

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046038**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.02.01**

**(21)** Номер заявки  
**201992546**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.04.24**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

---

**(54) СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛ К CD33**

---

**(31)** 62/489,269

**(32)** 2017.04.24

**(33)** US

**(43)** 2020.03.06

**(86)** PCT/US2018/029191

**(87)** WO 2018/200562 2018.11.01

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**МЕМОРИАЛ СЛОАН КЕТТЕРИНГ  
КЭНСЕР СЕНТЕР (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Хосейни Сайед Шахабуддин, Чеунг  
Най-Конг В. (US)**

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

**(56)** ARNDT, C et al. Costimulation improves the killing capability of T cells redirected to tumor cells expressing low levels of CD33: description of a novel modular targeting system. Leukemia. January 2014, Epub 20 August 2013, Vol. 28, No. 1; pages 59-69; abstract; Figure 6; DOI: 10.1038/leu.2013.243

WO-A1-2016014942

WO-A1-2017055318

WO-A1-2013123061

WO-A2-2015150526

US-A1-20150337048

WO-A1-2016123143

US-A1-20090162931

WO-A2-2016150899

US-A1-20160347838

US-A1-20130164295

US-A1-20130216528

US-A1-20080213256

---

**(57)** Изобретение относится к средствам на основе антител к CD33, в том числе средствам на основе антител к CD33 в формате IgG-scFv. Изобретение также относится к различным способам и реагентам, связанным с ними, в том числе, например, для выявления, профилактики и/или терапевтического лечения заболеваний, связанных с CD33, в частности, форм лейкоза, таких как AML.

---

**B1**

**046038**

**046038**

**B1**

### Введение

Терапевтические средства на основе антител представляют значительную перспективу, в частности, в лечении рака. Разрабатываются разнообразные форматы антител, в том числе моноклональные, мышинные, химерные, гуманизированные, человеческие, полноразмерные, Fab, пегилированные, меченные радиоактивным изотопом, конъюгированные с лекарственным средством, полиспецифические и т.д. По состоянию на 2012 г. по меньшей мере 34 терапевтических средства на основе антител получили разрешение на продажу в Соединенных Штатах Америки или Европе (см. Reichert, mAbs 4:3, 413, May/June 2012, включенный в данный документ посредством ссылки). Однако разработка конкретных эффективных средств на основе антител остается затруднительной.

### Краткое описание

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к особым полиспецифическим средствам на основе антител (например, биспецифическим средствам на основе антител), которые связываются с эпитопом белка CD33 человека. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител) содержат связывающие компоненты гуманизированного антитела к CD33, такого как гуманизированное M195 (называемое в данном документе huM195). Настоящее изобретение основано на открытии того, что конкретные полиспецифические средства на основе антител, содержащие связывающий компонент, который связывается с CD33, характеризуются улучшенными функциональными характеристиками, как описано в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению содержат первый связывающий компонент на основе huM195 (т.е. связывающий компонент антитела к CD33) и второй связывающий компонент. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий компонент связывается со средством на иммунных клетках. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий компонент связывается со средством на Т-клетках (например, CD3). В некоторых вариантах осуществления второй связывающий компонент взаимодействует с органическим или неорганическим соединением. Настоящее изобретение основано на открытии того, что такие полиспецифические средства на основе антител, которые могут связываться с CD33 и вторым средством, являются применимыми для лечения и диагностики заболеваний, ассоциированных с CD33, таких как, например, формы рака, характеризующиеся экспрессией CD33.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит две идентичные тяжелые цепи иммуноглобулина и два идентичных слитых полипептида. В некоторых вариантах осуществления каждый слитый полипептид содержит домен легкой цепи иммуноглобулина и связывающий домен, такой как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) (см., например, фиг. 1A). В некоторых вариантах осуществления каждый слитый полипептид содержит scFv, слитый с легкой цепью, scFv-CL1 или VHH-CL1 или любой связывающий домен, присоединенный к легкой цепи (или его часть). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) содержат тяжелые цепи, каждая из которых содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи, определенную под SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи, определенную под SEQ ID NO: 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит тяжелую цепь и слитый полипептид, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70% (например, на по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 1 или 2, и где часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70% (например, на по меньшей мере приблизительно 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полиспецифическим средствам на основе антител (например, биспецифическим средствам на основе антител, таким как CD33-BsAb), которые содержат тяжелые цепи, каждая из которых содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое средство на основе антитела по изобретению, например, CD33-BsAb, содержит тяжелую цепь и слитый полипептид, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 9, и где часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит слитый полипептид, содержащий scFv, который связывается со второй мишенью, слитый с С-концом легкой цепи иммуноглобулина (или его антигенсвязывающей части), например, легкой цепи антитела к CD33. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид дополнительно содержит линкер.

В некоторых конкретных вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) или их последовательности могут содержать вариабельный домен антитела к CD33 и по меньшей мере один другой связывающий домен, такой как, например, связывающий домен антитела ОКТ3 для переориентации Т-клеток на цитотоксичность в отношении опухоли, или домен, связывающийся с комплексом бензил-ДОТА/металл, например, С825, для многостадийного предварительного нацеливания, или связывающий домен антитела к CD137 клона 35 для ADCC с scFv, связывающимся с 4-1BB, в качестве агониста, или CD137L, 4-1BBL для ADC с 4-1BBL в качестве агониста. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела представляет собой биспецифическое средство на основе антитела, которое содержит scFv, который связывается с Т-клеточным антигеном. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный антиген представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое средство на основе антитела содержит scFv гуманизированного ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит scFv, содержащий последовательность, определенную под любым из SEQ ID NO: 11-17 и 27.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) содержат тяжелые цепи, каждая из которых содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления указанные полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) дополнительно содержат слитые полипептиды, каждый из которых содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как средство CD33-BsAb) содержит scFv, который специфично связывается с комплексом бензил-ДОТА/металл. В некоторых вариантах осуществления scFv, который специфично связывается с комплексом бензил-ДОТА/металл, представляет собой scFv С825. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит scFv, содержащий последовательность, определенную под SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит последовательность легкой цепи иммуноглобулинового антитела к CD33, слитую с scFv, связывающимся с комплексом бензил-ДОТА/металл. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид на основе антитела к CD33 и антитела к бензил-ДОТА дополнительно содержит линкер. В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид на основе антитела к CD33 и антитела к бензил-ДОТА содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) содержат вариант Fc-области, где указанный вариант Fc-области содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно Fc-области дикого типа. В некоторых вариантах осуществления модификации Fc-области могут включать без ограничения модификации, которые изменяют эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления варианты Fc-области содержат одну или более сконструированных гликоформ, т.е. углеводных структур, ковалентно присоединенных к молекуле, содержащей Fc-область, где указанная углеводная структура химически отличается от таковой у исходной молекулы, содержащей Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит Fc-область с мутацией N297A в домене CH2 согласно нумерации в соответствии с Kabat. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь, содержащая мутацию N297A, характеризуется отсутствием гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь, содержащая мутацию N297A, характеризуется отсутствием связывания FcR или C1q. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область с одной или более мутациями, выбранными из K322A и D265A. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A и мутацию K322A. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A и мутацию D265A. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A, мутацию D265A и мутацию K322A. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит последовательность, определенную под любым из SEQ ID NO: 20-22.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) характеризуется бивалентным связыванием с антигеном (например, CD33). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как средст-

во CD33-BsAb) является тетравалентным, например, характеризуясь бивалентным связыванием с двумя разными антигенами.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) связывается с линией клеток AML (например, HL60) при  $EC_{50}$  в диапазоне от 0,1 пМ до 1 мкМ. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) характеризуется молекулярной массой, превышающей типичный порог выведения почками (например, молекулярной массой более чем приблизительно 70 кДа).

Изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, кодирующим любые или все полипептидные последовательности, включенные в полиспецифическое средство на основе антитела, описанное в настоящем изобретении, необязательно вместе с одним или более регуляторными элементами и/или последовательностями вектора (например, сигналами интеграции и/или репликации). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь гуманизованного антитела к CD33, причем указанная нуклеиновая кислота определена под SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый полипептид, причем указанная нуклеиновая кислота определена под SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления изобретение также относится к рекомбинантным векторам, которые содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие биспецифические антитела согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к выделенным нуклеотидным последовательностям и/или векторам.

Изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которые содержат нуклеиновую кислоту, описанную в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой эукариотическую клетку; в некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой прокариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может представлять собой клетку бактерии, дрожжей, насекомого или млекопитающего. Конкретные иллюстративные прокариотические клетки-хозяева включают клетки *E. coli*; конкретные иллюстративные эукариотические клетки включают, например, клетки COS, клетки CHO (например, клетки DG44, CHO-S, CHO-K1 и т.д.) и клетки HEK293 (например, Expi293F, HEK293T и т.д.).

Изобретение также относится к технологиям для получения полиспецифических средств на основе антител, описанных в настоящем изобретении (например, средства CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления получение полиспецифического средства на основе антитела может включать, например, стадию культивирования клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии полиспецифического связывающего средства (например, средства CD33-BsAb). В качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления технологии по изобретению включают отделение полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) от культуральной среды с клеткой-хозяином, которая продуцировала его.

Настоящее изобретение также относится к композициям, содержащим полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) могут быть использованы и/или используются в получении фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение также относится к способам получения фармацевтических композиций; в некоторых вариантах осуществления такие способы могут включать стадии объединения полиспецифического средства на основе антитела (например, биспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb) с фармацевтически приемлемым носителем и/или составления такой комбинации для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция составлена для парентеральной доставки. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака (например, AML).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, включающим стадию введения пациенту композиции, которая содержит полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) и/или обеспечивает его доставку. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) является терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) является диагностическим средством.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, включающим стадию

введения пациенту композиции, которая содержит полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) и/или обеспечивает его доставку пациенту, которому вводили или будут вводить IL2, таким образом, чтобы пациент получал оба из них. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, включающим стадию введения пациенту композиции, которая содержит IL2 и/или обеспечивает его доставку пациенту, которому вводили или будут вводить полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb), таким образом, чтобы пациент получал оба из них.

Настоящее изобретение относится к Т-клеткам, которые "вооружены" и/или активированы полиспецифическим средством на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическим средством на основе антитела, таким как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к популяции указанных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к композиции, содержащей Т-клетку или популяцию Т-клеток, которые "вооружены" и/или активированы полиспецифическим средством на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическим средством на основе антитела, таким как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка или популяция Т-клеток "вооружены" полиспецифическим средством на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическим средством на основе антитела, таким как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления Т-клетка или популяция Т-клеток активированы полиспецифическим средством на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическим средством на основе антитела, таким как CD33-BsAb).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к конструкциям химерных антигенных рецепторов (CAR), содержащим связывающий домен, который содержит полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR первого поколения, второго поколения или третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит связывающий домен, который содержит биспецифическое средство на основе антитела к CD33 согласно настоящему изобретению, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета. Также настоящее изобретение относится к Т-клеткам, которые экспрессируют CAR согласно настоящему изобретению, т.е. CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к популяции CAR-Т-клеток, которые экспрессируют CAR, содержащий связывающий домен, который содержит полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к естественным клеткам-киллерам (NK), которые экспрессируют CAR согласно настоящему изобретению, т.е. CAR-NK-клетка. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к популяции CAR-NK-клеток, которые экспрессируют CAR, содержащий связывающий домен, который содержит полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к композициям и способам, которые можно использовать для лечения или уменьшения интенсивности проявлений заболевания, ассоциированного с экспрессией CD33, у пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к композициям и способам, которые можно использовать для диагностики заболевания, ассоциированного с экспрессией CD33. В некоторых вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с экспрессией CD33, представляет собой злокачественное заболевание (например, рак). В некоторых частных вариантах осуществления заболевание, ассоциированное с экспрессией CD33, представляет собой лейкоз. Лейкоз может включать без ограничения по меньшей мере одно заболевание из числа острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL) (включая В-клеточный ALL и Т-клеточный ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелоцитарного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), волосатоклеточного лейкоза. В некоторых частных вариантах осуществления композиции и способы по изобретению можно использовать для лечения и/или диагностики острого лимфобластного лейкоза (ALL). В некоторых частных вариантах осуществления композиции и способы по изобретению можно использовать для лечения и/или диагностики экстрамедуллярных (EM) проявлений лейкоза.

Также, среди прочего, изобретение относится к технологиям для лечения, профилактики и/или диагностики медицинского состояния у пациента, причем медицинское состояние характеризуется экспрессией CD33. В некоторых вариантах осуществления технология для лечения, профилактики или диагностики медицинского состояния, характеризующегося экспрессией CD33, включает введение терапевтически эффективного количества полиспецифического средства на основе антитела (например, биспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления технология для лечения, профилактики или диагностики медицинского состояния, характеризующегося экспрессией CD33, включает введение композиции, которая обеспечивает доставку терапевтиче-

ски эффективного количества полиспецифического средства на основе антитела (например, биспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb).

Также, среди прочего, изобретение относится к технологиям для лечения, профилактики или диагностики рака у пациента, включающим введение полиспецифического средства на основе антитела (например, биспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из острого миелоидного лейкоза, бифенотипического лейкоза, миелодиспластических синдромов, хронического миеломоноцитарного лейкоза, миелоидного бластного криза при хроническом миелоидном лейкозе и форм острого лимфобластного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления технология для лечения, профилактики или диагностики рака дополнительно включает введение препарата Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки препарата являются активированными. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки препарата "вооружены" полиспецифическим средством на основе антитела (например, биспецифическим средством на основе антитела, таким как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению.

Также, среди прочего, изобретение относится к технологиям для получения характеристик полиспецифических средств на основе антител (например, биспецифических средств на основе антител, таких как CD33-BsAb) и/или композиций, содержащих указанные полиспецифические средства на основе антител. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) и/или композиции, содержащие указанные полиспецифические средства на основе антител, характеризуются связыванием с клетками AML (например, HL60). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) и/или композиции, содержащие указанные полиспецифические средства на основе антител, характеризуются удержанием *in vivo* (например, периодом полувыведения из сыворотки крови *in vivo*, составляющим по меньшей мере 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 ч или больше). В некоторых вариантах осуществления характеристики полиспецифических средств на основе антител (например, биспецифических средств на основе антител, таких как CD33-BsAb) и/или композиций, содержащих указанные полиспецифические средства на основе антител, получают с помощью ELISA, иммуногистохимического анализа, анализов связывания на Biacore, масс-спектрометрии, хроматографии с изoeлектрическим фокусированием (IEF), вестерн-блоттинга и т.д.

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

Графические материалы, включенные в настоящее описание, которые состоят из следующих фигур, представлены исключительно в целях иллюстрации, но не ограничения.

На фиг. 1А показано схематическое представление формата биспецифического средства на основе антитела IgG-scFv. На фиг. 1В проиллюстрирована очистка иллюстративного биспецифического средства на основе антитела к CD33 и CD3 и показана хроматограмма SE-HPLC для образца IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, при этом по оси x представлено время удерживания в минутах, а по оси y представлено поглощение при 280 нм в миллиединицах оптической плотности.

На фиг. 2 показано графическое представление результатов иммуноокрашивания в рамках FACS в отношении связывания иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, с клетками-мишенями. По оси x представлен log концентрации антитела (мкг антитела/миллион клеток), а по оси y представлена MFI. Связывание наблюдали в отношении клеток из многочисленных CD33(+) линий клеток: U937, MV-4-11, MOLM13, M-07e, но связывание не наблюдали в отношении CD33(-) линий клеток, которые не экспрессируют CD33, таких как клетки MOLT4 и CMLT1.

На фиг. 3 показано графическое представление результатов анализов Т-клеточной цитотоксичности с использованием иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, в различных линиях клеток. Линии клеток AML тестировали в стандартном 4-часовом анализе высвобождения <sup>51</sup>Cr. По оси x представлен log концентрации антитела (мкг антитела/мл), а по оси y представлен % цитотоксичности. Значительное уничтожение наблюдали в отношении многочисленных CD33(+) линий клеток: THP1, M-07e, U937, SET2 и HL60, но CD33(-) клетки MOLT4 не подвергались влиянию.

На фиг. 4 показано графическое представление Т-клеточной цитотоксичности с использованием иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, в отношении линии клеток AML MOLM13. Клетки MOLM13 содержат мутацию по типу внутренней tandemной дупликации (ITD) в гене FMS-подобной тирозинкиназы-3 (FLT3) (FLT3/ITD). По оси x представлен log концентрации антитела (мкг антитела/мл), а по оси y представлен % цитотоксичности. Наблюдали значительное уничтожение, при этом под действием CD33-специфичного BsAb происходил лизис клеток MOLM13 при EC<sub>50</sub>, составляющей 2,4 пМ.

На фиг. 5 показано графическое представление эффективности лечения с помощью иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, *in vivo* в ксенотрансплантатной мышшиной модели AML. Все мыши получали 1 миллион клеток MOLM13, содержащих ген люциферазы светлячка. По оси x представлено время после инъекции MOLM13 (в днях), а по оси y представлен "суммарный поток через единицу площади" для экспрессии гена люциферазы в качестве индикатора нагрузки клетками MOLM13. Треугольники, обращенные вершиной вниз, указывают на временные рамки инъекций CD33-

специфического BsAb, а треугольники, обращенные вершиной вверх, указывают на временные рамки инъекций АТС.

На фиг. 6 показано графическое представление эффективности иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, *in vivo* в ксенотрансплантатной мышшиной модели AML на поздней стадии. После инокуляции клеток MOLM13, содержащих ген люциферазы светлячка, мыши получали лечение с помощью еженедельных внутривенных инъекций 10 миллионов АТС человека в течение 3 недель с последующим дозированием IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, один раз в две недели в течение четырех недель. По оси x представлено время после инъекции MOLM13 (в днях), а по оси y представлен "суммарный поток через единицу площади" для экспрессии гена люциферазы в качестве индикатора нагрузки клетками MOLM13. Треугольники, обращенные вершиной вниз, указывают на временные рамки инъекций IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, а треугольники, обращенные вершиной вверх, указывают на временные рамки инъекций АТС.

На фиг. 7 показано графическое представление эффективности 3 различных доз иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, *in vivo* в ксенотрансплантатной мышшиной модели AML. Все мыши получали 1 миллион клеток MOLM13, содержащих ген люциферазы светлячка. Мыши получали лечение с помощью IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, при 100 мкг, 30 мкг и 10 мкг. По оси x представлено время после инъекции MOLM13 (в днях), а по оси y представлен "суммарный поток через единицу площади" для экспрессии гена люциферазы в качестве индикатора нагрузки клетками MOLM13. Треугольники, обращенные вершиной вниз, указывают на временные рамки инъекций IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, а треугольники, обращенные вершиной вверх, указывают на временные рамки инъекций АТС.

На фиг. 8А и фиг. 8В показана действенность иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, *in vivo* в отношении Т-клеточно-опосредованного устранения сформировавшейся опухоли в ксенотрансплантатной мышшиной модели AML человека. Самкам мышей NSG внутривенно имплантировали 1 миллион клеток AML MOLM13. Рост опухоли отслеживали с помощью биолюминесцентной визуализации и выражали в виде суммарного потока в ф/с. Начиная через 7 дней после имплантации лейкозных клеток, активированные Т-клетки (АТС, 5-10 миллионов/доза) инъекцировали один раз в неделю в течение трех недель. Дозу иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, снижали (от 100 мкг до 0,1 мкг) и вводили за день до и через день после каждого введения Т-клеток. Для обеспечения выживания Т-клеток *in vivo* 1000 МЕ IL2 инъекцировали подкожно 2-3 раза в неделю. Данные двух независимых экспериментов объединяли. На фиг. 8А показан рост опухоли, отслеживаемый с помощью биолюминесцентной визуализации. На фиг. 8В приведено графическое представление результатов анализа биолюминесцентной визуализации (выраженных в виде суммарного потока в ф/с).

На фиг. 9 показана действенность тетравалентного иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), по сравнению с бивалентной гетеродимерной платформой IgG (гетеродимером) в отношении клеток AML человека *in vitro*. TDCC в присутствии тетравалентного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, в сравнении с бивалентным гетеродимером, связывающимся с CD33(+), в отношении линий клеток AML человека оценивали посредством 4-часового анализа высвобождения хрома.

