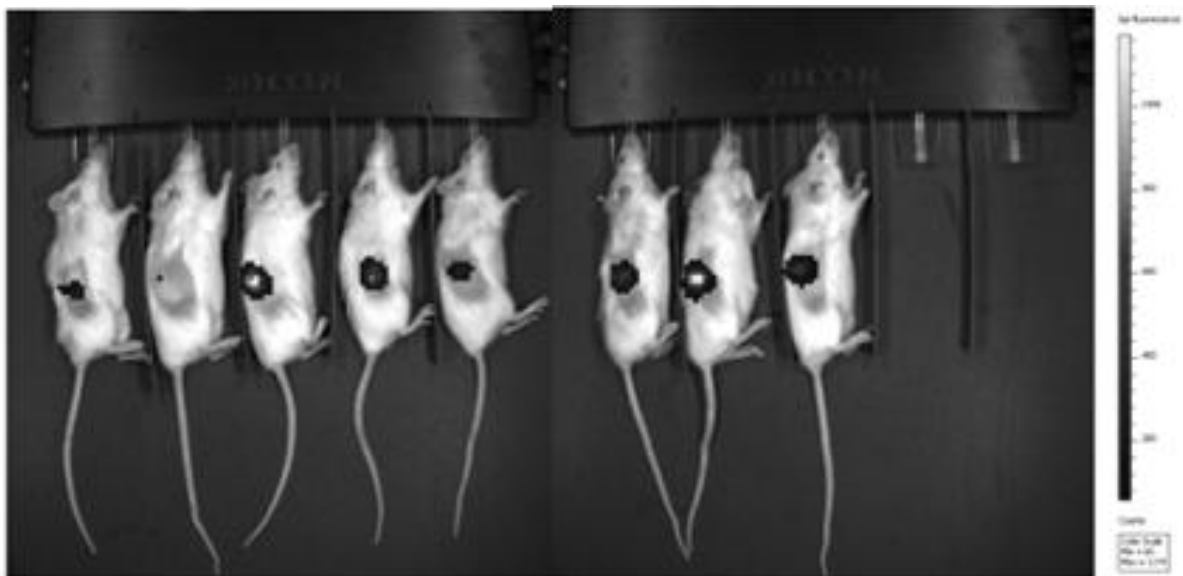
- инертный носитель
- ▽ грA33xCD3 DART-1 (0,02 мг/кг)
- △ грA33xCD3 DART-1 (0,1 мг/кг)
- грA33xCD3 DART-1 (0,5 мг/кг)

ФИГУРА 8

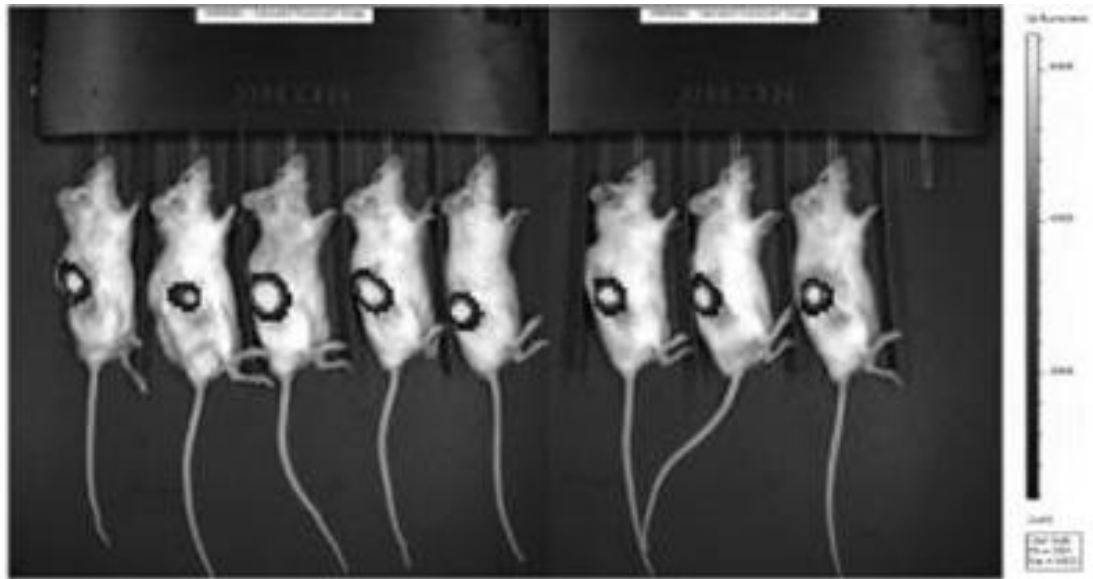
ФИГУРА 9А День 2 Визуальные данные (инертный носитель):