На фиг. 10 показана эффективность тетравалентного иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), *in vivo* по сравнению с бивалентной гетеродимерной платформой IgG (гетеродимером). Самкам мышей NSG внутривенно имплантировали 1 миллион клеток AML MOLM13. Рост опухоли отслеживали с помощью биолюминесцентной визуализации и выражали в виде суммарного потока в ф/с. Активированные Т-клетки (АТС, 5-10 миллионов/доза) инъекцировали один раз в неделю в течение трех недель, начиная через семь дней после имплантации лейкозных клеток, а иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3 (BsAb), или гетеродимерный BsAb (каждый в количестве 0,1 мкг) инъекцировали за день до и через день после каждого введения Т-клеток. Для обеспечения персистенции Т-клеток *in vivo* 1000 МЕ IL2 вводили подкожно два раза в неделю.

На фиг. 11 показана эффективность комбинированного лечения с помощью IL2 и IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), *in vivo* в отношении перенаправления Т-клеток. Самкам мышей NSG внутривенно имплантировали 1 миллион клеток AML MOLM13. Рост опухоли отслеживали с помощью биолюминесцентной визуализации и выражали в виде суммарного потока в ф/с. Начиная через 7 дней после имплантации лейкозных клеток, активированные Т-клетки (АТС, 5-10 миллионов/доза) инъекцировали один раз в неделю в течение трех недель. IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3 (BsAb) (10 мкг), вводили за день до и через день после каждого введения Т-клеток. Одной группе пациентов, получающих АТС/BsAb, вводили IL2 (1000 МЕ подкожно) 2-3 раза в неделю, тогда как группа "без IL2" не получала какой-либо IL2.

На фиг. 12А, фиг. 12В, и фиг. 12С показана эффективность иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), в отношении CD33(+) AML в моделях лимфомы. Фиг. 12А - самкам мышей NSG подкожно имплантировали 3 миллиона клеток AML MOLM13. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) (10-30 миллионов/доза) инъекцировали один раз в неделю в течение четырех недель, начиная через семь дней после инъекции лейкозных клеток. Иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3 (BsAb) (50 мкг/доза в течение первых 3 недель и 150 мкг/доза в течение осталь-

ного времени), инъекцировали за день до и через день после каждого введения РВМС. IL2 мышам не давали. Фиг. 12В и фиг. 12С - самкам мышей NSG подкожно имплантировали 2 миллиона клеток ТНР1 или 1 миллион клеток AML HL60. Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) (10 миллионов/доза) инъекцировали один раз в неделю в течение четырех недель, начиная через семь дней после инъекции лейкозных клеток. Иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3 (BsAb) (100 мкг/доза), инъекцировали за день до и через день после каждого введения РВМС. IL2 мышам не вводили.

На фиг. 13 показаны связывающие свойства иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), в отношении CD33 и CD3. (А) Осуществляли реакцию клеток MOLM13 в течение 30 мин. при 4°C с использованием снижающихся доз hM195 (антитела IgG к CD33), гетеродимерного BsAb и иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3. Клетки промывали и подвергали иммуноокрашиванию с помощью вторичного антитела, конъюгированного с флуорохромом, и анализировали среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии. (В) Осуществляли реакцию клеток MOLM13 в течение 30 мин, 4 ч. или 24 ч. при 37°C или 4°C с 1 мкг/мл hM195 (антитела IgG к CD33), гетеродимерного IgG BsAb и иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3. Клетки промывали и подвергали иммуноокрашиванию с помощью вторичного антитела, конъюгированного с флуорохромом, при 4°C. После отмывания несвязанного антитела анализировали MFI с помощью проточной цитометрии. (С) Осуществляли реакцию активированных Т-клеток в течение 30 мин. при 4°C с hОКТ3 (антителом IgG к CD3), гетеродимерным BsAb и иллюстративным IgG-scFv, связывающимся с CD33 и CD3, в снижающихся дозах. Клетки промывали и подвергали иммуноокрашиванию с помощью вторичного антитела, конъюгированного с флуорохромом, и анализировали MFI путем измерения с помощью проточной цитометрии.

На фиг. 14 показана перекрестная реактивность иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, в отношении CD34(+)CD38(-) гемопоэтических стволовых клеток. (А) Мононуклеарные клетки пуповинной крови очищали с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque и подвергали иммуноокрашиванию с помощью антитела к CD3 человека, антитела к CD19, антитела к CD38, антитела к CD34 и иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3. Для исключения Т-клеток и В-клеток из анализа клетки гейтировали по популяциям CD3(-) и CD19(-). Различные популяции (обозначенные 1-6) клеток оценивали в отношении их связывания с иллюстративным IgG-scFv, связывающимся с CD33 и CD3. (В) Гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники выделяли из мононуклеарных клеток пуповинной крови с помощью микрогранул Miltenyi, покрытых CD34. (С) ТDCC под действием АТС (соотношение Е:Т=10) в присутствии иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, в отношении очищенных CD34+ клеток и клеток AML MOLM13 тестировали с помощью анализа высвобождения хрома.

#### Некоторые определения

В описании, которое следует ниже, широко используется ряд терминов, используемых в области рекомбинантных ДНК и иммунологии. Для обеспечения более понятного и непротиворечивого понимания описания и формулы изобретения, в том числе объема, задаваемого такими терминами, приведены следующие определения.

##### Введение.

Используемый в настоящем изобретении термин "введение", как правило, относится к введению композиции пациенту или в систему для осуществления доставки средства, которое представляет собой композицию или включено в нее. Средним специалистам в данной области будут известны разнообразные пути, которые могут в соответствующих ситуациях быть использованы для введения пациенту, например, человеку. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может быть офтальмологическим, пероральным, парентеральным, местным и т.д. В некоторых вариантах осуществления введение может быть бронхиальным (например, путем бронхиальной инстилляцией), трансбуккальным, дермальным (которое может представлять собой или включать, например, одно или более из местного применения в отношении дермы, интрадермального, интердермального, трансдермального введения и т.д.), энтеральным, внутриартериальным, интрадермальным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, внутрибрюшинным, интратекальным, внутривенным, внутрижелудочковым, в определенный орган (например, внутривисцеральным), чресслизистым, интраназальным, пероральным, ректальным, подкожным, подъязычным, местным, трахеальным (например, путем интратрахеальной инстилляцией), вагинальным, интравитреальным и т.д. В некоторых вариантах осуществления введение может предполагать только одну дозу. В некоторых вариантах осуществления введение может предполагать применение фиксированного количества доз. В некоторых вариантах осуществления введение может предполагать дозирование, которое является прерывистым (например, множество доз, разделенных во времени) и/или периодическим (например, отдельные дозы, разделенные одинаковыми периодами времени) дозированием. В некоторых вариантах осуществления введение может предполагать непрерывное дозирование (например, перфузию) в течение по меньшей мере выбранного периода времени.

Аффинность. Как известно из уровня техники, "аффинность" является мерой прочности связывания конкретного лиганда (например, эпитопа) с его партнером (например, антителом). Аффинность можно

измерить различными способами. В некоторых вариантах осуществления аффинность измеряют с помощью количественного анализа. В некоторых таких вариантах осуществления концентрация партнера по связыванию может быть задана таким образом, что она превышает концентрацию лиганда, с тем чтобы имитировать физиологические условия. В качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления концентрация партнера по связыванию и/или концентрация лиганда может варьироваться. В некоторых таких вариантах осуществления аффинность можно сравнивать с эталоном при сравнимых условиях (например, концентрациях).

**Аминокислота.** Используемый в настоящем изобретении термин "аминокислота" в своем самом широком смысле, используемом в настоящем изобретении, относится к любому соединению и/или веществу, которое может быть включено в полипептидную цепь, например, посредством образования одной или более пептидных связей. В некоторых вариантах осуществления аминокислота характеризуется общей структурой  $H_2N-C(H)(R)-COOH$ . В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой встречающуюся в природе аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой D-аминокислоту; в некоторых вариантах осуществления аминокислота представляет собой L-аминокислоту. "Стандартная аминокислота" относится к любой из двадцати стандартных L-аминокислот, обычно обнаруживаемых во встречающихся в природе пептидах. "Нестандартная аминокислота" относится к любой аминокислоте, отличной от стандартных аминокислот, независимо от того, получена ли она синтетически или получена из природного источника. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, в том числе карбокси- и/или аминоконцевая аминокислота в полипептиде, может содержать структурную модификацию по сравнению с общей структурой, приведенной выше. Например, в некоторых вариантах осуществления аминокислота может быть модифицирована путем метилирования, амидирования, ацетилирования, пегилирования, гликозилирования, фосфорилирования и/или замены (например, аминогруппы, группы карбоновой кислоты, одного или более протонов и/или гидроксильной группы) по сравнению с общей структурой. В некоторых вариантах осуществления такая модификация может, например, изменять период полувыведения из кровотока полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в иных отношениях идентичную немодифицированную аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления такая модификация существенно не изменяет необходимую активность полипептида, содержащего модифицированную аминокислоту, по сравнению с полипептидом, содержащим в иных отношениях идентичную немодифицированную аминокислоту. Как будет понятно из контекста, в некоторых вариантах осуществления термин "аминокислота" может использоваться для обозначения свободной аминокислоты; в некоторых вариантах осуществления он может использоваться для обозначения аминокислотного остатка в пределах полипептида.

**Животное.** Используемый в настоящем изобретении термин "животное" относится к любому представителю царства Животные. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к людям того или иного пола на любой стадии развития. В некоторых вариантах осуществления "животное" относится к животным, отличным от человека, на любой стадии развития. В определенных вариантах осуществления животное, отличное от человека, является млекопитающим (например, грызуном, мышью, крысой, кроликом, обезьяной, собакой, кошкой, овцой, крупным рогатым скотом, приматом и/или свиньей). В некоторых вариантах осуществления животные включают без ограничения млекопитающих, птиц, пресмыкающихся, земноводных, рыб, насекомых и/или червей. В определенных вариантах осуществления животное восприимчиво к инфекции, вызываемой DV. В некоторых вариантах осуществления животное может представлять собой трансгенное животное, животное, полученное методами генной инженерии, и/или клон.

**Антитело.** Используемый в настоящем изобретении термин "антитело" относится к полипептиду, который содержит элементы канонической последовательности иммуноглобулина, достаточные для придания специфичного связывания с конкретным антигеном-мишенью. Как известно из уровня техники, интактные антитела, продуцируемые в природе, представляют собой тетрамерные средства размером примерно 150 кДа, состоящие из двух идентичных полипептидов тяжелой цепи (каждый размером приблизительно 50 кДа) и двух идентичных полипептидов легкой цепи (каждый размером приблизительно 25 кДа), которые соединяются друг с другом в виде структуры, которую обычно называют "Y-образной". Каждая тяжелая цепь состоит из по меньшей мере четырех доменов (каждый длиной приблизительно 110 аминокислот) - аминоконцевого варибельного домена (VH) (расположенного на концах Y-образной структуры), за которым расположены три константных домена: CH1, CH2 и карбоксиконцевой CH3 (расположенный у основания "ствола" Y-образной структуры). Короткая область, известная как "участок переключения", соединяет варибельные и константные области тяжелой цепи. "Шарнирная область" соединяет домены CH2 и CH3 с остальной частью антитела. Две дисульфидные связи в этой шарнирной области соединяют два полипептида тяжелой цепи друг с другом в интактном антителе. Каждая легкая цепь состоит из двух доменов - аминоконцевого варибельного домена (VL), за которым расположен карбоксиконцевой константный (CL) домен, при этом они отделены друг от друга другим "участком переключения". Интактные тетрамерные антитела состоят из двух димеров тяжелая цепь-легкая цепь, в

которых тяжелые и легкие цепи связаны друг с другом посредством одной дисульфидной связи; две другие дисульфидные связи соединяют шарнирные области тяжелых цепей друг с другом, так что димеры соединяются друг с другом, и образуется тетрамер. Антитела природного происхождения также являются гликозилированными, как правило, в домене CH2. Каждый домен в природном антителе имеет структуру, характеризующуюся "укладкой иммуноглобулинов", образованную из двух бета-складчатых слоев (например, складчатых слоев из 3, 4 или 5 тяжелей), упакованных друг на друге в виде сжатого антипараллельного бета-цилиндра. Каждый переменный домен содержит три гипервариабельные петли, известные как "области, определяющие комплементарность" (CDR1, CDR2 и CDR3), и четыре в некоторой степени инвариантные "каркасные" области (FR1, FR2, FR3 и FR4). При сворачивании природных антител FR-области образуют бета-складчатые слои, которые обеспечивают структурный каркас для доменов, и петлевые CDR-области как тяжелой, так и легкой цепей объединяются друг с другом в трехмерном пространстве, так что они образуют один гипервариабельный антигенсвязывающий участок, расположенный на конце Y-образной структуры. Fc-область встречающихся в природе антител связывается с элементами системы комплемента, а также с рецепторами на эффекторных клетках, в том числе, например, на эффекторных клетках, которые опосредуют цитотоксичность. Как известно из уровня техники, аффинность и/или другие характеристики связывания Fc-областей по отношению к Fc-рецепторам можно модулировать путем гликозилирования или другой модификации. В некоторых вариантах осуществления антитела, продуцируемые и/или используемые в соответствии с настоящим изобретением, содержат гликозилированные Fc-домены, в том числе Fc-домены с модифицированным или сконструированным таким гликозилированием. Для целей настоящего изобретения в определенных вариантах осуществления любой полипептид или комплекс полипептидов, который содержит достаточные последовательности доменов иммуноглобулинов, обнаруживаемых в природных антителах, может называться и/или применяться как "антитело", независимо от того, имеет ли такой полипептид природное происхождение (например, вырабатывается организмом, реагирующим на антиген) или получен с помощью рекомбинантной инженерии, химического синтеза или другой искусственной системы или методики. В некоторых вариантах осуществления антитело является поликлональным; в некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления антитело имеет последовательности константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, примата или человека. Термин "антитело" также включает биспецифические и химерные антитела и другие доступные форматы. В некоторых вариантах осуществления антитело, описанное в настоящем изобретении, представляет собой или содержит полноразмерную молекулу иммуноглобулина (например, антитело IgG) или иммунологически активную (т.е. специфично связывающуюся) часть молекулы иммуноглобулина, такую как фрагмент антитела. Фрагмент антитела представляет собой часть антитела, такую как, например, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, sFv и т.п. В некоторых вариантах осуществления антитело находится в формате IgG-scFv. Независимо от структуры фрагмент антитела связывается с тем же(теми же) антигеном(антигенами), которые распознаются интактным(интактными) антителом(антителами). Например, фрагмент моноклонального антитела M195 связывается с эпитопом, распознаваемым M195. Термин "фрагмент антитела" также включает любой синтетический или полученный методами генной инженерии белок, который содержит антигенсвязывающую структуру антитела и действует подобно ему, связываясь с определенным антигеном с образованием комплекса. Например, фрагменты антител включают выделенные фрагменты, состоящие из переменных областей, такие как "Fv"-фрагменты, состоящие из переменных областей тяжелой или легкой цепей, молекулы рекомбинантных одноцепочечных полипептидов, в которых переменные области легкой и тяжелой цепей соединены пептидным линкером ("scFv-белки"), и минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые представляют собой или имитируют гипервариабельную область. Например, в некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела содержит одну или более и в некоторых вариантах осуществления все из областей, определяющих комплементарность (CDR), обнаруживаемых в тяжелой или легкой цепи исходного антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело может не иметь ковалентной модификации (например, присоединения гликана), которую оно бы имело в случае природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезной нагрузки [например, детектируемого компонента, терапевтического компонента, каталитического компонента и т.д.] или другой подвешенной группы [например, полиэтиленгликоля и т.д.]).

Средство на основе антитела. Используемый в настоящем изобретении термин "средство на основе антитела" относится к средству, которое специфично связывается с конкретным антигеном. В некоторых вариантах осуществления данный термин охватывает любой полипептид или комплекс полипептидов, который содержит структурные элементы иммуноглобулина, достаточные для придания специфического связывания. Иллюстративные средства на основе антител включают без ограничения моноклональные антитела или поликлональные антитела. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела может содержать одну или более последовательностей константной области, которые характерны для антител мыши, кролика, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела может содержать один или более элементов последовательности, которые являются гуманизированными, приматизированными, химерными и т.д., как известно из уровня техники. Во многих

вариантах осуществления термин "средство на основе антитела" используется для обозначения одной или более известных из уровня техники или разработанных конструкций или форматов для использования структурных и функциональных признаков антител в альтернативном представлении. Например, в вариантах осуществления средство на основе антитела, используемое в соответствии с настоящим изобретением, находится в формате, выбранном из, без ограничения, интактных антител IgA, IgG, IgE или IgM; би- или полиспецифических антител (например, Zybodyes® и т.д.); фрагментов антител, таких как Fab-фрагменты, Fab'-фрагменты, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, Fd'-фрагменты, Fd-фрагменты и выделенные CDR или их совокупности; одноцепочечных Fv; продуктов слияния полипептид-Fc; однодоменных антител (например, однодоменных антител акулы, таких как IgNAR или их фрагменты); антител верблюдовых; маскированных антител (например, Probodyes®); иммунофармацевтических средств на основе модульных белков малого размера ("SMIPSTM"); одноцепочечных или tandemных диател (TandAb®); VHH; Anticalins®; Nanobodies®, миниантител; BiTE®; белков с анкириновыми повторами или DARPins®; Avimers®; DART; TCR-подобных антител; Adnectins®; Enolins®; Trans-bodyes®; Testbodyes®; TrimerX®; микропротеинов; Fynomers®, Centyrins® и KALBITOR®. В некоторых вариантах осуществления антитело может не иметь ковалентной модификации (например, присоединения гликана), которую оно бы имело в случае природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления антитело может содержать ковалентную модификацию (например, присоединение гликана, полезной нагрузки [например, детектируемого компонента, терапевтического компонента, каталитического компонента и т.д.] или другой подвешенной группы [например, полиэтиленгликоля и т.д.]). Во многих вариантах осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит один или более структурных элементов, распознаваемых специалистами в данной области как область, определяющая комплементарность (CDR); в некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит по меньшей мере одну CDR (например, по меньшей мере одну CDR тяжелой цепи и/или по меньшей мере одну CDR легкой цепи), которая по существу идентична CDR, находящейся в эталонном антителе. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что она имеет идентичную последовательность либо содержит 1-5 аминокислотных замен по сравнению с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что она демонстрирует по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности с эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что по меньшей мере одна аминокислота во включенной CDR удалена, добавлена или заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в иных отношениях идентична последовательности эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что 1-5 аминокислот во включенной CDR удалены, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в иных отношениях идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что по меньшей мере одна аминокислота во включенной CDR заменена по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в иных отношениях идентична последовательности эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления включенная CDR является по существу идентичной эталонной CDR в том смысле, что 1-5 аминокислот во включенной CDR удалены, добавлены или заменены по сравнению с эталонной CDR, но включенная CDR имеет аминокислотную последовательность, которая в иных отношениях идентична эталонной CDR. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела представляет собой или содержит полипептид, аминокислотная последовательность которого содержит структурные элементы, известные для специалистов в данной области как переменные домены иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела представляет собой полипептидный белок, имеющий связывающий домен, который является гомологичным или в значительной степени гомологичным связывающему домену иммуноглобулина.

Рак. Термины "рак", "злокачественное новообразование", "новообразование", "опухоль" и "карцинома" используются в настоящем изобретении для обозначения клеток, которые проявляют относительно аномальный, неконтролируемый и/или автономный рост, так что они проявляют aberrантный фенотип роста, характеризующийся значительной утратой контроля пролиферации клеток. В некоторых вариантах осуществления опухоль может представлять собой или содержать клетки, которые являются предраковыми (например, доброкачественными), злокачественными, преметастатическими, метастатическими и/или неметастатическими. В настоящем раскрытии конкретно идентифицированы определенные типы рака, при которых его идеи могут быть особенно значимыми. В некоторых вариантах осуществле-

ния соответствующий тип рака может характеризоваться солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления соответствующий тип рака может характеризоваться гематологической опухолью. В целом, примеры различных типов рака, известных из уровня техники, включают, например, формы рака кроветворной системы, в том числе формы лейкоза, лимфомы (Ходжкина и неходжкинские), миеломы и миелопролиферативные нарушения; формы саркомы, меланомы, аденомы, карциномы из плотных тканей, плоскоклеточной карциномы рта, глотки, гортани и легкого, рак печени, формы рака мочеполовой системы, такие как рак предстательной железы, шейки матки, мочевого пузыря, матки и эндометрия, а также формы почечноклеточной карциномы, рак костей, рак поджелудочной железы, рак кожи, меланому кожи или внутриглазную меланому, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, формы рака головы и шеи, рак молочной железы, формы рака желудочно-кишечного тракта и формы рака нервной системы, доброкачественные поражения, такие как папилломы, и т.п. В некоторых вариантах осуществления соответствующий тип гематологического рака включает острый миелоидный лейкоз, бифенотипический лейкоз, миелодиспластические синдромы, хронический миеломоноцитарный лейкоз, миелоидный бластный криз при хроническом миелоидном лейкозе и формы острого лимфобластного лейкоза.