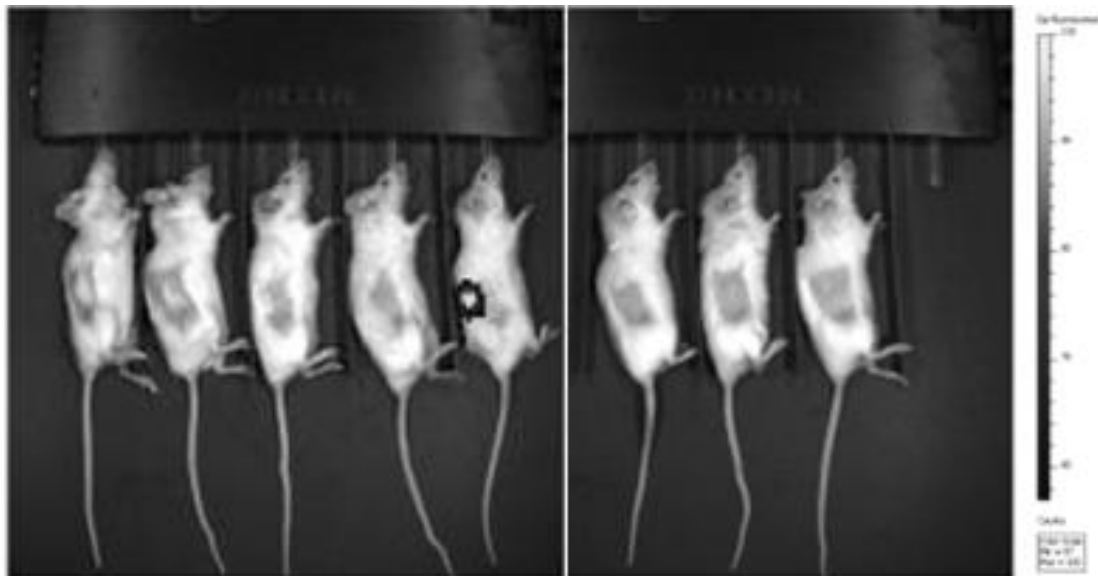
ФИГУРА 9В День 2 Визуальные данные (gpA33 x CD3 DART-1 (0,5 мг/кг)):