**Хелатообразователь.** Хелатообразователь, такой как DTPA, DOTA, бензил-DOTA, TETA или NOTA, можно использовать в любой из разнообразных ситуаций, в том числе в составе конъюгатов. Те же хелатообразователи в комплексе с нерадиоактивными металлами, такими как Mn, Fe и Gd, можно применять для MRI при использовании вместе с bsAb согласно настоящему изобретению. Макроциклические хелатообразователи, такие как NOTA (1,4,7-триаза-1,4,7-триазациклононан-N,N',N''-триуксусная кислота), DOTA, бензил-DOTA и TETA (п-бромацетамидобензилтетраэтиламинтетрауксусная кислота), используются с разнообразными металлами и радиоактивными металлами, в частности, с радионуклидами Ga, Y и Cu соответственно.

**Химиотерапевтическое средство.** Термин "химиотерапевтическое средство", используемый в настоящем изобретении, имеет понятное в данной области техники значение, относящееся к одному или более проапоптотическим, цитостатическим и/или цитотоксическим средствам, например, в том числе, в частности, к средствам, используемым и/или рекомендуемым для применения при лечении одного или более заболеваний, нарушений или состояний, ассоциированных с нежелательной пролиферацией клеток. Во многих вариантах осуществления химиотерапевтические средства применимы при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может представлять собой или содержать одно или более алкилирующих средств, один или более антрациклинов, одно или более средств, разрушающих цитоскелет (например, средств, целенаправленно воздействующих на микротрубочки, таких как таксаны, майтанзин и его аналоги), один или более эпотилонов, один или более ингибиторов гистондеацетилаз (HDAC), один или более ингибиторов топоизомераз (например, ингибиторов топоизомеразы I и/или топоизомеразы II), один или более ингибиторов киназ, один или более аналогов нуклеотидов или аналогов предшественников нуклеотидов, один или более пептидных антибиотиков, одно или более средств на основе платины, один или более ретиноидов, один или более алкалоидов барвинка и/или один или более аналогов одного или более из следующего (т.е. обладающих такой же необходимой антипролиферативной активностью). В некоторых конкретных вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может представлять собой или содержать одно или более из актиномицина, полностью транс-ретиноевой кислоты, ауристатины, азацитидина, азатиоприна, блеомицина, бортезомиба, карбоплатина, капецитабина, цисплатина, хлорамбуцила, циклофосфида, куркумина, цитарабина, даунорубина, доцетаксела, доксифлуридина, доксорубина, эпирубина, эпотилона, эпопозида, фторурацила, гемцитабина, гидроксимочевина, идарубина, иматиниба, иринотекана, майтанзина и/или его аналогов (например, DM1), мехлорэтамина, меркаптопурина, метотрексата, митоксантрона, майтанзиноида, оксалиплатина, паклитаксела, пеметрекседа, тенипозиды, тиогуанина, топотекана, валрубина, винбластин, винкристина, виндезина, винорелбина и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство можно использовать в качестве составной части конъюгата антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой средство, находящееся в составе конъюгата антитело-лекарственное средство, выбранного из группы, состоящей из конъюгатов hLL1-доксорубин, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38, hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-доксорубин, гемтузумаб-озогамицин, брентуксимаб-ведотин, трастузумаб-эмтанзин, инотузумаб-озогамицин, глембатумаб-ведотин, SAR3419, SAR566658, BИВ015, BT062, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, ADC на основе антитела к PSMA, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, ABT-414, IMGN-853, IMGN-529, ворсетузумаб-мафодотин и лорвотузумаб-мертанзин. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может быть описано как используемое в составе конъюгата антитело-лекарственное средство, как описано или обсуждается в одном или более из Govindan et al., *The Scientific World JOURNAL* 10:2070-2089, 2010. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может представлять собой или содержать одно или более из фарнезилтисоалициловой кислоты

(FTS), 4-(4-хлор-2-метилфенокси)-N-гидроксипутанамида (СМН), эстрадиола (Е2), тетраметоксистиленбена (ТМС), 8-гекотриенола, салиномицина или куркумина.

Химерное антитело, в рамках изобретения, относится к антителу, аминокислотная последовательность которого содержит последовательности VH- и VL-областей, которые обнаруживаются у первого вида, и последовательности константной области, которые обнаруживаются у второго вида, отличного от первого вида. Во многих вариантах осуществления химерное антитело имеет VH- и VL-области мыши, связанные с константными областями человека. В некоторых вариантах осуществления антитело с VH- и VL-областями человека, связанными с константными областями, отличными от человеческих (например, константной областью мыши), называется "обратным химерным антителом".

Сравнимый. Используемый в настоящем изобретении термин "сравнимый" относится к двум или более средствам, объектам, случаям, совокупностям условий и т.д., которые могут не быть идентичными друг другу, но которые являются достаточно сходными для обеспечения возможности сравнения между ними, так что специалисту в данной области будет понятно, что на основании наблюдаемых различий или сходств можно сделать разумные выводы. В некоторых вариантах осуществления сравнимые совокупности условий, ситуации, индивидуумы или популяции характеризуются множеством по существу идентичных признаков и одним или небольшим количеством отличающихся признаков. Средним специалистам в данной области будет с учетом контекста понятно, какая степень идентичности требуется в любой данной ситуации для двух или более таких средств, объектов, случаев, совокупностей условий и т.д., чтобы они считались сравнимыми. Например, средним специалистам в данной области будет понятно, что совокупности ситуаций, индивидуумы или популяции являются сравнимыми друг с другом, если они характеризуются достаточным количеством и типом по существу идентичных признаков, чтобы сделать разумно обоснованный вывод о том, что различия в полученных результатах или наблюдаемых явлениях для различных совокупностей ситуаций, индивидуумов или популяций или при их использовании обусловлены изменчивостью этих отличающихся признаков или свидетельствуют о ней.

Конъюгат. В некоторых вариантах осуществления средства на основе антител по изобретению используются в составе конъюгатов. В некоторых конкретных вариантах осуществления используется хелатообразователь, такой как DTPA, DOTA, бензил-DOTA, TETA или NOTA, или подходящий пептид, с которым можно конъюгировать детектируемую метку, такую как флуоресцентная молекула, или цитотоксическое средство, такое как тяжелый металл или радионуклид. Например, терапевтически применимый иммуноконъюгат можно получить путем конъюгирования фотоактивного средства или красителя со слитым полипептидом на основе антитела. Флуоресцентные композиции, такие как флуорохром, и другие хромофены или красители, такие как порфирины, чувствительные к видимому свету, применяли для выявления и лечения повреждений путем направления подходящего света на повреждение. В терапии это было названо фоторадиационной терапией, фототерапией или фотодинамической терапией (Jori et al. (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Libreria Progetto 1985); van den Bergh, Chem. Briys 22:430 (1986)). Более того, моноклональные антитела связывали с фотоактивированными красителями для осуществления фототерапии. Mew et al., J. Immunol. 130:1473 (1983); те же авторы, Cancer Res. 45:4380 (1985); Oseroff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8744 (1986); те же авторы, Photochem. Photobiol. 46:83 (1987); Hasan et al., Prog. Clin. Biol. Res. 288:471 (1989); Tatsuta et al., Lasers Surg. Med. 9:422 (1989); Pelegrin et al., Cancer 67:2529 (1991). Однако эти более ранние исследования не включали использование вариантов применения эндоскопической терапии, в частности, с использованием фрагментов или фрагментов антител. Таким образом, настоящее изобретение предполагает терапевтическое применение иммуноконъюгатов, содержащих фотоактивные средства или красители.

Соответствующий. Используемый в настоящем изобретении термин "соответствующий" может использоваться для обозначения положения/идентичности структурного элемента в соединении или композиции посредством сравнения с соответствующими эталонными соединением или композицией. Например, в некоторых вариантах осуществления мономерный остаток в полимере (например, аминокислотный остаток в полипептиде или остаток нуклеиновой кислоты в полинуклеотиде) может быть идентифицирован как соответствующий остатку в соответствующем эталонном полимере. Например, средним специалистам в данной области будет понятно, что в целях простоты остатки в полипептиде часто обозначают с помощью канонической системы нумерации на основании использования эталонного родственного полипептида, так что аминокислота, "соответствующая" остатку в положении 190, например, не обязательно должна быть действительно 190-й аминокислотой в конкретной аминокислотной цепи, а скорее соответствует остатку, находящемуся в положении 190 в эталонном полипептиде; средним специалистам в данной области будет без труда понятно, как идентифицировать "соответствующие" аминокислоты. Например, специалистам в данной области будут известны различные стратегии выравнивания последовательностей, в том числе такие программы систем программного обеспечения, как, например, BLAST, CS-BLAST, CUSASW++, DIAMOND, FASTA, GGSEARCH/GLSEARCH, Genoogle, HMMER, HHpred/HHsearch, IDF, Infernal, KLAST, USEARCH, ParaSail, PSI-BLAST, PSI-Search, ScalaBLAST, Sequilab, SAM, SSEARCH, SWAPHI, SWAPHI-LS, SWIMM или SWIPE, которые можно использовать, например, для идентификации "соответствующих" остатков в полипептидах и/или нуклеиновых кислотах в соответствии с настоящим изобретением.

Детектируемый объект. Термин "детектируемый объект", используемый в настоящем изобретении, относится к любым элементу, молекуле, функциональной группе, соединению, фрагменту или компоненту, которые являются детектируемыми. В некоторых вариантах осуществления детектируемый объект предусматривается или используется в отдельности. В некоторых вариантах осуществления детектируемый объект предусматривается и/или используется совместно с другим средством (например, будучи присоединенным к нему). Примеры детектируемых объектов включают без ограничения различные лиганды, радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{135}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{187}\text{Re}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{89}\text{Zr}$  и т.д.), флуоресцентные красители (в отношении конкретных иллюстративных флуоресцентных красителей см. ниже), хемилюминесцентные средства (такие как, например, сложные эфиры акридиния, стабилизированные диоксетаны и т.п.), биолюминесцентные средства, спектрально разрешимые неорганические флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы (т.е. квантовые точки), наночастицы металлов (например, золота, серебра, меди, платины и т.д.), нанокластеры, ионы парамагнитных металлов, ферменты (в отношении конкретных примеров ферментов см. ниже), колориметрические метки (такие как, например, красители, коллоидное золото и т.п.), биотин, диоксигенин, гаптены и белки, для которых доступны антисыворотки или моноклональные антитела.

Диагностическое средство. Диагностическое средство представляет собой или содержит объект, который является детектируемым при введении. В некоторых вариантах осуществления диагностическое средство вводится конъюгированным с компонентом антитела, т.е. антителом или фрагментом или субфрагментом антитела, описанным в настоящем изобретении, и может быть использован в диагностике или выявлении заболевания путем определения местоположения клеток, содержащих антиген.

Лекарственная форма. Специалистам в данной области будет понятно, что термин "лекарственная форма" может использоваться для обозначения физически дискретной единицы действующего вещества (например, терапевтического или диагностического средства) для введения пациенту. Как правило, каждая такая единица содержит предварительно определенное количество действующего вещества. В некоторых вариантах осуществления такое количество представляет собой величину единичной дозы (или ее полную долю), подходящую для введения в соответствии с режимом дозирования, который был определен как коррелирующий с желаемым или благоприятным результатом при введении целевой популяции (т.е. с терапевтическим режимом дозирования). Средним специалистам в данной области будет понятно, что общее количество терапевтических композиции или средства, вводимых конкретному пациенту, определяется одним или более лечащими врачами и может предполагать введение нескольких лекарственных форм.

Режим дозирования. Специалистам в данной области будет понятно, что термин "режим дозирования" можно использовать для обозначения совокупности единичных доз (как правило, более одной), которые вводят пациенту по отдельности, как правило, разделенных периодами времени. В некоторых вариантах осуществления данное терапевтическое средство имеет рекомендованный режим дозирования, который может предполагать одну или более доз. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования предусматривает множество доз, каждая из которых отделена во времени от других доз. В некоторых вариантах осуществления отдельные дозы отделены друг от друга периодами времени одинаковой длины; в некоторых вариантах осуществления режим дозирования предусматривает множество доз и по меньшей мере два разных периода времени, разделяющих отдельные дозы. В некоторых вариантах осуществления все дозы в рамках режима дозирования имеют одинаковую величину единичной дозы. В некоторых вариантах осуществления различные дозы в рамках режима дозирования имеют разные величины. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования предусматривает первую дозу с первой величиной дозы, за которой следуют одна или более дополнительных доз со второй величиной дозы, отличной от первой величины дозы. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования предусматривает первую дозу с первой величиной дозы, за которой следуют одна или более дополнительных доз со второй величиной дозы, такой же, как первая величина дозы. В некоторых вариантах осуществления режим дозирования коррелирует с желаемым или благоприятным результатом при введении в целевой популяции (т.е. представляет собой терапевтический режим дозирования).

Эффекторная функция, в рамках изобретения, относится к биохимическому явлению, которое обусловлено взаимодействием Fc-области антитела с Fc-рецептором или лигандом. Эффекторные функции включают без ограничения антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточноопосредованный фагоцитоз (ADCP) и комплемент-опосредованную цитотоксичность (CMC). В некоторых вариантах осуществления эффекторная функция представляет собой эффекторную функцию, которая осуществляется после связывания с антигеном, эффекторную функцию, которая осуществляется независимо от связывания с антигеном, или как то, так и другое.

Эффекторная клетка, в рамках изобретения, относится к клетке иммунной системы, которая экспрессирует один или более Fc-рецепторов и опосредует одну или более эффекторных функций. В некоторых вариантах осуществления эффекторные клетки могут включать без ограничения одно или более из моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, дендритных клеток, эозинофилов, тучных клеток, тромбоцитов, больших гранулярных лимфоцитов, клеток Лангерганса, естественных клеток-киллеров (NK), Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и могут быть получены из любого организма, включая без ограничения лю-

дей, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

Эпитоп, в рамках изобретения, включает любой компонент, который специфично распознается связывающим компонентом иммуноглобулина (например, антитела или рецептора). В некоторых вариантах осуществления эпитоп состоит из множества химических атомов или групп в антигене. В некоторых вариантах осуществления такие химические атомы или группы доступны на поверхности, когда антиген принимает необходимую трехмерную конформацию. В некоторых вариантах осуществления такие химические атомы или группы физически близки друг к другу в пространстве, когда антиген принимает такую конформацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере некоторые такие химические атомы и группы являются физически отделенными друг от друга, когда антиген принимает альтернативную конформацию (например, является линеаризованным).

Fc-лиганд, в рамках изобретения, относится к молекуле, предпочтительно полипептиду, из любого организма, которая связывается с Fc-областью антитела с образованием комплекса Fc-область/лиганд. Fc-лиганды включают без ограничения Fc $\gamma$ RIIA (CD32A), Fc $\gamma$ RIIB (CD32B), Fc $\gamma$ RIIA (CD16A), Fc $\gamma$ RIIB (CD16B), Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\alpha$ RI (CD23), FcRn, C1q, C3, белок А стафилококка, белок G стрептококка и вирусный Fc $\gamma$ R. Fc-лиганды могут включать необнаруженные молекулы, которые связываются с Fc.

Гомология. Используемый в настоящем изобретении термин "гомология" относится к общему родству между полимерными молекулами, например, между молекулами полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы, такие как антитела, считаются "гомологичными" друг другу, если их последовательности являются на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичными. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются "гомологичными" друг другу, если их последовательности являются на по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% сходными.

Клетка-хозяин, в рамках изобретения, относится к клетке, в которую была введена экзогенная ДНК (рекомбинантная или иная). Специалистам в данной области при прочтении настоящего раскрытия будет понятно, что такие термины относятся не только к конкретной рассматриваемой клетке, но также к потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях вследствие влияния мутаций или окружающей среды могут происходить определенные модификации, такое потомство в действительности может не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему включается в объем термина "клетка-хозяин", используемого в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева включают прокариотические и эукариотические клетки, выбранные из любого из царств живых организмов, которые являются подходящими для экспрессии экзогенной ДНК (например, последовательности рекомбинантной нуклеиновой кислоты). Иллюстративные клетки включают клетки прокариот и эукариот (одноклеточных или многоклеточных), бактериальные клетки (например, штаммов *E. coli*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.* и т.д.), клетки микобактерий, грибные клетки, клетки дрожжей (например, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *P. pastoris*, *P. methanolicus* и т.д.), растительные клетки, клетки насекомых (например, SF-9, SF-21, клетки насекомых, инфицированные бакуловирусом, *Trichoplusia ni* и т.д.), клетки животных, отличных от человека, клетки человека или продукты слияния клеток, такие как, например, гибридомы или квадромы. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, нечеловекообразной обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В некоторых вариантах осуществления клетка является эукариотической и выбрана из следующих клеток: CHO (например, CHO-K1, CHO-DXB 11, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сеччатки, Vero, CV1, клетки почки (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60 (например, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (клетки эпидермиса), CV-1, U937, 3T3, L-клетки, клетки C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, клетки Сертоли, клетки BRL 3A, клетки HT1080, клетки миеломы, опухолевой клетки и линии клеток, происходящей из вышеупомянутой клетки. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или более вирусных генов.

Человек, в рамках изобретения, предполагает включение людей на всех стадиях развития. В некоторых вариантах осуществления человек является эмбрионом, плодом, младенцем, ребенком, подростком, взрослым или пожилым человеком.

Антитело человека, в рамках изобретения, предполагает включение антител, имеющих переменные и константные области, образованные (или собранные) из последовательностей иммуноглобулинов человека. В некоторых вариантах осуществления антитела (или компоненты антител) можно считать "человеческими", даже если их аминокислотные последовательности содержат остатки или элементы, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов человека зародышевого типа (например, содержат видоизменения последовательностей, например, которые могут (изначально) быть введены посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*), например, в одной или более CDR и, в частности, в CDR3.

Гуманизированный. "Гуманизированное" антитело представляет собой рекомбинантный белок, в котором CDR из антитела от одного вида; например, антитела грызуна, перенесены из переменных доменов тяжелой и легкой цепей антитела грызуна в переменные домены тяжелой и легкой цепей человека. Константный домен данной молекулы антитела получен из антитела человека.

Идентичность. Используемый в настоящем изобретении термин "идентичность" относится к общему родству между полимерными молекулами, например, между молекулами нуклеиновых кислот (например, молекулами ДНК и/или молекулами РНК) и/или между молекулами полипептидов. В некоторых вариантах осуществления полимерные молекулы считаются "по существу идентичными" друг другу, если их последовательности являются на по меньшей мере 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичными. Расчет процента идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидов, например, может быть выполнен путем выравнивания двух последовательностей в целях оптимального сравнения (например, в одну или обе из первой и второй последовательностей могут быть введены гэпы для оптимального выравнивания, и для целей сравнения неидентичные последовательности могут не приниматься во внимание). В определенных вариантах осуществления длина последовательности, выравниваемой для целей сравнения, составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по существу 100% от длины эталонной последовательности. Затем сравнивают нуклеотиды в соответствующих положениях. Если положение в первой последовательности занято тем же остатком (например, нуклеотидом или аминокислотой), что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в данном положении. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных положений, общих для данных последовательностей, с учетом количества гэпов и длины каждого гэпа, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно выполнять с использованием математического алгоритма. Например, процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями можно определить с помощью алгоритма Миллера-Майерса (CABIOS, 1989, 4: 11-17), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0). В некоторых иллюстративных вариантах осуществления при сравнении последовательностей нуклеиновых кислот, производимом с помощью программы ALIGN, используется таблица весов замен остатков PAM120, штраф за продление гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4. Процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями может быть в качестве альтернативы определен с помощью программы GAP из пакета программного обеспечения GCG с использованием матрицы NWSgapdna.CMP.

Иммуноконъюгат. "Иммуноконъюгат" представляет собой конъюгат (т.е. образованный ковалентной связью) компонента-антитела с полезной нагрузкой (например, терапевтическим или диагностическим средством).