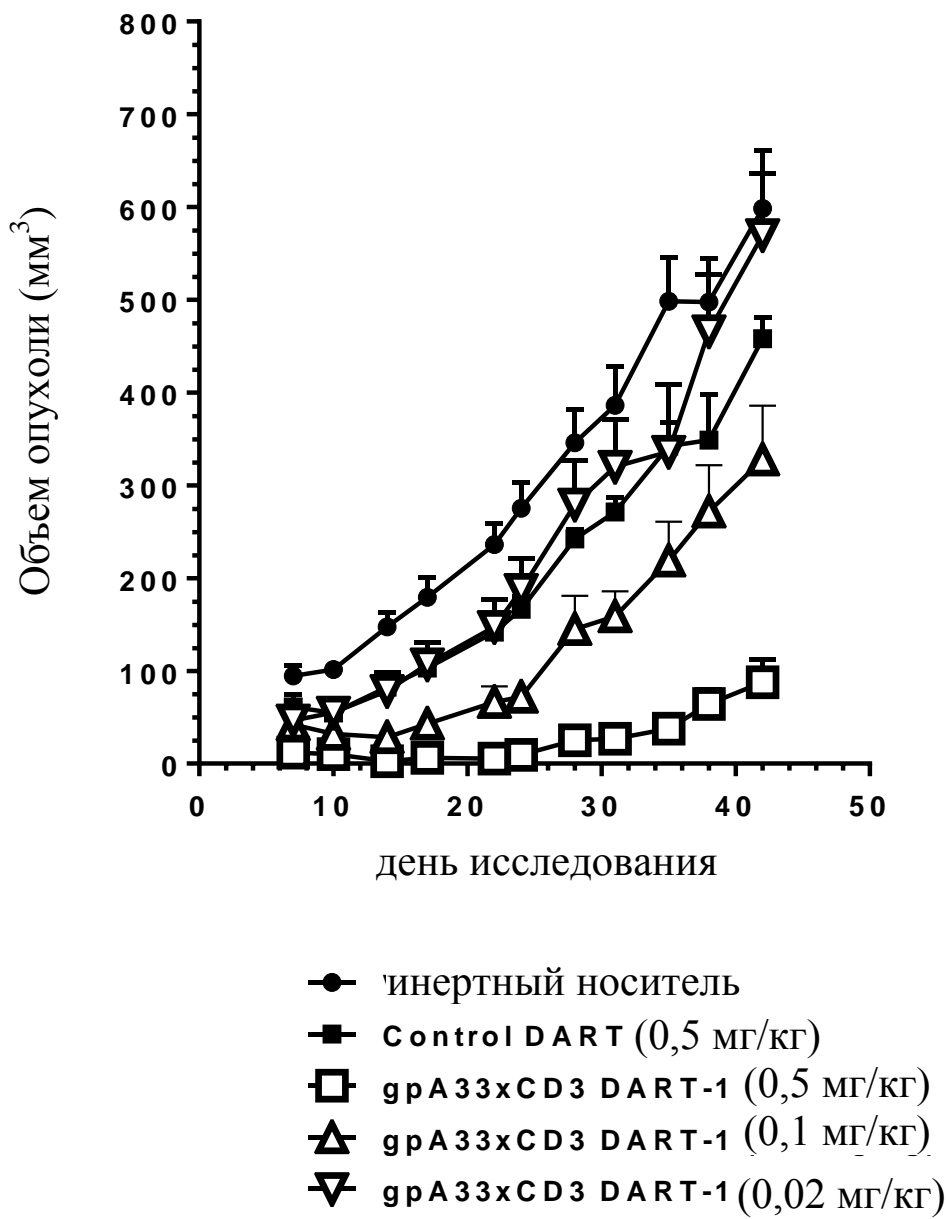


ФИГУРА 9С: День 12 Визуальные данные (инертный носитель):