Иммуномодулятор. "Иммуномодулятор" представляет собой средство, которое в случае его наличия, как правило, стимулирует пролиферацию или активацию иммунных клеток, таких как макрофаги, В-клетки и/или Т-клетки, в ходе каскада иммунного ответа. Примером иммуномодулятора, описанного в настоящем изобретении, является цитокин. Как будет понятно специалисту в данной области, определенные интерлейкины и интерфероны являются примерами цитокинов, которые стимулируют пролиферацию Т-клеток или других иммунных клеток.

*In vitro*. Используемый в настоящем изобретении термин "*in vitro*" относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например, в пробирке или реакционном сосуде, в культуре клеток и т.д., а не в многоклеточном организме.

*In vivo*, в рамках изобретения, относится к событиям, которые происходят в многоклеточном организме, таком как человек и животное, отличное от человека. Применительно к клеточным системам данный термин можно использовать для обозначения событий, которые происходят в живой клетке (в противоположность, например, системам *in vitro*).

Выделенный, в рамках изобретения, относится к веществу и/или объекту, которые были (1) отделены от по меньшей мере некоторых компонентов, с которыми они были связаны при изначальном продуцировании (будь то в природе и/или в условиях проведения эксперимента), и/или (2) разработаны, продуцированы, получены и/или произведены руками человека. Выделенные вещества и/или объекты могут быть отделены от приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99% других компонентов, с которыми они были изначально связаны. В некоторых вариантах осуществления выделенные средства характеризуются приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более чем приблизительно 99% чистотой. В рамках изобретения, вещество является "чистым", если оно по существу не содержит других компонентов. В некоторых вариантах осуществления, как будет понятно специалистам в данной области, вещество по-прежнему можно считать "выделенным" или даже "чистым" после его объединения с определенными другими компонентами, такими как, например, один или более носителей или наполнителей (например, буфер, раствори-

тель, вода и т.д.); в таких вариантах осуществления процент выделения или чистоты вещества рассчитывают без включения таких носителей или наполнителей. В качестве лишь одного приводимого примера, в некоторых вариантах осуществления биологический полимер, такой как полипептид или полинуклеотид, который встречается в природе, считается "выделенным", если а) он в силу своего происхождения или источника получения не связан с некоторыми или всеми компонентами, которые сопутствуют ему в его нативном состоянии в природе; б) он по существу не содержит других полипептидов или нуклеиновых кислот из того же вида, который продуцирует их в природе; с) он экспрессируется клеткой или другой системой экспрессии, которая не принадлежит к виду, у которого он продуцируется в природе, или иным образом связан с ее компонентами. Таким образом, например, в некоторых вариантах осуществления полипептид, синтезируемый химическим путем или синтезируемый в клеточной системе, отличной от той, в которой он продуцируется в природе, считается "выделенным" полипептидом. В качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления полипептид, который был подвергнут одной или более методикам очистки, может считаться "выделенным" полипептидом в той степени, в которой он был отделен от других компонентов, а) с которыми он связан в природе и/или б) с которыми он был связан при изначальном продуцировании.

Линкер, в рамках изобретения, используется для обозначения той части многоэлементного средства, которая соединяет различные элементы друг с другом. Например, средним специалистам в данной области понятно, что полипептид, структура которого содержит два или более функциональных или организационных домена, часто содержит отрезок из аминокислот между такими доменами, который связывает их друг с другом. В некоторых вариантах осуществления полипептид, содержащий линкерный элемент, имеет общую структуру общей формы S1-L-S2, где S1 и S2 могут быть одинаковыми или разными и представляют два домена, связанных друг с другом посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления полипептидный линкер имеет длину по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или больше аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер характеризуется тем, что он не склонен принимать жесткую трехмерную структуру, а скорее обеспечивает гибкость полипептида. Ряд различных линкерных элементов, которые можно соответствующим образом использовать при конструировании полипептидов (например, слитых полипептидов), известен из уровня техники (см., например, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123).

Полиспецифический. "Полиспецифическое" антитело представляет собой антитело, которое может связываться одновременно с по меньшей мере двумя мишенями, которые имеют разную структуру, например, с двумя разными антигенами, двумя разными эпитопами на одном и том же антигене или гаптенном и антигеном или эпитопом. Одна форма специфичности может проявляться, например, по отношению к антигену или эпитопу В-клеток, Т-клеток, миелоидных клеток, плазматических клеток или тучных клеток. Другая форма специфичности может проявляться по отношению к другому антигену на клетках того же типа, такому как, например, CD20, CD19, CD21, CD23, CD46, CD80, HLA-DR, CD74 или CD22 на В-клетках. Полиспецифические поливалентные антитела представляют собой конструкции, которые имеют более одного связывающего участка, и при этом связывающие участки характеризуются разной специфичностью. Например, в биспецифическом антителе один связывающий участок реагирует с одним эпитопом антигена, а другой с другим эпитопом того же или другого антигена.

Мутантный. Используемый в настоящем изобретении термин "мутантный" относится к объекту, демонстрирующему значительную структурную идентичность с эталонным объектом, но отличающемуся структурно от эталонного объекта по наличию или уровню одного или более химических компонентов по сравнению с эталонным объектом. Во многих вариантах осуществления мутантная форма также отличается функционально от своего эталонного объекта. В целом, то, правильно ли считать конкретный объект "мутантной формой" эталонного объекта, основывается на степени его структурной идентичности с эталонным объектом. Как будет понятно специалистам в данной области, любой биологический или химический эталонный объект имеет определенные характерные структурные элементы. Мутантная форма по определению представляет собой отличающийся химический объект, который обладает одним или более такими характерными структурными элементами. В качестве лишь нескольких приводимых примеров, малая молекула может иметь характерный сердцевинный структурный элемент (например, макроциклическую сердцевину) и/или один или более характерных подвешенных компонентов, так что мутантная форма малой молекулы представляет собой молекулу, обладающую сердцевинным структурным элементом и характерными подвешенными компонентами, но отличающуюся другими подвешенными компонентами и/или типами присутствующих связей (одинарные в сравнении с двойными, E в сравнении с Z и т.д.) в сердцевине, при этом полипептид может иметь характерный элемент последовательности, состоящий из множества аминокислот, имеющих обозначенные положения по отношению друг к другу в линейном или трехмерном пространстве и/или способствующих конкретной биологической функции, и нуклеиновая кислота может иметь характерный элемент последовательности, состоящий из множества нуклеотидных остатков, имеющих обозначенные положения по отношению друг к другу в линейном или трехмерном пространстве. Например, мутантный полипептид может отличаться от

эталонного полипептида вследствие одного или более различий в аминокислотной последовательности и/или одного или более различий в химических компонентах (например, углеводах, липидах и т.д.), ковалентно присоединенных к полипептидному остову. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид демонстрирует общую идентичность последовательности с эталонным полипептидом, составляющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% или 99%. В качестве альтернативы или дополнительно, в некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид не обладает по меньшей мере одним характерным элементом последовательности эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления эталонный полипептид характеризуется одной или более формами биологической активности. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид обладает одной или более формами биологической активности эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления у мутантного полипептида отсутствуют одна или более форм биологической активности эталонного полипептида. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид демонстрирует сниженный уровень одной или более форм биологической активности по сравнению с эталонным полипептидом.

**Пациент.** Используемый в настоящем изобретении термин "пациент" относится к любому организму, которому вводится или может вводиться предусмотренная композиция, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических, косметических и/или терапевтических целей. Типичные пациенты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, приматы, отличные от человека, и/или люди). В некоторых вариантах осуществления пациент является человеком. В некоторых вариантах осуществления пациент страдает одним или более нарушениями или состояниями или подвержен им. В некоторых вариантах осуществления у пациента проявляются один или более симптомов нарушения или состояния. В некоторых вариантах осуществления у пациента было диагностировано одно или более нарушений или состояний. В некоторых вариантах осуществления нарушение или состояние представляет собой или включает рак или наличие одной или более опухолей. В некоторых вариантах осуществления пациент получает или получал определенную терапию для диагностики и/или для лечения заболевания, нарушения или состояния.

**Фармацевтически приемлемый.** Используемый в настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемый", применяемый в отношении носителя, разбавителя или наполнителя, используемого для составления композиции, раскрытой в настоящем изобретении, означает, что носитель, разбавитель или наполнитель должен быть совместимым с другими ингредиентами композиции и не быть вредоносным для получающего его пациента.

**Фармацевтически приемлемый носитель.** Используемый в настоящем изобретении термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или основу, как, например, жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, наполнитель или материал для инкапсулирования растворителя, участвующий в переносе или транспортировке рассматриваемого соединения из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждый носитель должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместимым с другими ингредиентами состава и не должен причинять вред пациенту. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, включают сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлозу и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетилцеллюлоза; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; наполнители, такие как масло какао и суппозиторные воски; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновую кислоту; апирогенную воду; изотонический солевой раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; буферные растворы с определенным pH; сложные полиэфиры, поликарбонаты и/или полиангидриды и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах.

**Полипептид,** в рамках изобретения, относится к любой полимерной цепи из аминокислот. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, которая является сконструированной в том смысле, что она разработана и/или получена посредством действия рук человека. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать природные аминокислоты, неприродные аминокислоты или как те, так и другие или состоять из них. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать только природные аминокислоты или только неприродные аминокислоты или состоять из них. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать D-аминокислоты, L-аминокислоты или как те, так и другие. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать только D-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать только L-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления полипептид может содержать одну или более подвешенных групп или

других модификаций, например, модифицирующих одну или более боковых цепей аминокислот, N-конец полипептида, C-конец полипептида или присоединенных к ним, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие подвешенные группы или модификации могут быть выбраны из группы, состоящей из ацетилирования, амидирования, липидизации, метилирования, пегилирования и т.д., включая их комбинации. В некоторых вариантах осуществления полипептид может быть циклическим и/или может содержать циклическую часть. В некоторых вариантах осуществления полипептид не является циклическим и/или не содержит какую-либо циклическую часть. В некоторых вариантах осуществления полипептид является линейным. В некоторых вариантах осуществления полипептид может представлять собой или содержать полипептид, стабилизированный "скобками". В некоторых вариантах осуществления термин "полипептид" может быть добавлен к названию эталонного полипептида, активности или структуры; в таких случаях он используется в настоящем изобретении для обозначения полипептидов, которые обладают необходимой активностью или структурой и, таким образом, могут считаться членами того же класса или семейства полипептидов. Для каждого такого класса в настоящем описании предусмотрены и/или специалистам в данной области будут известны иллюстративные полипептиды в пределах класса, аминокислотные последовательности и/или функции которых известны; в некоторых вариантах осуществления такие иллюстративные полипептиды представляют собой эталонные полипептиды для класса или семейства полипептидов. В некоторых вариантах осуществления член класса или семейства полипептидов демонстрирует значительную гомологию или идентичность последовательности, характеризуется общим мотивом последовательности (например, характерным элементом последовательности) и/или обладает общей активностью (в некоторых вариантах осуществления на сравнимом уровне или в пределах обозначенного диапазона) с эталонным полипептидом класса; в некоторых вариантах осуществления со всеми полипептидами в пределах класса. Например, в некоторых вариантах осуществления полипептид-член демонстрирует общую степень гомологии или идентичности последовательности с эталонным полипептидом, составляющую по меньшей мере приблизительно 30-40% и зачастую превышающую приблизительно 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше, и/или содержит по меньшей мере одну область (например, консервативную область, которая может в некоторых вариантах осуществления представлять собой или содержать характерный элемент последовательности), демонстрирующую очень высокую идентичность последовательности, зачастую превышающую 90% или даже 95%, 96%, 97%, 98% или 99%. Такая консервативная область обычно охватывает по меньшей мере 3-4 и часто до 20 или больше аминокислот; в некоторых вариантах осуществления консервативная область охватывает по меньшей мере один отрезок из по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше смежных аминокислот. В некоторых вариантах осуществления применимый полипептид может содержать фрагмент исходного полипептида или состоять из него. В некоторых вариантах осуществления применимый полипептид может содержать множество фрагментов, каждый из которых находится в одном и том же исходном полипептиде в пространственном расположении друг относительно друга, отличным от обнаруживаемого в полипептиде, представляющем интерес (например, фрагменты, которые непосредственно связаны друг с другом в исходной молекуле, могут быть пространственно разделены в полипептиде, представляющем интерес, или наоборот, и/или фрагменты могут присутствовать в полипептиде, представляющем интерес, в порядке, отличным от порядка в исходной молекуле), или состоять из него, так что полипептид, представляющий интерес, представляет собой производное его исходного полипептида.

Предупреждать или профилактики, в рамках изобретения при использовании в связи с появлением заболевания, нарушения и/или состояния, относится к снижению риска развития заболевания, нарушения и/или состояния и/или к задержке начала проявления одного или более признаков или симптомов заболевания, нарушения или состояния. Профилактика может считаться полной, если начало проявления заболевания, нарушения или состояния было задержано на предварительно определенный период времени.

Рекомбинантный, в рамках изобретения, предполагается как относящийся к полипептидам, разрабатываемым, конструируемым, получаемым, экспрессируемым, создаваемым, производимым и/или выделяемым с помощью рекомбинантных способов, таким как полипептиды, экспрессируемые с помощью рекомбинантного вектора экспрессии, введенного путем трансфекции в клетку-хозяина, полипептиды, выделенные из комбинаторной библиотеки рекомбинантных полипептидов человека (например, Hoogenboom, TIB Tech 15:62, 1997; Azzazy Clin. Biochem. 35:425, 2002; Gavilondo BioTechniques 29:128, 2002; Hoogenboom Immunology Today 21:371, 2000), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см., например, Taylor Nuc. Acids Res. 20:6287, 1992; Little Immunology Today 12:364, 2000; Kellermann Curt. Opin. Biotechnol 13:593, 2002; Murphy Proc. Natl Acad Sci USA 111:5153, 2104), или полипептиды, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные любым другим способом, который предполагает сплайсинг выбранных элементов последовательностей друг с другом. В некоторых вариантах осуществления один или более из таких выбранных элементов последовательностей обнаруживаются в природе. В некоторых вариантах осуществления один или более из таких выбранных элементов последовательностей разработаны *in silico*. В некоторых вариантах осуществления один или более таких выбранных элементов последовательностей являются результатом мутагенеза (например, *in vivo* или *in vitro*) известного элемента последовательности

сти, например, из природного или синтетического источника. Например, в некоторых вариантах осуществления рекомбинантное полипептидное антитело состоит из последовательностей, обнаруживаемых в зародышевой линии организма-источника, представляющего интерес (например, человека, мыши и т.д.). В некоторых вариантах осуществления рекомбинантное антитело имеет аминокислотную последовательность, полученную в результате мутагенеза (например, *in vitro* или *in vivo*, например, у трансгенного животного), так что аминокислотные последовательности VH- и VL-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей VH и VL зародышевого типа и родственны им, могут в естественных условиях не иметься среди репертуара антител зародышевого типа *in vivo*.

Извлечение, в рамках изобретения, относится к процессу, в ходе которого средство или объект делаются по существу не содержащими других ранее связанных с ними компонентов, например, посредством выделения, например, с помощью методик очистки, известных из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления средство или объект извлекают из природного источника и/или источника, содержащего клетки.

Эталон, в рамках изобретения, описывает стандарт или контроль, с которыми выполняют сравнение. Например, в некоторых вариантах осуществления средство, животное, индивидуума, популяцию, образец, последовательность или значение, представляющие интерес, сравнивают с эталонными или контрольными средством, животным, индивидуумом, популяцией, образцом, последовательностью или значением. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль тестируют и/или определяют по существу одновременно с тестированием или определением того, что представляет интерес. В некоторых вариантах осуществления эталон или контроль представляет собой исторический эталон или контроль, необязательно воплощенный на материальном носителе. Как правило, как будет понятно специалистам в данной области, эталон или контроль определяют или характеризуют в условиях или ситуациях, сравнимых с теми, при которых происходит оценка. Специалистам в данной области будет понятно, когда имеются достаточные сходства для признания правомочности доверия к конкретному возможному эталону или контролю и/или сравнения с ним.

Специфичное связывание. Используемый в настоящем изобретении термин "специфичное связывание" относится к способности различать возможных партнеров по связыванию в среде, в которой будет происходить связывание. Говорят, что средство на основе антитела, которое взаимодействует с одной конкретной мишенью при наличии других потенциальных мишеней, "специфично связывается" с мишенью, с которой оно взаимодействует. В некоторых вариантах осуществления специфичное связывание оценивают путем выявления или определения степени ассоциации между средством на основе антитела и его партнером; в некоторых вариантах осуществления специфичное связывание оценивают путем выявления или определения степени диссоциации комплекса средства на основе антитела и его партнера; в некоторых вариантах осуществления специфичное связывание оценивают путем выявления или определения способности средства на основе антитела конкурировать с альтернативным взаимодействием между его партнером и другим объектом. В некоторых вариантах осуществления специфичное связывание оценивают путем выполнения таких выявлений или определений в пределах диапазона концентраций.

По существу. Используемый в настоящем изобретении термин "по существу" относится к качественному состоянию проявления полной или практически полной меры или степени выраженности характеристики или свойства, представляющих интерес. Среднему специалисту в области биологии будет понятно, что биологические и химические явления редко, если это вообще происходит, протекают до конца и/или продолжают до завершения или достижения или исключения абсолютного результата. Таким образом, термин "по существу" используется в настоящем изобретении для охвата потенциального отсутствия завершенности, присущего многим биологическим и химическим явлениям.

Терапевтическое средство. Используемая в настоящем изобретении фраза "терапевтическое средство" в целом относится к любому средству, которое вызывает желаемый фармакологический эффект при введении в организм. В некоторых вариантах осуществления средство считается терапевтическим средством, если оно демонстрирует статистически значимый эффект в надлежащей популяции. В некоторых вариантах осуществления надлежащая популяция может представлять собой популяцию модельных организмов. В некоторых вариантах осуществления надлежащая популяция может быть определена различными критериями, такими как определенная возрастная группа, пол, генетическое окружение, исходные клинические условия и т.д. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой вещество, которое можно применять для облегчения, уменьшения интенсивности проявлений, ослабления, ингибирования, предупреждения, задержки начала проявления, снижения тяжести и/или снижения частоты возникновения одного или более симптомов или признаков заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическое средство" представляет собой средство, которое было одобрено или требует одобрения правительственным органом перед тем, как его можно будет реализовывать на рынке для введения людям. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическое средство" представляет собой средство, для введения людям которого требуется медицинский рецепт.

Терапевтически эффективное количество, в рамках изобретения, означает количество, вызывающее

желаемый эффект, ради которого его вводят. В некоторых вариантах осуществления этот термин относится к количеству, которое при введении популяции, страдающей заболеванием, нарушением и/или состоянием или подверженной им, в соответствии с терапевтическим режимом дозирования является достаточным для лечения заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективным количеством является количество, которое снижает частоту возникновения и/или тяжесть и/или задерживает начало проявления одного или более симптомов заболевания, нарушения и/или состояния. Средним специалистам в данной области будет понятно, что термин "терапевтически эффективное количество" в действительности не требует достижения успеха в лечении конкретного индивидуума. Терапевтически эффективное количество скорее может представлять собой такое количество, которое обеспечивает конкретный желаемый фармакологический ответ у значительного количества пациентов при введении пациентам, нуждающимся в таком лечении. Например, в некоторых вариантах осуществления термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, которое при введении индивидууму, нуждающемуся в этом, в рамках терапии согласно настоящему изобретению будет блокировать, стабилизировать, ослаблять или обращать вспять процесс, способствующий раку, происходящий у указанного индивидуума, или будет усиливать или интенсифицировать процесс, подавляющий рак, у указанного индивидуума. Применительно к лечению рака "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое при введении индивидууму, у которого диагностирован рак, будет предупреждать, стабилизировать, ингибировать или ослаблять дальнейшее развитие рака у индивидуума. Особенно предпочтительное "терапевтически эффективное количество" композиции, описанной в настоящем изобретении, обращает вспять (при терапевтическом лечении) развитие злокачественного новообразования или способствует достижению или продлению ремиссии злокачественного новообразования. Терапевтически эффективное количество, вводимое индивидууму для лечения рака у этого индивидуума, может быть таким же, как терапевтически эффективное количество, вводимое для обеспечения ремиссии или ингибирования метастазирования, или отличным от него. Как и в случае с большинством видов терапии рака, терапевтические способы, описанные в настоящем изобретении, не должны интерпретироваться как сводимые к "излечению" рака или иным образом ограниченные им; данные способы лечения скорее направлены на применение описанных композиций для "лечения" рака, т.е. для осуществления желаемого или благоприятного изменения состояния здоровья индивидуума, имеющего рак. Такие благоприятные эффекты известны квалифицированным поставщикам медицинских услуг в области онкологии и включают без ограничения стабилизацию состояния пациента, уменьшение размера опухоли (регрессию опухоли), улучшение жизненно важных функций (например, улучшение функции тканей или органов, пораженных раком), уменьшение или ингибирование дальнейшего метастазирования, уменьшение частоты оппортунистических инфекций, увеличение выживаемости, уменьшение боли, улучшение двигательной функции, улучшение когнитивной функции, улучшение чувства энергии (жизненная активность, уменьшение недомогания), улучшение самочувствия, восстановление нормального аппетита, восстановление здоровой прибавки массы тела и их комбинации. Кроме того, регрессию конкретной опухоли у индивидуума (например, вследствие видов лечения, описанных в настоящем изобретении) также можно оценить путем взятия образцов раковых клеток из очага опухоли, такой как аденокарцинома поджелудочной железы (например, в течение курса лечения), и тестирования раковых клеток в отношении уровня метаболических и сигнальных маркеров для отслеживания статуса раковых клеток в целях подтверждения на молекулярном уровне регрессии раковых клеток до менее злокачественного фенотипа. Например, на регрессию опухоли, индуцированную использованием способов согласно настоящему изобретению, будет указывать обнаружение уменьшения уровня любого из проангиогенных маркеров, обсуждаемых выше, увеличения уровня антиангиогенных маркеров, описанных в настоящем изобретении, нормализации (т.е. изменения в сторону состояния, обнаруживаемого у здоровых индивидуумов, не страдающих раком) метаболических путей, межклеточных сигнальных путей или внутриклеточных сигнальных путей, которые проявляют аномальную активность у индивидуумов, у которых диагностирован рак. Средним специалистам в данной области будет понятно, что в некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество можно составлять и/или вводить в одной дозе. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество можно составлять и/или вводить во множестве доз, например, в качестве части режима дозирования.

Лечение. Используемый в настоящем изобретении термин "лечение" (также "лечить" или "осуществление лечения") относится к любому введению средства терапии, которое частично или полностью облегчает, уменьшает интенсивность проявлений, ослабляет, ингибирует, задерживает начало проявления, снижает тяжесть и/или снижает частоту возникновения одного или более симптомов, признаков и/или причин конкретного заболевания, нарушения и/или состояния (например, рака). В некоторых вариантах осуществления такое лечение может осуществляться в отношении пациента, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния, и/или пациента, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, нарушения и/или состояния. В качестве альтернативы или дополнительно, такое лечение может осуществляться в отношении пациента, у которого проявляются один или более установленных признаков соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния. В некоторых вариантах осуществления лечение может осуществляться в отношении пациента, кото-

рый согласно проведенной диагностике страдает соответствующим заболеванием, нарушением и/или состоянием. В некоторых вариантах осуществления лечение может осуществляться в отношении пациента, о котором известно, что он имеет один или более факторов восприимчивости, статистически коррелирующих с увеличенным риском развития соответствующего заболевания, нарушения и/или состояния.

Разовая доза. Выражение "разовая доза", используемое в настоящем изобретении, относится к количеству, вводимому в виде однократной дозы и/или в физически дискретной единице фармацевтической композиции. Во многих вариантах осуществления разовая доза содержит предварительно определенное количество действующего вещества. В некоторых вариантах осуществления разовая доза содержит всю однократную дозу средства. В некоторых вариантах осуществления для получения общей однократной дозы вводят более одной разовой дозы. В некоторых вариантах осуществления для достижения предполагаемого эффекта требуется или согласно ожиданиям требуется введение нескольких единичных доз. Разовая доза может представлять собой, например, объем жидкости (например, приемлемого носителя), содержащий предварительно определенное количество одного или более терапевтических средств в твердой форме, состав с замедленным высвобождением или устройство доставки лекарственных средств, содержащее предварительно определенное количество одного или более терапевтических средств, и т.д. Будет понятно, что разовая доза может присутствовать в составе, который содержит любой из разнообразных компонентов в дополнение к терапевтическому(терапевтическим) средству(средствам). Например, могут быть включены приемлемые носители (например, фармацевтически приемлемые носители), разбавители, стабилизаторы, буферы, консерванты и т.д., как описано ниже. Специалистам в данной области будет понятно, что во многих вариантах осуществления общая соответствующая суточная доза конкретного терапевтического средства может содержать часть или множество разовых доз и может быть определена, например, лечащим врачом в рамках тщательной медицинской оценки. В некоторых вариантах осуществления конкретный эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента или организма может зависеть от разнообразных факторов, в том числе нарушения, лечение которого осуществляют, и тяжести нарушения; активности конкретного используемого активного соединения; конкретной используемой композиции; возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола и рациона пациента; времени введения и скорости выведения конкретного используемого активного соединения; продолжительности лечения; лекарственных средств и/или дополнительных видов терапии, используемых в комбинации или совместно с конкретным(конкретными) используемым(используемыми) соединением(соединениями), и подобных факторов, хорошо известных в области медицины.

Вектор, в рамках изобретения, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Одним типом вектора является "плазмида", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, с которой можно лигировать дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК можно лигировать с вирусным геномом. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомные векторы для экспрессии в клетках млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы для экспрессии в клетках млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в настоящем изобретении "векторами экспрессии".

Можно использовать стандартные методики для получения рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культивирования и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и методики очистки можно выполнять согласно спецификации производителя или как обычно осуществляется в данной области техники или как описано в настоящем изобретении. Вышеупомянутые методики и процедуры можно в целом выполнять согласно традиционным способам, хорошо известным из уровня техники и описанным в различных общих и более конкретных источниках, которые цитируются и обсуждаются во всем настоящем описании. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), которая включена в настоящее описание посредством ссылки в любых целях.

#### **Подробное описание некоторых вариантов осуществления**

Иммунотерапевтические средства обеспечивали некоторый прогресс в лечении некоторых типов рака. Однако, варианты лечения и прогноз для некоторых форм рака остаются насущной проблемой. В частности, выживаемость пациентов с некоторыми формами гемобластоза (например, миелоидным лейкозом) все еще является неутешительной.

CD33.

CD33 (также известный как Siglec-3, SIGLEC3, gp67, p67) представляет собой белок плазматической мембраны размером 67 кДа, который связывается с сialовой кислотой и является членом семейства белков Ig-родственных лектинов, связывающих сialовую кислоту (SIGLEC). Считается, что белки Siglec участвуют в различных биологических процессах, таких как гемопоэз, развитие нейронов и иммунитет

(Vinson, M. et al., 1996, выше). Исследования также позволяют предположить, что белки Siglec опосредуют клеточную адгезию/передачу сигнала в клетках посредством распознавания сialiлированных гликанов клеточной поверхности (Keim, S. et al., 1996 *Glycoconj. J.* 13:913-926; Keim, S. et al., 1998 *Eur. J. Biochem.* 255:663-672; Vinson, M. et al., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:9267-9272). Внеклеточная часть CD33 содержит два домена иммуноглобулинов (один домен IgV и один домен IgC2). Внутриклеточная часть CD33 содержит иммунорецепторные тирозиновые ингибирующие мотивы (ITIM). В ходе иммунного ответа CD33 может выступать в качестве ингибирующего рецептора после лиганд-индуцированного фосфорилирования тирозина посредством мобилизации цитоплазматической(цитоплазматических) фосфатазы(фосфатаз), которые блокируют передачу сигнала путем дефосфорилирования сигнальных молекул.

Известно, что CD33 экспрессируется на миелоидных клетках. Также сообщалось об экспрессии CD33 на ряде злокачественных клеток. Хотя на CD33 осуществляли нацеливание при лечении рака, например, острого миелоидного лейкоза, в настоящее время на рынке отсутствуют эффективные средства лечения, нацеливающиеся на CD33.

Средства на основе антител к CD33.

Был получен ряд средств, нацеливающихся на CD33, но данные средства имеют ряд недостатков, которые могут включать неудовлетворительный период полувыведения, неудовлетворительное функционирование *in vivo* и/или нежелательные эффекты.

Гемтузумаб-озогамицин (GO, Mylotarg™) представляет собой гуманизованное моноклональное антитело IgG4 к CD33, соединенное с диметилгидразидом N-ацетил-γ-калицхеамицина (CalichDMH) (Hammann PR, et al. *Bioconj. Chem* 13:47-58, 2002). При связывании с CD33 GO интернализируется, и высвобождение токсичного калихеамицина индуцирует повреждение ДНК, которое в итоге приводит к гибели клетки. Однако, с момента его одобрения FDA в 2000 году для лечения CD33+ AML в нескольких испытаниях сообщалось о неоднородных клинических эффектах, и широко распространенной является приобретенная устойчивость.

Несмотря на то, что изначально GO был ассоциирован с улучшенным лечением пациентов с AML, дальнейшие клинические испытания и пострегистрационная оценка выявили отсутствие эффективности и смертельные побочные эффекты. Промежуточный анализ в рамках клинического испытания показал, что GO в комбинации с химиотерапией не превосходит химиотерапию в отдельности (Petersdorf S, et al. *Blood* 114:790-790, 2009 и Petersdorf SH, et al., *Blood* 121:4854-60, 2013). Кроме того, частота нежелательных эффектов, вызывающих смерть, у пациентов, получавших лечение с помощью GO, была выше. Там же. Поэтому GO был отозван с рынка в 2010 году, и в настоящее время FDA не рекомендует GO для лечения AML.

Линтузумаб представляет собой гуманизованное моноклональное антитело IgG1 к CD33. В доклинических моделях AML линтузумаб продемонстрировал некоторый терапевтический потенциал (Sutherland MK, et al. *MAb* 2:440-8, 2010); однако в случае неоднородной популяции пациентов результаты клинического испытания фазы IIb показали, что комбинация линтузумаба и цитарабина не превосходила цитарабин в отдельности у взрослых с AML (Sekeres MA, et al. *Haematologica* 98:119-28, 2013). Таким образом, клиническая разработка линтузумаба была завершена в 2010 году (Laszlo GS, et al. *Blood Rev* 28:143-53, 2014).

AVE9633 представляет собой конъюгат гуманизованное антитело IgG1 к CD33/майтанзиноид. В качестве средства монотерапии он обладает весьма незначительной активностью у пациентов с AML. Таким образом, его клиническая разработка была завершена (Laszlo GS, et al. *Blood Rev* 28:143-53, 2014).

HuM-195/rGel представляет собой гуманизованное антитело к CD33, конъюгированное с рекомбинантным токсином гелонином. В клиническом испытании фазы I он демонстрировал весьма незначительную клиническую активность при наличии гипоксии и гипотензии в качестве факторов токсичности, ограничивающих дозу (Borthakur G, et al. *Haematologica* 98:217-21, 2013).

Линтузумаб-Ac225 (актимаб) представляет собой форму линтузумаба, конъюгированную с Ac225. Его применяли в клиническом испытании фазы I при AML. Предварительные данные демонстрировали снижение количества бластных клеток в костном мозге у 67% пациентов; однако, полная ремиссия не наблюдалась, а в качестве токсичности, ограничивающей дозу, наблюдалась тромбоцитопения 4 степени (Ravandi F, et al., *Blood* 122:1460-1460, 2013). Кроме того, сложность логистики антител, меченных радиоактивными изотопами, усиливает их недостатки.

Линтузумаб-Bi213 представляет собой другую форму линтузумаба, меченного радиоактивным изотопом. Результаты клинического испытания фазы I/II при участии пациентов с AML показали значительное снижение количества бластных клеток в костном мозге. Тем не менее, у 16% пациентов наблюдались аномалии функции печени 3/4 степени, и 10% пациентов, получавших максимальную переносимую дозу, умерли в результате лечения (Rosenblat TL, et al. *Clin Cancer Res* 16:5303-11, 2010).

AMG330 представляет собой биспецифический активатор, привлекающий T-клетки (BiTE®), состоящий из scFv антитела к CD33 и антитела к CD3, соединенных посредством линкера. *In vitro* AMG330 активирует T-клетки от пациентов с AML и способствует их размножению. *In vivo* AMG330 может за-

медлять рост подкожной опухоли AML, но не приводит к уменьшению размера опухоли (Aigner M, et al. *Leukemia* 27:1107-15, 2013). Кроме того, AMG330 спасал жизнь 50% мышей, которым инъецировали линию клеток AML человека (Friedrich M, et al. *Mol Cancer Ther* 13:1549-57, 2014). Однако, для обеспечения клинической активности была необходима ежедневная инъекция антитела в течение 26 дней ввиду небольшого размера лекарственного средства, который обуславливает короткий период полувыведения *in vivo*. В клиническое испытание фазы I (NCT02520427) в отношении лечения пациентов с рефрактерным/рецидивирующим AML начали снова набирать участников после того, как оно было приостановлено. Непрерывная инфузия лекарственного средства, которая вынуждает госпитализировать пациентов в течение нескольких недель, является недостатком данного средства.

Средства на основе антител по изобретению.

Настоящее изобретение основано на открытии того, что было бы желательно разработать полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител), которые представляют собой варианты huM195. Настоящее изобретение, в частности, относится к таким полиспецифическим средствам на основе антител (например, средства CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению содержат первый связывающий компонент на основе huM195 (т.е. компонент антитела к CD33) и второй связывающий компонент. Настоящее изобретение относится к конкретным полиспецифическим средствам на основе антител, которые содержат компонент антитела к CD33, такие как продукт слияния антитела с одноцепочечным Fv-фрагментом (scFv).

Настоящее изобретение основано на открытии того, что в по меньшей мере некоторых вариантах осуществления инъекционное полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb для парентерального введения), которое направляет поликлональные цитотоксические Т-лимфоциты на лейкозные клетки, будет представлять собой желаемое терапевтическое и/или диагностическое средство. В некоторых вариантах осуществления некоторые преимущества, предполагаемые для такого полиспецифического средства на основе антитела (например, биспецифического средства на основе антитела (BsAb), такого как средство CD33-BsAb), включают то, что оно может быть доступно для пациентов в обычных онкологических клиниках, может вводиться в амбулаторных условиях и/или может предлагаться для продажи по разумной стоимости. С учетом многих возможных платформ BsAb (Kottermann R., *MAbs* 4, 2012), тем не менее, все же существует консенсус относительно наиболее клинически эффективной концепции. Большинство конструкций биспецифических антител к CD33 и CD3 являются моновалентными по отношению к CD33 и CD3, при этом предполагается, что если средство на основе антитела представляет собой бивалентное средство на основе антитела к CD3, то неспецифическая активация Т-клеток будет клинически недопустимой (что, как считается, по меньшей мере частично обусловлено индукцией цитокинового шторма). Кроме того, ОКТ3 мыши, бивалентный IgG мыши, представлял собой первое одобренное FDA моноклональное антитело. С 1986 года он широко применялся для лечения отторжения органа после аллогенной трансплантации почки, сердца и печени. В 1996 году было обнаружено, что он является безопасным для профилактики отторжения трансплантата. Он оставался на рынке на протяжении десятилетий до совсем недавнего времени, когда более эффективные лекарственные средства сделали его устаревшим. Наиболее слабой стороной моновалентных средств является ухудшенная avidность связывания с опухолевым антигеном. Настоящее изобретение основано на открытии того, что за исключением случаев, когда аффинность одноцепочечного переменного фрагмента (scFv) является существенно улучшенной, его разница в нацеливании на опухоль по сравнению с нормальными тканями будет слабой.

Например, в некоторых вариантах осуществления для полиспецифических средств на основе антител по изобретению (например, биспецифических средств на основе антител, таких как CD33-BsAb) используется формат IgG-scFv. Полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) могут предоставлять преимущества по сравнению с существующими средствами на основе антител к CD33. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, предсчитается, что полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению обладают рядом желаемых характеристик. В некоторых вариантах осуществления такие желаемые характеристики могут включать одно или более из: (1) оптимального размера (100-200 кДа) для максимального увеличения поглощения опухолью, (2) бивалентности по отношению к опухолевой мишени для поддержания avidности, (3) каркаса, который в естественных условиях собран подобно любому IgG (с тяжелой цепью и легкой цепью) в клетках млекопитающих (например, клетках CHO), очищаемого с помощью стандартной аффинной хроматографии на белке А, (4) структурного расположения, при котором компонент антитела к CD3 делается функционально моновалентным со снижением тем самым неспецифической активации Т-клеток, (5) платформы с подтвержденной эффективностью нацеливания на опухоль в животных моделях. Кроме того, не желая ограничиваться какой-либо теорией, предсчитается, что полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению в формате IgG-scFv могут позволять обходиться без ингибирования PD1 и PDL1, которое создавало большие проблемы во всей области Т-

клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3) могут обеспечивать мобилизацию поликлональных Т-клеток посредством рецептора CD3.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению могут вызывать противоопухолевые ответы при пикомолярной EC<sub>50</sub> *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления средство CD33-BsAb согласно настоящему изобретению может индуцировать значительное (например, более 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%) уничтожение раковых клеток (например, линии раковых клеток, такой как линия клеток AML) *in vitro* при EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,01 пМ до 500 нМ. В некоторых вариантах осуществления средство CD33-BsAb согласно настоящему изобретению может индуцировать значительное (например, более 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%) уничтожение раковых клеток (например, линии раковых клеток, такой как линия клеток AML) *in vitro* при EC<sub>50</sub> в диапазоне от 0,1 пМ до 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) могут устранять рак в доклинических мышинных моделях. В некоторых вариантах осуществления средство CD33-BsAb согласно настоящему изобретению может снижать бремя рака (например, наличие раковых клеток) на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в доклинической мышинной модели. В некоторых определенных вариантах осуществления средство IgG-scFv, связывающееся с CD33 и CD3, может устранять рак в доклинической мышинной модели. В некоторых определенных вариантах осуществления средство IgG-scFv, связывающееся с CD33 и CD3, может снижать бремя рака (например, наличие раковых клеток) при миелоидном лейкозе на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в доклинической мышинной модели.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) могут устранять миелоидный лейкоз в доклинических мышинных моделях. В некоторых вариантах осуществления средство CD33-BsAb согласно настоящему изобретению может снижать бремя рака (например, наличие раковых клеток) при миелоидном лейкозе на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в доклинической мышинной модели. В некоторых определенных вариантах осуществления средство IgG-scFv, связывающееся с CD33 и CD3, может устранять миелоидный лейкоз в доклинической мышинной модели. В некоторых определенных вариантах осуществления средство IgG-scFv, связывающееся с CD33 и CD3, может снижать бремя рака (например, наличие раковых клеток) при миелоидном лейкозе на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в доклинической мышинной модели. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) являются эффективными *in vivo*. Как описано в примерах ниже, иллюстративное биспецифическое средство на основе антитела к CD33 привело к излечению у животных, несущих линии лейкозных клеток человека, *in vivo*, даже если бремя лейкоза было значительным (см. также фиг. 5-7). Это происходит, несмотря на бивалентность по отношению к CD33, при которой согласно традиционным представлениям можно было бы предсказать быстрый эндоцитоз и утрату антигена с поверхности опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) могут снижать бремя экстрамедуллярного лейкоза в доклинических мышинных моделях. В некоторых вариантах осуществления средство CD33-BsAb согласно настоящему изобретению может снижать бремя экстрамедуллярного лейкоза (например, наличие раковых клеток) на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в доклинической мышинной модели. В некоторых определенных вариантах осуществления средство IgG-scFv, связывающееся с CD33 и CD3, снижает бремя экстрамедуллярного лейкоза в доклинической мышинной модели. В некоторых определенных вариантах осуществления средство IgG-scFv, связывающееся с CD33 и CD3, может снижать бремя экстрамедуллярного лейкоза (например, наличие раковых клеток) на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% в доклинической мышинной модели.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению содержат одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv) гуманизированного антитела ОКТ3 к CD3 (huОКТ3), слитый с карбоксильным концом легкой цепи IgG1.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела, связывающееся с CD33, представляет собой гуманизированное антитело M195. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело M195 содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями CDR тяжелой цепи M195 (CDR1, CDR2 и CDR3), привитыми на каркасную область человека, такую как IGHV1-3\*01 и IGHJ4\*01. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное анти-

тело M195 содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями CDR легкой цепи M195, привитыми на каркасную область человека, такую как IGKV3D11\*02 и IGKJ4\*01. Иллюстративные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи гуманизированного M195 приведены ниже.