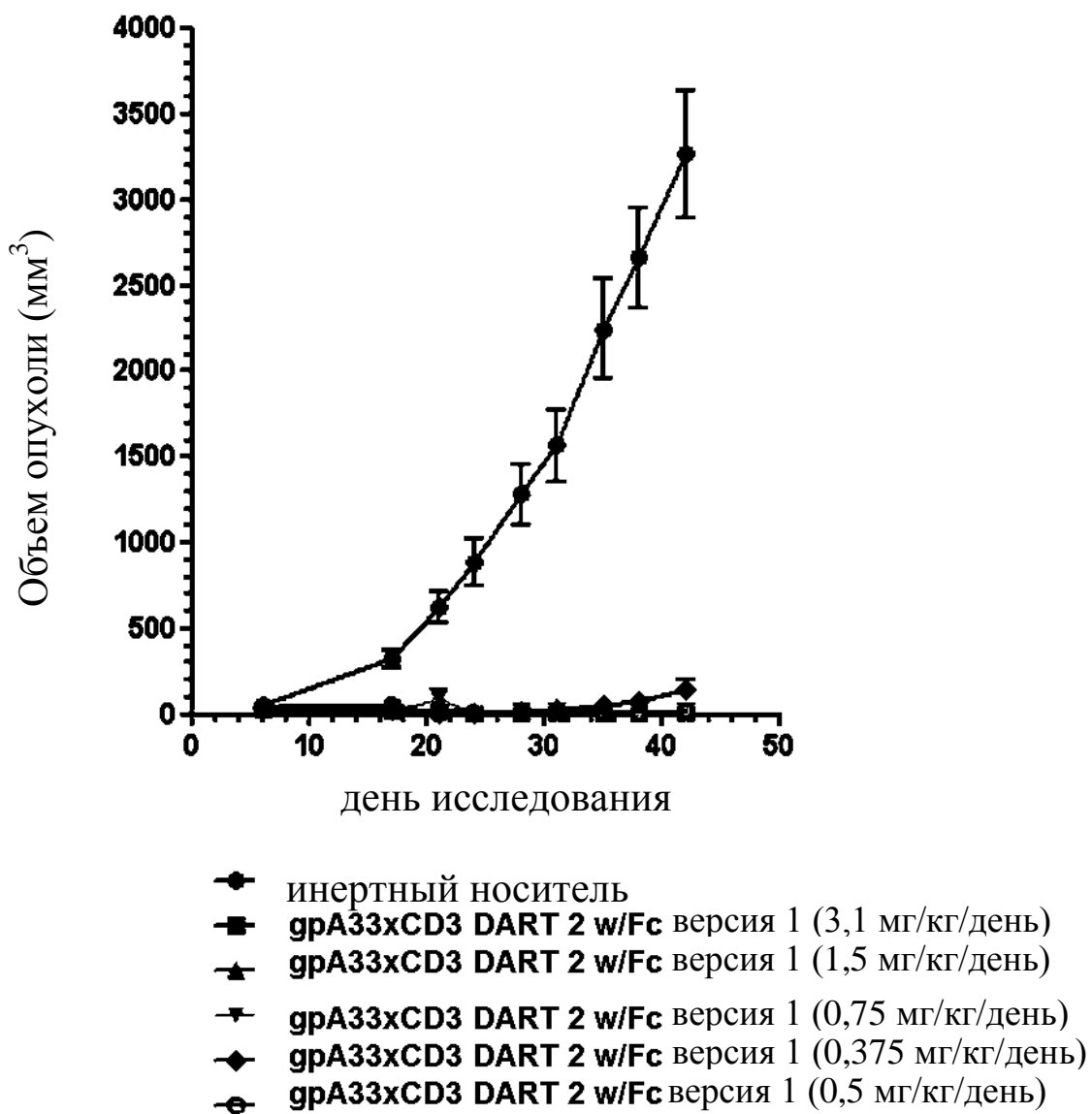


ФИГУРА 9D День 12 Визуальные данные (gpA33 x CD3 DART-1 (0,5 мг/кг)):