SEQ ID NO: 1 – вариабельная область H1

EVQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVKQAHGQSLEWIGYIYP  
YNGGTGYNQKFKSKATLTVDNSASTAYMEVRSLSLSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO: 2 – вариабельная область H2

EVQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVRQAHGQSLEWIGYIYP  
YNGGTGYNQKFKSRATLTVDNSASTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQG  
TLVTVSS

SEQ ID NO: 3 – вариабельная область L1

EIVLTQSPATLSVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQPPKLLIYAAS  
NQGSGVPARFSGSGGTDFLTITHPMEEDDTAMYFCQSQKEVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 4 – вариабельная область L2

EIVLTQSPATLSVSLGERATISCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQPPRLIYAAS  
NQGSGVPARFSGSGPGTDFLTITSSMEPEDFAMYFCQSQKEVPWTFGGGTKLEIK

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит тяжелую цепь антитела к CD33, где вариабельная область тяжелой цепи антитела к CD33 содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит вариабельный домен легкой цепи антитела к CD33, содержащий последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления CD33-BsAb согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь и слитый полипептид на основе легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 1 или 2, и где часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 3 или 4.

В некоторых вариантах осуществления CD33-BsAb согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 24, и часть слитого полипептида, представляющую собой легкую цепь, содержащую последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 26.

SEQ ID NO: 5 – последовательность кДНК Н1 (лидерная последовательность подчеркнута)

atgggctgctcctgcatcatcctgtttctggtgctaccgccaccggcgaggtgcagctgcagcagcttgaccggaggtcgtg  
 aagcctggcgcctccgtgaagatctctgcaaggcctccggtacacctaccgactacaacatgactgggtcaagcagccaccggtg  
 cagtcctggaatgagctgctacatctaccctacaacggcggcaccggctacaaccagaagttcaagttcaagccaccctgaccgtg  
 gacaactcgcctccaccgctacatggaagtgcggtccctgacctctgaggacaccggctgfactactgcccagagcagaccggc  
 catgactattggggccaggcaccctcgtgaccgtgctctgcttctaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaaga  
 gcaccttggggcacagcggcctgggctgctgtcaaggactactccccgaaccggtaggggtgctggaactcagggcctctg  
 accagcggcgtgacaccttccggcctctacagctcctcagacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagctgg  
 gcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactc  
 acacatgccaccgtgcccagacctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctc  
 ccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtgactgtgacggcgtggagg  
 tgcataatgcaagacaagccgcccggagagcagtagacaacagcagctaccgtggtgtagcgtctcaccgtctgcaccaggactgg  
 ctgaatggcaagagtagacaagtcaaggtctcaacaagcccctccagccccatcgagaaaaacatctcaaaagcaaaaggcagcc  
 ccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaaagcttcta  
 tccagcgacatcgccgtggagtgagcaatgggagcgggagacaactacaagaccacgctcccgtgctgactccgacggc  
 tcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgca  
 caacctacacgcagaagagccttccctgtctccgggtaaatga

SEQ ID NO: 6 – последовательность кДНК Н2 (лидерная последовательность подчеркнута)

atgggctgctcctgcatcatcctgtttctggtgctaccgccaccggcgaggtgcagctggtcagcttgaccggaggtcgtg  
 aagcctggcgcctccgtgaagatctctgcaaggcctccggtacacctaccgactacaacatgactgggtcgcagcagccaccggtg  
 cagtcctggaatgagctgctacatctaccctacaacggcggcaccggctacaaccagaagttcaagttcggccaccctgaccgtg  
 gacaactcctctaccgctacatggaagtgtctccctgagatccgagacaccggctgfactactgcccagagcagaccggc  
 atgactattggggccaggcaccctcgtgaccgtgcttagccttctaccaaggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaaga  
 gcaccttggggcacagcggcctgggctgctgtcaaggactactccccgaaccggtaggggtgctggaactcagggcctctg  
 accagcggcgtgacaccttccggcctctacagctcctcagacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgcccctccagcagctgg  
 gcaccagacctacatctgcaactggaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagagagttgagcccaaatctgtgacaaaactc  
 acacatgccaccgtgcccagacctgaactcctgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctc  
 ccggaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagttcaactgtgactgtgacggcgtggagg  
 tgcataatgcaagacaagccgcccggagagcagtagacaacagcagctaccgtggtgtagcgtctcaccgtctgcaccaggactgg  
 ctgaatggcaagagtagacaagtcaaggtctcaacaagcccctccagccccatcgagaaaaacatctcaaaagcaaaaggcagcc  
 ccgagaaccacaggtgtacacctgccccatccccggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctgcaaaagcttcta  
 tccagcgacatcgccgtggagtgagcaatgggagcgggagacaactacaagaccacgctcccgtgctgactccgacggc  
 tcttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgatgaggtctgca  
 caacctacacgcagaagagccttccctgtctccgggtaaatga

SEQ ID NO: 7 – последовательность кДНК L1 (лидерная последовательность подчеркнута)

atgggctgctcctgcatcatcctgtttctggtgctaccgccaccggcgagatcgtgctgactcagctcctgccaccctgtccgt  
 gtccctgggccagagaccacctctctgagagcctccgagtcctggacaactacggcatctctctatgactggttccagcagaag  
 cccggccagcccccaagctgctgatctaccgcttccaatcagggtctggcgtgcccctagatctccgctctgctctggcaccg  
 acttaccctgacctccaccctatggaagagggacgacaccgcatgtacttttccagcagtcacaagaggtgccctggaccttggcgg  
 aggcaccaagctggaatcaagcggaccgtggccgctcctccgtgttcatcttcccacttccgacgagcagctgaagtccggcaccgc  
 ttctgctgctgctgctgcaacaacttctacccccgcgagccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgtagccggcaactccca  
 ggaatcctgtagcagcagactccaaggacagcactactcctctcctcctaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcaca  
 ggtgtacgctgcaagtgaccaccaggcctgtctagccccgtgaccaagctttcaaccggggcagtgctag

SEQ ID NO: 8 – последовательность кДНК L2 (лидерная последовательность подчеркнута)

atgggctgctcctgcatcatcctgtttctggtgctaccgccaccggcgagatcgtgctgactcagctcctgccaccctgtccgt  
 gtccctggcgcagagaccacctctctgagagcctccgagtcctggacaactacggcatctctctatgactggttccagcagaag  
 cccggccagcctcctcctgctgctgatctaccgcttccaatcagggtctggcgtgcccctagatctccggatctgcccctggcaccg  
 actttaccctgacctctctccatggaaccggagacttcccatgtacttttccagcagtcacaagaggtgccctggaccttggcggag  
 gcaccaagctggaatcaagcggaccgtggccgctcctccgtgtctcttcccacttccgacgagcagctgaagtccggcaccgctt  
 tctgctgctgctgctgcaacaacttctacccccgcgagccaaggtgcagtggaaggtggacaacgccctgtagtccgcaactccagga  
 atcctgtagcagcagactccaaggacagcactactcctctcctcaccctgacctgagcaagccgactacgagaagcacaagg  
 tftacgctgcaagtgaccaccaggcctgtctagccccgtgaccaagctttcaaccggggcagtgctag

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит тяжелую цепь антитела к CD33, где переменная область тяжелой цепи антитела к CD33 кодируется последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит переменный домен легкой цепи антитела к CD33, кодируемый последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 7 или 8.

В некоторых вариантах осуществления CD33-BsAb согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь и слитый полипептид на основе легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи кодируется последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 5 или 6, и где часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, кодируется последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 7 или 8.

В некоторых вариантах осуществления CD33-BsAb согласно настоящему изобретению содержит тяжелую цепь, кодируемую последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 23, и часть слитого полипептида, представляющую собой легкую цепь, кодируемую последовательностью, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела содержит моноклональное антитело к CD33, содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD33 представляет собой гуманизованное антитело M195. Иллюстративные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи гуманизованного M195 приведены ниже.

SEQ ID NO: 9 – последовательность тяжелой цепи (H2)

EVQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVRQAHGQSLEWIGYIYP  
YNGGTGYNQKFKSRATLTVDNSASTAYMEVSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQG  
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF  
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKREPKSCDKTHTCPPCP  
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT  
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ  
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 10 – последовательность легкой цепи (L2)

EIVLTQSPATLSVSLGERATISCRASESDNYGISFMNWFQQKPGQPPRLLIYAAS  
NQGSGVPARFSGSGPGTDFLTISSEMPEDFAMFYCQQSKEVPWTFGGGKLEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит тяжелую цепь и слитый полипептид на основе легкой цепи, где тяжелая цепь содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 9, и где часть слитого полипептида, представляющая собой легкую цепь, содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела содержит моноклональное антитело (например, моноклональное антитело huCD33) и scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv слит (т.е. ковалентно связан) с легкой цепью моноклонального антитела (например, моноклонального антитела huCD33). В некоторых вариантах осуществления scFv слит с C-концом легкой цепи моноклонального антитела (например, моноклонального антитела huCD33). В некоторых вариантах осуществления scFv непосредственно слит с C-концом легкой цепи моноклонального антитела (например, моноклонального антитела huCD33). В некоторых вариантах осуществления scFv ковалентно

связан с С-концом легкой цепи моноклонального антитела (например, моноклонального антитела huCD33) посредством линкерной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела содержит две тяжелые цепи и два слитых полипептида. В некоторых вариантах осуществления две тяжелые цепи являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления два слитых полипептида являются идентичными. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела по изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) содержит две идентичные тяжелые цепи и два идентичных слитых полипептида на основе легких цепей. Такие полиспецифические средства на основе антител с двумя идентичными тяжелыми цепями и двумя идентичными слитыми полипептидами на основе легких цепей будут тетравалентными, проявляя двухвалентное связывание с каждой мишенью (например, двухвалентность по отношению к каждому из CD33 и второй мишени). В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит легкую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv, V<sub>H</sub>H или любым другим связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления слитые полипептиды содержат легкую цепь иммуноглобулина, слитую с scFv.

В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению дополнительно содержит линкер. Из уровня техники известно большое количество линкеров, в том числе, например, линкеры Gly-Ser (например, линкеры GGGGS). В некоторых вариантах осуществления слитый полипептид содержит в направлении от N-конца к С-концу легкую цепь иммуноглобулина, линкер и scFv. Состав и длина линкера могут варьироваться в соответствии с необходимостью.

В некоторых конкретных вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) или их последовательности могут содержать варибельный домен антитела к CD33 и другой связывающий домен, такой как домен, который связывается с компонентом на Т-клетках (например, CD3), домен, который связывается с органическим или неорганическим соединением (например, комплексом бензил-DOТА/металл), и т.д. В некоторых конкретных вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител по изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) или их последовательности могут содержать варибельный домен антитела к CD33 и другой связывающий домен, в том числе связывающий домен антитела ОКТ3 для переориентации Т-клеток на цитотоксичность в отношении опухоли, или домен С825, связывающийся с комплексом бензил-DOТА/металл, для многостадийного предварительного нацеливания, или связывающий домен антитела к CD137 клона 35 для ADCC с scFv, связывающимся с 4-1ВВ, в качестве агониста, или CD137L, 4-1ВВL для ADC с 4-1ВВL в качестве агониста.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела представляет собой биспецифическое средство на основе антитела, которое содержит связывающий домен антитела к CD33 и связывающий домен антитела к CD3. В некоторых вариантах осуществления связывающий домен антитела к CD3 представляет собой scFv. Иллюстративные последовательности scFv антитела к CD3 приведены ниже.

SEQ ID NO: 11 – scFv huOKT3 без дисульфидной связи

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKGLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCSASSVSVMNWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQP  
EDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR

SEQ ID NO: 12 – scFv huOKT3 с линкером из 5 аминокислот

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSVSVMNWWYQQTPGKAPKR  
WIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQIT  
R

SEQ ID NO: 13 – scFv huOKT3 с линкером из 10 аминокислот

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSVSVMNWWYQQTPG  
KAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCG  
TKLQITR

SEQ ID NO: 14 – scFv huOKT3 с линкером из 15 аминокислот

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSVSVMNWWY  
QQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQQWSSNP  
FTFGCGTKLQITR

SEQ ID NO: 15 – scFv huOKT3 с линкером из 20 аминокислот

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASSVSVM  
NWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATYYCQQW  
SSNPFTFGCGTKLQITR

SEQ ID NO: 16 – scFv huOKT3 с линкером из 25 аминокислот

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSA  
SSVSVMNWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQPEDIATY  
YCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR

SEQ ID NO: 17 – scFv huOKT3 с линкером из 30 аминокислот

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCSASSVSVMNWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQP  
EDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR

SEQ ID NO: 27 – scFv huOKT3 с дисульфидной связью

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGKCLEWIGYINP  
SRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRLPEDTGVYFCARYYDDHYSLDYWG  
QGTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRV  
TITCSASSVSVMNWWYQQTPGKAPKRWIYDTSKLAGVPSRFRSGSGSGTDYFTISSLQP  
EDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR

В некоторых вариантах осуществления CD33-BsAb согласно настоящему изобретению содержит слитый полипептид на основе легкой цепи, где слитый полипептид на основе легкой цепи содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична любой из SEQ ID NO: 11-17 и 27.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела представляет собой биспецифическое средство на основе антитела, которое содержит связывающий домен антитела к CD33 и связывающий домен антитела к бензил-DOТА. Такие биспецифические средства на основе антител можно применять, например, в радиоиммунотерапии с предварительным нацеливанием (PRIT). В некоторых вариантах осуществления биспецифические средства на основе антител (например, средства на основе антител к CD33 и антител к бензил-DOТА) можно применять на первой стадии многостадийного предварительного нацеливания с последующим очищением крови с помощью конъюгата бензил-DOТА (металл)-декстран в качестве очищающего средства и введением на третьей стадии терапевтических средств, конъюгированных с комплексом бензил-DOТА (металл), таких как конъюгаты бензил-DOТА (металл)-радиоактивный металл, бензил-DOТА (металл)-наночастицы, бензил-DOТА (металл)-липосомы, бензил-DOТА (металл)-лекарственные средства, бензил-DOТА (металл)-ДНК, бензил-DOТА (металл)-РНК и бензил-DOТА (металл)-токсины. Поскольку С825 характеризуется разными значениями аффинности по отношению к каждому типу комплексов бензил-DOТА/металл, аффинность предварительно нацеливаемого С825 по отношению к очищающему средству и конъюгату бензил-DOТА-лиганд можно точно контролировать. Иллюстративные последовательности слитого полипептида на основе scFv, связывающегося с бензил-DOТА, и слитого полипептида на основе легкой цепи антитела к CD33 и scFv антитела к бензил-DOТА приведены ниже.

SEQ ID NO: 18 – С825–VH–(G4S)6–VL

SHVKLQESGPGGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWS  
GGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARRGSYPYNYFDAWG  
CGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVVIQESALTPPETVT  
LTCGSSTGAVTASNANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFSGSLIGDKAALTI  
GTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG

SEQ ID NO: 19 – (CD33–VL–CL–(G4S)3 мыши–С825–VH–(G4S)6–VL)

MGWSCIIIFLVATATGEIVLTQSPATLSVSLGERATISCRASESDNYGISFMNWF  
QKPGQPPRLLIYAASNQSGVPPARFSGSGPGTDFLTISSMEPEDFAMYFCQKSKEVPW  
TFGGGKTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
TSGGGGSGGGGSGGGGSHVKLQESGPGGLVQPSQSLTCTVSGFSLTDYGVHWVRQSP  
GKGLEWLGVIWSGGGTAYNTALISRLNIYRDNSKNQVFLEMNSLQAEDTAMYYCARR  
GSYPYNYFDAWGCGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAVVIQ  
ESALTPPETVTLTCGSSTGAVTASNANWVQEKPDHCFTGLIGGHNNRPPGVPARFS  
GSLIGDKAALTIAGTQTEDEAIYFCALWYSDHWVIGGGTRLTVLG

В некоторых вариантах осуществления CD33-BsAb согласно настоящему изобретению содержит слитый полипептид на основе легкой цепи, где слитый полипептид на основе легкой цепи содержит последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 50% (например, на по меньшей мере приблизительно 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 18 или 19.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как средства CD33-BsAb) содержат вариант Fc-области, где указанный вариант Fc-области содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно Fc-области дикого типа. В определенных вариантах осуществления модификации Fc-области могут включать без ограничения модификации, которые изменяют эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления варианты Fc-области содержат одну или более сконструированных гликоформ, т.е. углеводных структур, ковалентно присоединенных к молекуле, содержащей Fc-область, где указанная углеводная структура химически отличается от таковой у исходной молекулы, содержащей Fc-область.

Иллюстративные тяжелые цепи CD33 с вариантами последовательностей Fc-областей приведены ниже.

SEQ ID NO: 20 – тяжелые цепи CD33 с сайленсингом Fc-областей с использованием специфических мутаций (LALA)

MGWSCIIIFLVATATGEVQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVR  
 QAHGQSLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSRATLTVDNSASTAYMEVSSLRSEDVAVYYC  
 ARGRPAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV  
 EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 – тяжелые цепи CD33 с сайленсингом Fc-областей с использованием специфических мутаций (LALA+K322A)

MGWSCIIIFLVATATGEVQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVR  
 QAHGQSLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSRATLTVDNSASTAYMEVSSLRSEDVAVYYC  
 ARGRPAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV  
 EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22 – тяжелые цепи CD33 с сайленсингом Fc-областей с использованием специфических мутаций (D265A)

MGWSCIIIFLVATATGEVQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVR  
 QAHGQSLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSRATLTVDNSASTAYMEVSSLRSEDVAVYYC  
 ARGRPAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
 SWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV  
 EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKF  
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI  
 EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
 KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как средства CD33-BsAb) имеют модифицированные сайты гликозилирования, предпочтительно без изменения функциональных возможностей антитела, например, активности связывания с мишенями. В рамках изобретения, "сайты гликозилирования" содержат любую специфическую аминокислотную последовательность антитела, к которой будут специфично и ковалентно присоединяться олигосахариды (т.е. углеводы, содержащие два или более простых сахаров, связанных друг с другом). Боковые цепи олигосахаридов, как правило, связаны с остовом антитела посредством N- либо O-связей. N-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного компонента к боковой цепи аспарагинового остатка. O-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридного компонента к гидроксикампонокислоте, например, серину, треонину. Fc-гликоформа hu3F8-H1L1-IgG1n, в которой отсутствовали определенные олигосахариды, в том числе фукоза и концевой N-ацетилглюкозамин, была получена в определенных клетках CHO (и в вариантах CHO, в том числе CHO-s, CHO-K1 и т.д.) и проявляла усиленную эффекторную функцию ADCC.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает способы модификации содержания углеводов в антителе согласно настоящему изобретению путем добавления или удаления сайта гликозилирования. Способы модификации содержания углеводов в антителах хорошо известны из уровня техники и охватываются настоящим изобретением, см., например, патент США № 6218149; EP 0359096 B1; публикацию заявки на патент США № US 2002/0028486; WO 03/035835; публикацию заявки на патент США № 2003/0115614; патент США № 6218149; патент США № 6472511; все из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. В других вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает способы модификации содержания углеводов в антителе согласно настоящему изобретению путем удаления одного или более эндогенных углеводных компонентов антитела. В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает удаление сайта гликозилирования Fc-области антитела путем модификации положения 297 с заменой аспарагина на аланин. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb) содержит мутацию N297A в домене CH2. В некоторых вариантах осуществления

мутация N297A приводит к агликозильрованию, что ослабляет связывание с FcR или C1q. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A и мутацию K322A. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A и мутацию D265A. В некоторых вариантах осуществления средство на основе антитела содержит тяжелую цепь, содержащую Fc-область, содержащую мутацию N297A, мутацию D265A и мутацию K322A.

Сконструированные гликоформы могут быть применимыми для разнообразных целей, в том числе без ограничения для усиления или ослабления эффекторной функции. Сконструированные гликоформы можно получать с помощью любого способа, известного специалисту в данной области, например, посредством применения сконструированных или вариантных экспрессирующих штаммов, посредством совместной экспрессии с одним или более ферментами, например, N-ацетилглюкозаминилтрансферазой DI III (GnT-III), посредством экспрессии молекулы, содержащей Fc-область, в различных организмах или линиях клеток из различных организмов или посредством модификации углевода(углеводов) после экспрессии молекулы, содержащей Fc-область. Способы получения сконструированных гликоформ известны из уровня техники и включают без ограничения способы, описанные в Umana et al., 1999, *Nat. Biotechnol* 17:176-180; Davies et al., 2001 *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields et al., 2002, *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, *J Biol Chem* 278:3466-3473; патенте США № 6602684; заявке на патент США с регистрационным № 10/277370; заявке на патент США с регистрационным № 10/113929; PCT WO 00/61739 A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954 A1; технологии POTILLEGENT™ (Biowa, Inc., Принстон, Нью-Джерси); технологии инженерии гликозильрования GLYCOMAB™ (GLYCART Biotechnology AG, Цюрих, Швейцария); каждая из которых полностью включена в настоящее описание посредством ссылки. См., например, WO 00061739; EA 01229125; US 20030115614; Okazaki et al., 2004, *JMB*, 336: 1239-49, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

Фрагменты полипептидов согласно настоящему изобретению включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты в дополнение к специфическим фрагментам антител, обсуждаемым в других местах в настоящем описании.

Варианты полиспецифических средств на основе антител, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, включают полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями вследствие аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут встречаться в природе или не являться встречающимися в природе. Варианты, не встречающиеся в природе, могут быть получены с использованием известных из уровня техники методик мутагенеза или неприродных аминокислот. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления.

Также в качестве "производных" включены такие полипептиды, которые содержат одно или более встречающихся в природе аминокислотных производных двадцати стандартных аминокислот. Например, пролин может быть заменен 4-гидроксипролином; лизин может быть заменен 5-гидроксилизинном; гистидин может быть заменен 3-метилгистидином; серин может быть заменен гомосерином; и лизин может быть заменен орнитинном.

Аминокислотные последовательности, которые являются по существу такими же, как последовательности, описанные в настоящем изобретении, включают последовательности, содержащие консервативные аминокислотные замены, а также аминокислотные делеции и/или вставки. Консервативная аминокислотная замена относится к замещению первой аминокислоты второй аминокислотой, которая обладает химическими и/или физическими свойствами (например, зарядом, структурой, полярностью, гидрофобностью/гидрофильностью), аналогичными таковым у первой аминокислоты. Консервативные замены включают замещение одной аминокислоты другой в пределах следующих групп: лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H); аспартат (D) и глутамат (E); аспарагин (N), глутамин (Q), серин (S), треонин (T), тирозин (Y), K, R, H, D и E; аланин (A), валин (V), лейцин (L), изолейцин (I), пролин (P), фенилаланин (F), триптофан (W), метионин (M), цистеин (C) и глицин (G); F, W и Y; C, S и T.

Разумеется, количество аминокислотных замен, которые будет производить специалист в данной области, зависит от многих факторов, в том числе от описанных выше. Говоря в целом, количество аминокислотных замен, вставок или делеций для любого данного полиспецифического средства на основе антитела не будет превышать 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, как, например, 1-30, или любой диапазон или значение в нем, как указано в настоящем изобретении.

Аминокислоты в полиспецифическом средстве на основе антитела согласно настоящему изобретению, которые являются существенными для функции, можно идентифицировать с помощью способов, известных из уровня техники, таких как сайт-направленный мутагенез или аланин-сканирующий мутагенез (например, Ausubel, выше, главы 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)). В последней процедуре в каждый остаток в молекуле вводят одиночные мутации по типу замены на аланин. Полученные в результате мутантные молекулы затем тестируют в отношении биологической активности, такой как, без ограничения, связывание с CD33. Сайты, которые являются критически важными для свя-

звания антитела, также можно идентифицировать с помощью структурного анализа, такого как кристаллизация, ядерный магнитный резонанс или фотоаффинное мечение (Smith, et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) и de Vos, et al., *Science* 255:306-312 (1992)).

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител, описанные в настоящем изобретении, могут быть модифицированы посредством ковалентного присоединения органического компонента. В результате такой модификации может образовываться средство на основе антитела с улучшенными фармакокинетическими свойствами (например, увеличенным периодом полувыведения из сыворотки крови *in vivo*). Органический компонент может представлять собой линейную или разветвленную гидрофильную полимерную группу, группу жирной кислоты или группу сложного эфира жирной кислоты. В конкретных вариантах осуществления гидрофильная полимерная группа может иметь молекулярную массу от приблизительно 800 до приблизительно 120000 дальтонов и может представлять собой группу полиалкангликоля (например, полиэтиленгликоля (PEG), полипропиленгликоля (PPG)), углеводного полимера, полимера из аминокислот или поливинилпирролидона, а группа жирной кислоты или сложного эфира жирной кислоты может содержать от приблизительно восьми до приблизительно сорока атомов углерода.

Модифицированные полиспецифические средства на основе антител можно получать с помощью подходящих способов, как, например, путем реакции с одним или более модифицирующими средствами. Термин "модифицирующее средство", используемый в настоящем изобретении, относится к подходящей органической группе (например, группе гидрофильного полимера, жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты), которая содержит активирующую группу. "Активирующая группа" представляет собой химический компонент или функциональную группу, которые могут при соответствующих условиях вступать в реакцию со второй химической группой с образованием таким образом ковалентной связи между модифицирующим средством и второй химической группой. Например, аминореактивные активирующие группы включают электрофильные группы, такие как тозилатная, мезилатная, галогеновая группа (хлоридная, бромидная, фторидная, йодидная), группы N-гидроксисукцинимидиловых сложных эфиров (NHS) и т.п. Активирующие группы, которые могут вступать в реакцию с тиолами, включают, например, малеимидную, йодацетильную, акрилоильную группу, пиридилдисульфидные группы, группу тиолзамещенной 5-тио-2-нитробензойной кислоты (TNB-тиольную) и т.п. Альдегидная функциональная группа может связываться с амино- или гидразидосодержащими молекулами, и азидная группа может вступать в реакцию с группой, содержащей трехвалентный фосфор, с образованием фосфорамидатных или фосфоримидных связей. Подходящие способы введения активирующих групп в молекулы известны из уровня техники (см., например, Hernanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)). Активирующая группа может быть связана с органической группой (например, группой гидрофильного полимера, жирной кислоты, сложного эфира жирной кислоты) непосредственно или посредством линкерного компонента, например, двухвалентной группы C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, где один или более атомов углерода могут быть замещены гетероатомом, таким как атом кислорода, азота или серы. Подходящие линкерные компоненты включают, например, тетраэтиленгликоль, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-, -NH-, и это лишь некоторые из них. Модифицирующие средства, которые содержат линкерный компонент, могут быть получены, например, посредством реакции моно-Вос-алкилдиамина (например, моно-Вос-этилендиамина, моно-Вос-диаминогексана) с жирной кислотой в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) с образованием амидной связи между свободной аминогруппой и карбоксилатной группой жирной кислоты. Защитная группа Вос может быть удалена из продукта посредством обработки трифторуксусной кислотой (TFA), которая делает доступной первичную аминогруппу, которая может связываться с другой карбоксилатной группой, как описано, или может вступать в реакцию с малеиновым ангидридом, а полученный в результате продукт может циклизироваться с получением активированного малеимидного производного жирной кислоты. (См., например, Thompson, et al., WO 92/16221, содержание которого в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.)

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению характеризуются высокой аффинностью или авидностью к антигену (например, CD33). Аффинность или авидность полиспецифического средства на основе антитела по отношению к антигену можно определить экспериментально с применением любого подходящего способа. (См., например, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interaction", в *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); и способы, описанные в этом документе). Измеряемая аффинность конкретного взаимодействия антитела и антигена может варьироваться при измерении в различных условиях (например, концентрации солей, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания с антигенами предпочтительно производят с помощью стандартизированных растворов полиспецифического антитела и антигена и стандартизированного буфера, такого как буфер, описанный в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению характеризуются низкой токсичностью. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое

средство на основе антитела характеризуется способностью лечить пациентов в течение продолжительных периодов с поддающимся измерению облегчением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или приемлемая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие подходящие свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. В настоящем изобретении "низкая иммуногенность" определяется как вызывание значительных ответов с выработкой НАНА, НАСА или НАМА у менее чем приблизительно 75% или предпочтительно менее чем приблизительно 50% пациентов, получающих лечение, и/или вызывание низких титров у пациента, получающего лечение (Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994), в полном объеме включенный в настоящее описание посредством ссылки).

Нуклеиновые кислоты.

Настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим нуклеотидную последовательность, кодирующую полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению и их фрагменты. Полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb), описанные в настоящем изобретении, можно получать из молекул нуклеиновых кислот с помощью молекулярно-биологических способов, известных из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления конструкции нуклеиновых кислот содержат области, которые кодируют полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления такие полиспецифические средства на основе антител содержат VH- и/или VL-области. После идентификации и отбора антител, проявляющих желаемые свойства связывания и/или функциональные свойства, вариабельные области каждого антитела выделяют, амплифицируют, клонируют и секвенируют. Можно производить модификации в отношении нуклеотидных последовательностей VH и VL, в том числе добавления нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислоты и/или несущих сайты рестрикции, удаления нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислоты, или замены нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислоты. Антитела и/или компоненты антител могут быть получены из человеческих, гуманизированных или химерных антител.

При необходимости последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют полиспецифические средства на основе антител, описанные в настоящем изобретении (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb), можно модифицировать таким образом, чтобы они содержали кодоны, оптимизированные для экспрессии в конкретном типе клеток или организме (например, см. патент США № 5670356 и патент США № 5874304). Кодон-оптимизированные последовательности представляют собой синтетические последовательности и предпочтительно кодируют полипептид (или биологически активный фрагмент полноразмерного полипептида, обладающий по существу такой же активностью, что и полноразмерный полипептид), идентичный кодируемому исходным полинуклеотидом, не являющимся кодон-оптимизированным. В некоторых вариантах осуществления кодирующая область генетического материала, кодирующая полные или неполные компоненты антител, может содержать измененную последовательность для оптимизации частоты использования кодонов для конкретного типа клеток (например, эукариотической или прокариотической клетки). Например, последовательность, кодирующая гуманизированную вариабельную область тяжелой (или легкой) цепи, описанную в настоящем изобретении, может быть оптимизирована для экспрессии в бактериальных клетках. В качестве альтернативы, кодирующая последовательность может быть оптимизирована для экспрессии в клетке млекопитающего (например, клетке CHO). Такая последовательность может быть описана как кодон-оптимизированная последовательность.

Конструкции нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению можно встраивать в вектор экспрессии или вирусный вектор с помощью способов, известных из уровня техники, и молекулы нуклеиновых кислот могут быть функционально связаны с последовательностью, контролирующей экспрессию. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен вектор, содержащий любую из вышеописанных молекул нуклеиновых кислот или их фрагментов. Любую из вышеуказанных молекул нуклеиновых кислот или их фрагментов можно клонировать в любой подходящий вектор и можно применять для трансформации или трансфекции любого подходящего хозяина. Выбираемые векторы и способы их конструирования общеизвестны средним специалистам в данной области и описаны в общих технических источниках (см. в целом "Recombinant DNA Part D", Methods in Enzymology, Vol. 153, Wu and Grossman, eds., Academic Press (1987)). В желательном варианте вектор содержит регуляторные последовательности, такие как кодоны, иницирующие и терминирующие транскрипцию и трансляцию, которые являются специфичными для типа хозяина (например, бактерии, гриба, растения или животного), которому следует ввести вектор, в соответствии с необходимостью и с учетом того, представляет ли собой вектор ДНК или РНК. Вектор предпочтительно содержит регуляторные последовательности, которые являются специфичными для рода хозяина. Вектор наиболее предпочтительно содержит регуляторные последовательности, которые являются специфичными для вида хозяина.

В дополнение к системе репликации и встроенной нуклеиновой кислоте, конструкция может содержать один или более маркерных генов, которые обеспечивают возможность отбора трансформиро-

ванных или трансфицированных хозяев. Маркерные гены включают гены устойчивости к биоцидам, например, устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам и т.д., комплементирующие гены у ауксоτροφного хозяина для обеспечения прототрофности и т.п.

Подходящие векторы включают векторы, предназначенные для передачи по наследству и размножения или для экспрессии и/или как того, так и другого. Например, клонирующий вектор выбран из группы, состоящей из серии pUC, серии pBluescript (Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния), серии pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин), серии pGEX (Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция) и серии pEX (Clontech, Пало-Альто, Калифорния). Также можно использовать бактериофаговые векторы, такие как  $\lambda$ GT10,  $\lambda$ GT11,  $\lambda$ ZapII (Stratagene),  $\lambda$ EMBL4 и  $\lambda$ NM1149. Примеры векторов для экспрессии в растениях включают pBI110, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 и pBIN19 (Clontech). Примеры векторов для экспрессии у животных включают pEUK-C1, pMAM и pMAMneo (Clontech). Систему клонирования TOPO (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) также можно использовать в соответствии с рекомендациями производителя.

Вектор экспрессии может содержать нативный или ненативный промотор, функционально связанный с выделенной или очищенной молекулой нуклеиновой кислоты, описанной выше. Выбор промоторов, например, сильных, слабых, индуцируемых, тканеспецифических и специфичных для определенной стадии развития, находится в пределах компетенции специалиста в данной области. Аналогично, объединение молекулы нуклеиновой кислоты или ее фрагмента, описанных выше, с промотором также находится в пределах компетенции специалиста в данной области.

Подходящие вирусные векторы включают, например, ретровирусные векторы, векторы на основе парвовирусов, например, векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV), химерные векторы на основе AAV и аденовирусов и векторы на основе аденовирусов, а также лентивирусные векторы, такие как векторы на основе вируса простого герпеса (HSV). Эти вирусные векторы можно получать с использованием стандартных методик рекомбинантных ДНК, описанных, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994).

Ретровирусный вектор получают из ретровируса. Ретровирус представляет собой РНК-содержащий вирус, способный инфицировать большое разнообразие клеток-хозяев. При инфицировании геном ретровируса интегрируется в геном его клетки-хозяина и реплицируется вместе с ДНК клетки-хозяина, тем самым постоянно продуцируя вирусную РНК и любую последовательность нуклеиновой кислоты, включенную в геном ретровируса. Таким образом, при использовании ретровируса достигается долговременная экспрессия терапевтического(терапевтических) фактора(факторов). Ретровирусы, предполагаемые для использования в генной терапии, являются относительно непатогенными, хотя существуют и патогенные ретровирусы. При использовании патогенных ретровирусов, например, вируса иммунодефицита человека (HIV) или Т-клеточных лимфотропных вирусов человека (HTLV), следует соблюдать осторожность, изменяя вирусный геном, в целях устранения токсичности для хозяина. Кроме того, ретровирусный вектор можно подвергнуть манипуляциям для того, чтобы сделать вирус дефектным по репликации. Таким образом, ретровирусные векторы считаются особенно применимыми для стабильного переноса генов *in vivo*. Лентивирусные векторы, такие как векторы на основе HIV, являются иллюстративными ретровирусными векторами, используемыми для доставки генов. Известно, что векторы на основе HIV, в отличие от других ретровирусов, включают свои гены-"пассажиры" в неделящиеся клетки и, следовательно, могут находить применение в лечении персистентных форм заболевания.

К таким клонирующим и/или экспрессионным последовательностям можно добавлять дополнительные последовательности для оптимизации их функции при клонировании и/или экспрессии, для облегчения выделения полинуклеотида или для улучшения введения полинуклеотида в клетку. Использование клонирующих векторов, векторов экспрессии, адаптеров и линкеров хорошо известно из уровня техники. (См., например, Ausubel, выше или Sambrook, выше).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты и векторы согласно настоящему изобретению могут быть выделены и/или очищены. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей вышеописанную выделенную или очищенную молекулу нуклеиновой кислоты, необязательно в форме вектора. Композиция может содержать другие компоненты, описанные далее в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот встраивают в вектор, который способен экспрессировать полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) при введении в подходящую клетку-хозяина. Подходящие клетки-хозяева включают без ограничения клетки бактерий, дрожжей, насекомых и млекопитающих. Примеры клеток-хозяев включают клетки прокариот (например, *E.coli*) и эукариот (например, клетки COS или CHO). Клетки-хозяева, являющиеся клетками млекопитающих, которые можно применять, включают клетки HeLa 293, H9 и Jurkat человека, клетки NIH3T3 и C127 мыши, Cos 1, Cos 7 и CV 1, клетки QC1-3 перепела, L-клетки мыши и клетки яичника китайского хомячка (CHO) (например, клетки DG44). Любой(любые) способ(способы) встраивания фрагментов ДНК в вектор, известные спе-

циалисту в данной области, можно применять для конструирования векторов экспрессии, кодирующих полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) под контролем сигналов контроля транскрипции/трансляции. Эти способы могут включать получение рекомбинантных ДНК и методики синтеза *in vitro*, а также рекомбинацию *in vivo* (см. Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

Получение средств на основе антител.

Полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) можно очищать с помощью любой методики, которая обеспечивает возможность последующего образования стабильного средства на основе антитела. Например, не желая ограничиваться какой-либо теорией, считается, что полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb) можно извлекать и очищать из культур рекомбинантных клеток с помощью хорошо известных способов, включающих без ограничения очистки с помощью белка А, очистку с помощью белка G, осаждение сульфатом аммония или этанолом, экстрагирование кислотой, анионообменную или катионообменную хроматографию, хроматографию на фосфоцеллюлозе, хроматографию гидрофобных взаимодействий, аффинную хроматографию, хроматографию на гидроксипатите и лектиновую хроматографию. Для очистки также можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию ("HPLC"). См., например, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, или *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001), например, главы 1, 4, 6, 8, 9 и 10, каждый из которых в полном объеме включен в настоящее описание посредством ссылки.

Полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) включают природные очищенные продукты, продукты процедур химического синтеза и продукты, полученные с помощью рекомбинантных методик из эукариотического хозяина, в том числе, например, из клеток дрожжей, высших растений, насекомых и млекопитающих. В зависимости от хозяина, используемого в процедуре рекомбинантного получения, средства на основе антител согласно настоящему изобретению могут быть гликозилированными или могут быть негликозилированными, при этом гликозилирование является предпочтительным. Такие способы описаны во многих стандартных лабораторных руководствах, таких как Sambrook, выше, разделы 17.37-17.42; Ausubel, выше, главы 10, 12, 13, 16, 18 и 20, Colligan, *Protein Science*, выше, главы 12-14, все из которых в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки.

Характеристики очищенных полиспецифических средств на основе антител (например, биспецифических средств на основе антител, таких как CD33-BsAb) можно получить, например, с помощью ELISA, ELISPOT, проточной цитометрии, иммуноцитологического анализа, анализа на BIACORE™, анализа кинетического исключения с помощью KINEXA™ от SAPIDYNE, SDS-PAGE и вестерн-блоттинга или с помощью HPLC-анализа, а также с помощью ряда других функциональных анализов, раскрытых в настоящем изобретении. Содержание всех цитируемых источников (в том числе литературных источников, выданных патентов, опубликованных заявок на патенты и заявок на патенты, одновременно находящихся на рассмотрении), цитируемых во всей настоящей заявке, настоящим явным образом включено посредством ссылки.

Композиции средств на основе антител.

Композиции согласно настоящему изобретению (например, композиции, обеспечивающие доставку полиспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb) могут содержать любое подходящее и эффективное количество композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно полиспецифическое средство на основе антитела (например, CD33-BsAb), для применения в доставке предусмотренного полиспецифического средства на основе антитела (например, CD33-BsAb) в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии.

Композиции согласно настоящему изобретению (например, композиции, обеспечивающие доставку полиспецифического связывающего средства, такого как CD33-BsAb) могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из любых подходящих вспомогательных веществ, таких как без ограничения разбавитель, связующее вещество, стабилизатор, буферы, соли, липофильные растворители, консервант, адьювант или т.п. Предпочтительными являются фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. Неограничивающие примеры таких стерильных растворов и способы их получения хорошо известны из уровня техники, как, например, без ограничения, из Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990. Обычно можно выбрать фармацевтически приемлемые носители, которые являются подходящими для способа введения, растворимости и/или стабильности композиции полиспецифического средства на основе антитела (например, биспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb), его фрагмента или варианта, как хорошо известно из уровня техники или как описано в настоящем изобретении.

Фармацевтические наполнители и добавки, которые могут быть использованы в композиции согласно настоящему изобретению, включают, без ограничения, белки, пептиды, аминокислоты, липиды и углеводы (например, сахара, в том числе моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как альдиты, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п.; а также полисахариды или полимеры сахаров), которые могут присутствовать в отдельности или в комбинации, составляя в отдельности или в комбинации 1-99,99% по весу или объему. Примеры белковых наполнителей включают сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин (HSA), рекомбинантный человеческий альбумин (гНА), желатин, казеин и т.п. Типичные аминокислотные компоненты/компоненты антител, которые также могут функционировать, обеспечивая буферную емкость, включают аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т.п. Одной предпочтительной аминокислотой является глицин.