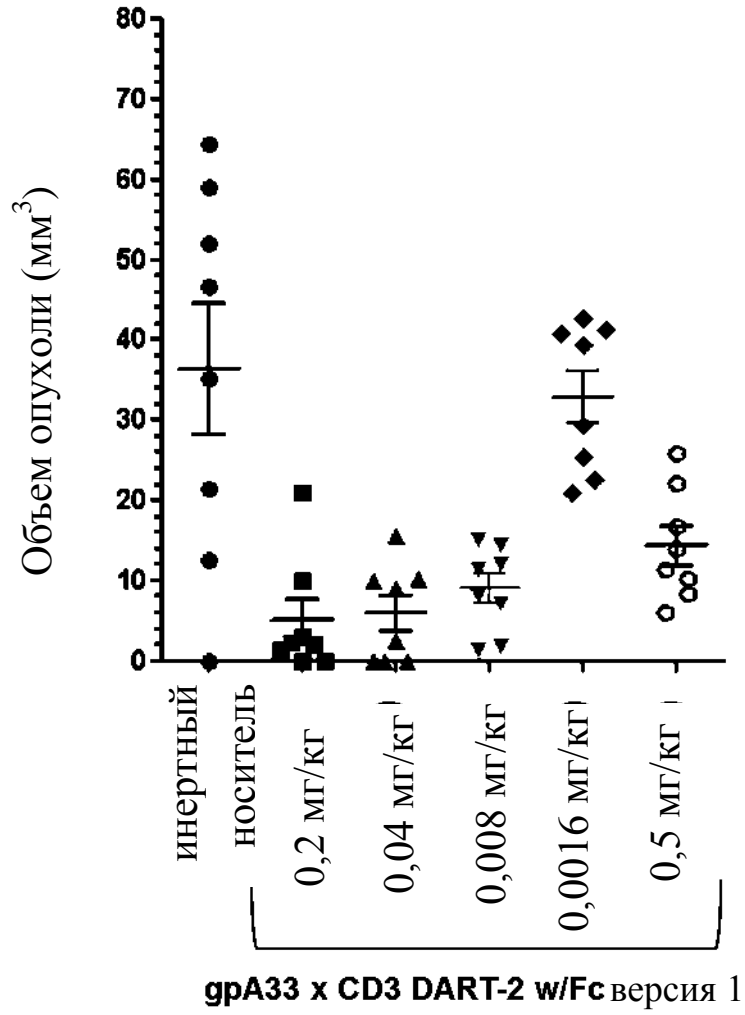




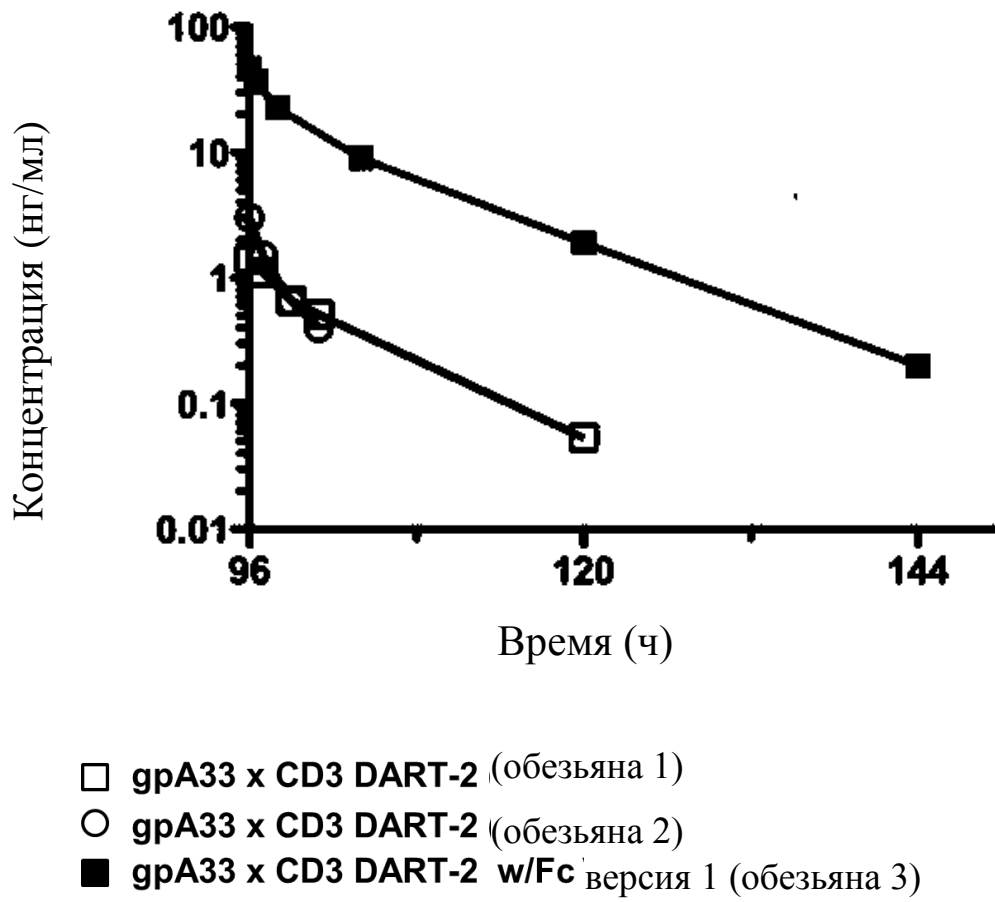
ФИГУРА 10



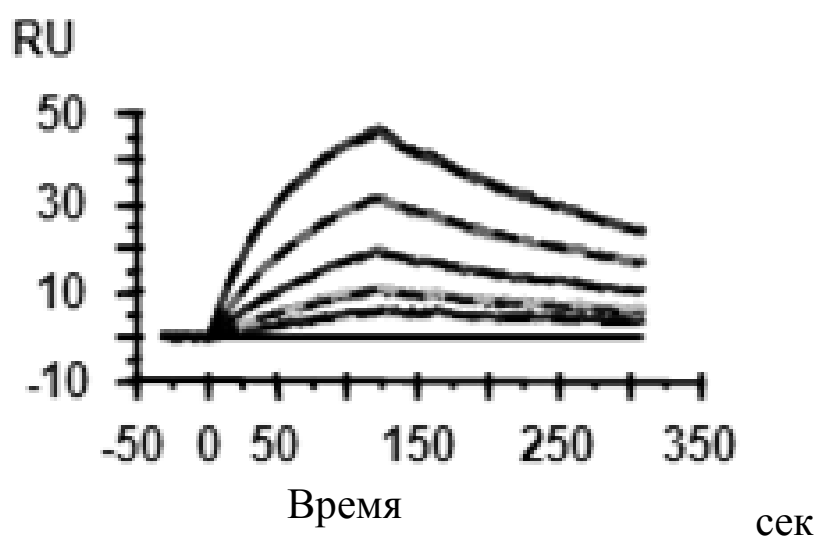
ФИГУРА 11



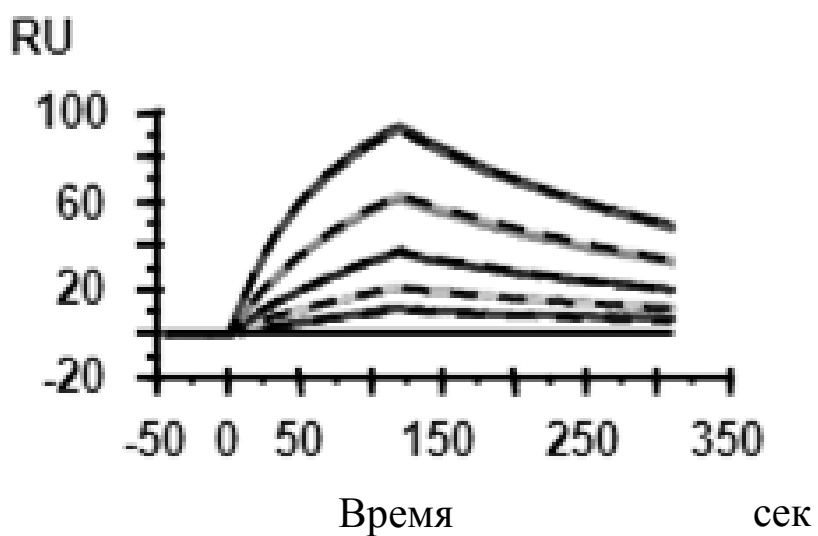
ФИГУРА 12



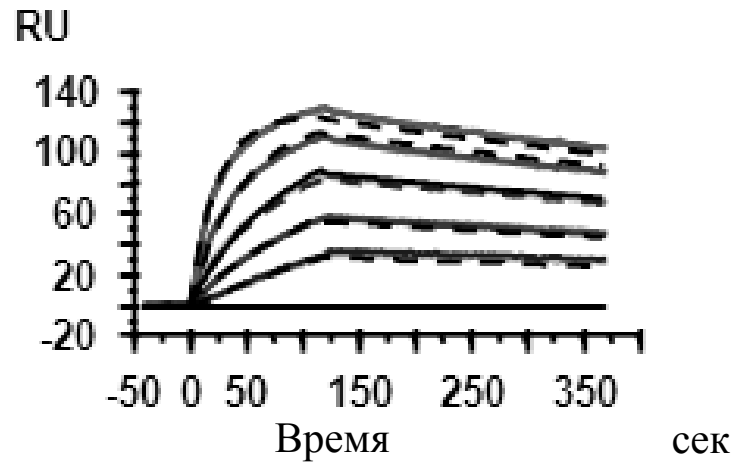
ФИГУРА 13



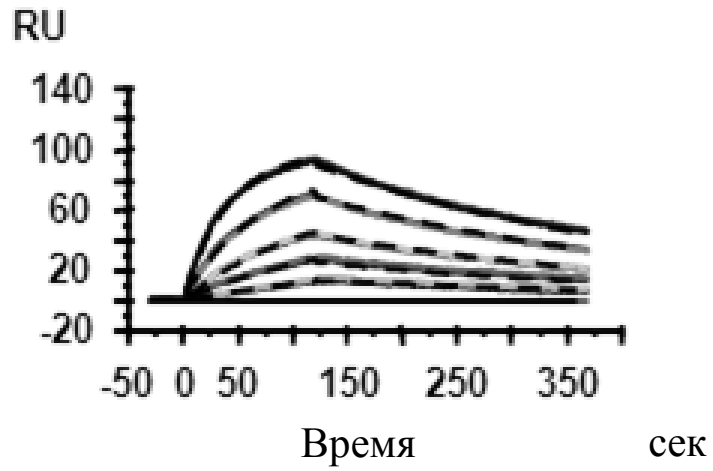
**Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с CD3 человека
ФИГУРА 14А**



**Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с CD3 яванского макака
ФИГУРА 14В**



**Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с грA33 человека
ФИГУРА 15А**



**Связывание версии 1 DART-2 w/Fc с грA33 яванского макака
ФИГУРА 15В**