Углеводные наполнители, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают, например, моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т.п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как раффиноза, мелицитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п., и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозит и т.п. В некоторых вариантах осуществления углеводные наполнители для применения в настоящем изобретении представляют собой маннит, трегалозу и раффинозу.

Композиции (например, композиции, обеспечивающие доставку полиспецифического средства на основе антитела, такого как CD33-BsAb) также могут содержать буфер или средство для регулирования уровня pH; при этом буфер обычно представляет собой соль, полученную из органической кислоты или основания. Типичные буферы включают соли органических кислот, такие как соли лимонной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, угольной кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты, уксусной кислоты или фталевой кислоты; трис, гидрохлорид трометамин или фосфатные буферы. Предпочтительными буферами для использования в композициях согласно настоящему изобретению являются соли органических кислот, такие как цитрат.

Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению (например, композиции, обеспечивающие доставку полиспецифического связывающего средства, такого как CD33-BsAb) могут содержать полимерные наполнители/добавки, такие как поливинилпирролидоны, фикоиллы (полимерные сахара), декстраты (например, циклодекстрины, такие как 2-гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин), полиэтиленгликоли, вкусоароматические добавки, противомикробные средства, подсластители, антиоксиданты, антистатические средства, поверхностно-активные вещества (например, полисорбаты, такие как "TWEEN 20" и "TWEEN 80"), липиды (например, фосфолипиды, жирные кислоты), стероиды (например, холестерин) и хелатообразователи (например, EDTA).

Эти и дополнительные известные фармацевтические наполнители и/или добавки, подходящие для использования в композициях, содержащих полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb), его части или варианты, известны из уровня техники, например, как указано в "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995) и в "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, N.J. (1998), раскрытие которых в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки. Предпочтительными материалами-носителями или материалами-наполнителями являются углеводы (например, сахара и альдиты) и буферы (например, цитрат) или полимерные средства.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb), составлена в стабильной форме. В некоторых вариантах осуществления стабильный состав полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) может содержать фосфатный буфер с соевым раствором или выбранной солью, а также растворы с добавлением консервантов и составы, содержащие консервант, а также составы многократного использования с добавлением консервантов, подходящие для фармацевтического или ветеринарного применения. Составы с добавлением консервантов содержат по меньшей мере один известный консервант, необязательно выбранный из группы, состоящей из по меньшей мере одного из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, фенилмеркурнитрита, феноксиэтанола, формальдегида, хлорбутанола, хлорида магния (например, гексагидрата), алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей в водном разбавителе. Можно использовать любую подходящую концентрацию или смесь, известную из уровня техники, как, например, 0,001-5%, или любой диапазон или значение в нем, как, например, без ограничения, 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, или любой диапазон или значение в нем. Неограничивающие примеры включают отсутствие консерванта, 0,1-2% м-крезола (например, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензилового спирта (например, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-5% тимеросала (например, 0,005, 0,01), 0,001-2,0% фенола (например, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% ал-

килпарабена(алкилпарабенов) (например, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) и т.п.

Как указано выше, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к изделию, которое содержит упаковочный материал и по меньшей мере один флакон, содержащий раствор по меньшей мере одного полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) с соответствующими буферами и/или консервантами, необязательно в водном разбавителе, где указанный упаковочный материал содержит этикетку, на которой указано, что такой раствор можно хранить в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 ч или больше. Настоящее изобретение дополнительно относится к изделию, содержащему упаковочный материал, первый флакон, содержащий по меньшей мере одно лиофилизированное полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb), и второй флакон, содержащий водный разбавитель для предписанного буфера или консерванта, где указанный упаковочный материал содержит этикетку, на которой приведены инструкции по разведению по меньшей мере одного полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) в водном разбавителе с образованием раствора, который можно хранить в течение периода двадцати четырех часов или больше.

В некоторых вариантах осуществления водный разбавитель дополнительно содержит фармацевтически приемлемый консервант. В некоторых вариантах осуществления консерванты могут быть выбраны из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей. Концентрация консерванта, используемого в составе, является концентрацией, достаточной для достижения противомикробного эффекта. Такие концентрации зависят от выбранного консерванта и легко определяются специалистом в данной области.

К разбавителю можно необязательно добавлять другие наполнители, например, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, усилители действия консервантов. Изотоническое средство, такое как глицерин, широко используется при известных концентрациях. Можно добавлять физиологически переносимый буфер для обеспечения улучшенного контроля pH. Составы могут охватывать широкий диапазон значений pH, как, например, от приблизительно pH 4 до приблизительно pH 10, и при этом предпочтительным является диапазон от приблизительно pH 5 до приблизительно pH 9, и при этом наиболее предпочтительным является диапазон от приблизительно 6,0 до приблизительно 8,0. В некоторых вариантах осуществления составы согласно настоящему изобретению имеют pH от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,8. В некоторых вариантах осуществления буферы включают фосфатные буферы, такие как фосфат натрия, в частности фосфатно-солевой буферный раствор (PBS).

В составы или композиции можно необязательно добавлять другие добавки, такие как фармацевтически приемлемые солюбилизаторы, такие как Tween 20 (полиоксиэтилен-(20)-сорбитанмонолаурат), Tween 40 (полиоксиэтилен-(20)-сорбитанмонопальмитат), Tween 80 (полиоксиэтилен-(20)-сорбитанмоноолеат), Pluronic F68 (блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена) и PEG (полиэтиленгликоль), или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбат 20 или 80 или полксамер 184 или 188, полиолы PLURONIC®, другие блок-сополимеры, и хелатообразователи, такие как EDTA и EGTA, для снижения агрегации. Эти добавки могут быть особенно применимыми, если для введения состава используется насос или пластмассовый контейнер. Наличие фармацевтически приемлемого поверхностно-активного вещества может приводить к уменьшению склонности белка (например, средства CD33-BsAb) в композиции к агрегации.

В некоторых вариантах осуществления составы согласно настоящему изобретению можно получать с помощью способа, который включает смешивание по меньшей мере одного полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) и консерванта, выбранного из группы, состоящей из фенола, м-крезола, п-крезола, о-крезола, хлоркрезола, бензилового спирта, алкилпарабена (метил-, этил-, пропил-, бутил- и т.п.), хлорида бензалкония, хлорида бензетония, дегидроацетата натрия и тимеросала или их смесей в водном разбавителе. Смешивание по меньшей мере одного полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) и консерванта в водном разбавителе можно осуществлять с помощью традиционных процедур растворения и смешивания. В некоторых вариантах осуществления получение подходящего состава может включать, например, объединение измеренного количества по меньшей мере одного средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb) в буферном растворе с необходимым консервантом в количествах, достаточных для получения необходимых концентраций белка и консерванта. Видоизменения этого способа будут известны среднему специалисту в данной области. Например, все из порядка добавления компонентов, независимо от того, используются ли дополнительные добавки, температуры и pH, при которых получают состав, являются факторами, которые можно оптимизировать в соответствии с концентрацией и используемыми способами введения.

В некоторых вариантах осуществления составы предоставляются пациентам в виде чистого раствора или в виде двух флаконов, включающих флакон с по меньшей мере одним лиофилизированным полиспецифическим средством на основе антитела (например, средством CD33-BsAb), которое разводят с помощью содержимого второго флакона, содержащего воду, консервант и/или наполнители, такие как

фосфатный буфер и/или солевой раствор и выбранная соль, в водном разбавителе.

В некоторых вариантах осуществления изделие, содержащее полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb), содержит упаковочный материал. В некоторых вариантах осуществления на упаковочном материале в дополнение к информации, требуемой регуляторными органами, приведены условия, при которых можно применять продукт. В некоторых вариантах осуществления на упаковочном материале приведены инструкции по разведению полиспецифического средства на основе антитела (например, средства CD33-BsAb).

В некоторых вариантах осуществления композиции составлены для парентерального введения. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, средство CD33-BsAb) составлено в виде раствора, суспензии, эмульсии или лиофилизированного порошка, предоставляемых вместе с фармацевтически приемлемой основой для парентерального введения или отдельно от нее. Примерами таких основ являются вода, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 1-10% человеческий сывороточный альбумин. Можно также использовать липосомы и неводные основы, такие как нелетучие масла. Основа или лиофилизированный порошок могут содержать добавки, которые поддерживают изотоничность (например, хлорид натрия, маннит) и химическую стабильность (например, буферы и консерванты). В некоторых вариантах осуществления состав стерилизуют с помощью известных или подходящих методик.

Настоящее изобретение также относится, помимо прочего, к технологиям для получения характеристик полиспецифических средств на основе антител (например, биспецифических средств на основе антител, таких как CD33-BsAb) и/или композиции, содержащие указанные полиспецифические средства на основе антител. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) и/или композиции, содержащие указанные полиспецифические средства на основе антител, характеризуются связыванием с клетками AML (например, HL60). В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, биспецифические средства на основе антител, такие как CD33-BsAb) и/или композиции, содержащие указанные полиспецифические средства на основе антител, характеризуются удержанием *in vivo* (например, периодом полувыведения из сыворотки крови *in vivo*, составляющим по меньшей мере 6 часов, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 ч или больше). В некоторых вариантах осуществления характеристики полиспецифических средств на основе антител (например, биспецифических средств на основе антител, таких как CD33-BsAb) и/или композиций, содержащих указанные полиспецифические средства на основе антител, получают с помощью ELISA, иммуногистохимического анализа, анализов связывания на *Viasoge*, масс-спектрометрии, хроматографии с изоэлектрическим фокусированием (IEF), вестерн-блоттинга и т.д.

#### Применения.

Настоящее изобретение относится к технологиям для модулирования, лечения или диагностики по меньшей мере одного заболевания, связанного с CD33, в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, как известно из уровня техники или описано в настоящем изобретении, с помощью по меньшей мере одного полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb).

Любое из полиспецифических средств на основе антител (например, CD33-BsAb), предусмотренных в настоящем изобретении, можно использовать в терапевтических способах. Например, полиспецифические средства на основе антител (например, CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению можно использовать в качестве иммунотерапевтических средств, например, при лечении форм рака.

Настоящее изобретение включает способы модулирования, лечения или диагностики по меньшей мере одного злокачественного заболевания в клетке, ткани, органе, у животного или пациента, в том числе, без ограничения, по меньшей мере одного заболевания из числа множественной миеломы, лейкоза, острого лейкоза, острого лимфобластного лейкоза (ALL) (включая В-клеточный ALL и Т-клеточный ALL), острого миелоидного лейкоза (AML), хронического миелоцитарного лейкоза (CML), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), волосатоклеточного лейкоза, миелодиспластического синдрома (MDS), лимфомы, болезни Ходжкина, злокачественной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Беркитта, множественной миеломы, саркомы Капоши, колоректальной карциномы, почечноклеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, карциномы предстательной железы, назофарингеальной карциномы, злокачественного гистиоцитоза, паранеопластического синдрома/злокачественной гиперкальциемии, солидных опухолей, форм аденокарциномы, форм саркомы, злокачественной меланомы, гемангиомы, метастатического заболевания, резорбции костной ткани, связанной с раком, боли в костях, связанной с раком; для подавления метастазирования рака; для уменьшения интенсивности проявлений раковой кaxeсии и для лечения воспалительных заболеваний, таких как мезангиальный пролиферативный гломерулонефрит и т.п. В некоторых определенных вариантах осуществления композиции и способы по изобретению можно использовать для лечения экстрамедуллярных (EM) проявлений лейкоза. Такие способы можно необязательно использовать в комбинации со средством лучевой терапии, антиангиогенным средством, химиотерапевтическим средством, ингибитором фарнезилтрансферазы или подобным, вводя его до введения, одновременно с введением или после введения таких полиспецифических средств на

основе антител (например, CD33-BsAb).

Для использования в терапевтических способах полиспецифические средства на основе антител (например, CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению составляют, дозируют и вводят в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, рассматриваемые в этом контексте, включают конкретное нарушение, лечение которого осуществляется, конкретное млекопитающее, получающее лечение, клиническое состояние отдельного пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, составление графика введения и другие факторы, известные практикующим врачам.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму, имеющему такое заболевание, терапевтически эффективного количества полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления указанному индивидууму вводят композицию, содержащую полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В некоторых вариантах осуществления заболевания представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного дополнительного терапевтического средства, например, противоракового средства, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. "Индивидуум" может являться млекопитающим, в том числе человеком.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) можно использовать в способе диагностики медицинского состояния, характеризующегося экспрессией CD33, у пациента.

Любой из таких способов может необязательно включать введение эффективного количества по меньшей мере одной композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно полиспецифическое средство на основе антитела (например, CD33-BsAb), в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении, диагностике и/или терапии.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к терапевтическим способам, включающим введение эффективного количества композиции, которая содержит полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такой как CD33-BsAb) и/или обеспечивает его доставку, пациенту, которому вводили или будут вводить IL2, таким образом, чтобы пациент получал оба из них. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам, включающим введение композиции, которая содержит IL2 и/или обеспечивает его доставку, пациенту, которому вводили или будут вводить полиспецифическое средство на основе антитела (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb), таким образом, чтобы пациент получал оба из них.

Любой способ согласно настоящему изобретению может включать способ лечения нарушения, опосредованного CD33, или нарушения, характеризующегося экспрессией CD33, включающий введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb), в клетку, ткань, орган, животному или пациенту, нуждающемуся в таком модулировании, лечении или терапии. Такой способ необязательно может дополнительно включать совместное введение или комбинированную терапию для лечения таких иммунопатологических заболеваний, где введение указанного по меньшей мере одного полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb), его определенной части или варианта дополнительно включает введение, до этого, одновременно с этим и/или после этого, по меньшей мере одного дополнительного средства.

Любой способ согласно настоящему изобретению может включать способ диагностики заболевания или нарушения, характеризующегося экспрессией CD33, включающий введение эффективного количества композиции или фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb), в клетку, ткань, орган, животному или пациенту.

Виды Т-клеточной терапии.

Способы уничтожения опухолевых клеток включают индукцию иммунного ответа, в рамках которого происходит избирательное нацеливание иммунных эффекторных клеток, таких как естественные клетки-киллеры (NK) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), на опухолевые клетки, которые они атакуют и разрушают. CTL представляют собой наиболее сильные эффекторные клетки иммунной системы, однако они не могут активироваться эффекторным механизмом, опосредованным Fc-доменом традиционных терапевтических антител.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) могут связываться первым связывающим доменом с поверхностным антигеном на клетках-мишенях и вторым связывающим доменом с активирующим инвариабельным компонентом комплекса Т-клеточного рецептора (TCR), что стало вызывать интерес в по-

следние годы. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, считается, что одновременное связывание такого средства на основе антитела с обеими его мишенями будет приводить к временному взаимодействию между клеткой-мишенью и Т-клеткой, вызывая активацию какой-либо цитотоксической Т-клетки и последующий лизис клетки-мишени. Таким образом, иммунный ответ может быть перенаправлен на клетки-мишени и не зависит от презентации антигенных пептидов клеткой-мишенью или специфичности Т-клетки, что было бы значимым для нормальной активации CTL, рестриктированной по антигенам МНС. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) активируют Т-клетки, присутствующие в организме пациента.

CTL являются превосходными эффекторами для нацеливания на опухоли, поскольку они могут мигрировать в очаги опухолей, где они могут пролиферировать и высвобождать цитокины с последующей мобилизацией врожденных воспалительных или иммунных клеток для инициирования дополнительных иммунных ответов *in vivo*, в том числе формирования новых клонов противоопухолевых CTL и В-клеток (эффект вакцинации *in vivo*), что наиболее очевидно при оценивании иммунной системы у взрослых пациентов, ранее получавших виды адоптивной Т-клеточной терапии. (Thakur A, et al., *Cancer Immunol Immunother* 60:1707-20, 2011). Например, после лечения с помощью АТС, "вооруженных" с помощью HER2-BsAb, у пациентов был выявлен эффект вакцинации против рака молочной железы и лимфомы, в том числе CTL, противодействующие раку молочной железы, антитела, противодействующие раку молочной железы, цитокиновые профили Th1-типа в сыворотке крови и уровни IL-12, превышающие исходный уровень. (Lum LG, et al., *Bone Marrow Transplant* 49:73-9, 2014; Lum LG, et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 19:925-33, 2013; Grabert RC, et al., *Clin Cancer Res* 12:569-76, 2006).

Т-клетки, "вооруженные" с помощью BsAb.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам активации и/или "вооружения" активированных Т-клеток (АТС) с помощью полиспецифических средств на основе антител согласно настоящему изобретению (например, средств на основе антител в формате антитело к CD3 x антитело к антигену-мишени, в том числе BsAb и ViTE). Такие "вооруженные" АТС сочетают специфичность нацеливания MoAb (например, huM195) с перфорин/гранзим-опосредованной цитотоксичностью Т-клеток, не рестриктированной по антигенам МНС. С помощью BsAb или ViTE можно "вооружать" размножаемые *ex vivo* активированные Т-клетки перед инфузией в организм пациента. При использовании данной стратегии каждая АТС превращается в специфическую CTL (Thakur and Lum, 2010, *Curr Opin Mol Ther* 12, 340-349; Grabert et al., 2006, *Clin Cancer Res* 12, 569-576).

Биспецифические средства на основе антител позволяют осуществлять целенаправленное привлечение Т-клеток и использование их эффекторных функций посредством CD3-опосредованной активации, не рестриктированной по HLA, а не их антигенспецифичных TCR, рестриктированных по HLA. Исследования определенных бифункциональных моноклональных антител, специфичных к CD3 и опухолевому антигену, такому как CD-19, HER-2/NEU или CEА, продемонстрировали способность этих антител связывать цитотоксические Т-клетки с опухолевыми клетками, экспрессирующими другой антиген-мишень (Bargou et al., 2008, *Science* 321, 974-977; Topp et al., 2009, *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 114, 840; Kiewe et al., 2006, *Clin Cancer Res* 12, 3085-3091; Lutterbuese et al., 2009, *J Immunother* 32, 341-352). После привлечения обоих рецепторов антител иницируется цитотоксический Т-клеточный ответ в отношении опухолевых клеток. Т-клеточный ответ предполагает образование цитотоксического синапса между Т-клеточным рецептором и опухолевой клеткой, а также перфорин- и гранзим-опосредованную индукцию апоптоза опухолевых клеток (Offner et al., 2006, *Mol Immunol* 43, 763-771; Brischwein et al., 2006, *Mol Immunol* 43, 1129-1143). При привлечении CD3 также активируются Т-клетки с индукцией пролиферации и образованием эффекторных цитокинов, которые усиливают противоопухолевый эффект (Brischwein et al., 2006, выше; Brischwein et al., 2007, *J Immunother* 30, 798-807). Удивительно, что в активированных Т-клетках повышается уровень антиапоптотического белка c-FLIP, который защищает их от цитотоксических эффектов TNF и Fas-лиганда, образующихся в ходе активации Т-клеток (Dreier et al., 2002, *Int J Cancer* 100, 690-697). В результате Т-клеточный ответ усиливается. Вследствие этого пикограммовые уровни бифункционального антитела могут оказывать значительные противоопухолевые эффекты *in vitro* (Lutterbuese et al., 2009, выше; Brandl et al., 2007, *Cancer Immunol Immunother* 56, 1551-1563) и *in vivo*, как показано в доклинических животных моделях и, в частности, в результатах начальных клинических испытаний биспецифических средств, связывающихся с CD3/CD19, при лечении В-клеточных лимфом и ALL (Topp et al., 2009, выше; Kiewe et al., 2006, выше). Была выдвинута гипотеза, что в ходе индуцированных Т-клеточных ответов также может происходить мобилизация "необученных" Т-клеток и стимуляция образования опухолеспецифических Т-клеток в очагах опухолей (Koehne et al., 2002, *Blood* 99, 1730-1740). Биспецифические средства на основе антител также можно применять для переориентации других эффекторных клеток, помимо Т-лимфоцитов. Эти эффекторные клетки включают NK-клетки, В-лимфоциты, дендритные клетки, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, мезенхимальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки и другие стволовые клетки, нацеливающиеся на клетки, ткани и органы, экспрессирующие CD33. Если ткань является опухолевой, то эти эффекторные клетки можно использовать для уничтожения или для накопления белков (например, цитокинов, антител, фер-

ментов или токсинов), радиоактивных изотопов для диагностики или терапии. Если ткань является тканью нормального органа, то эффекторные клетки можно аналогичным образом использовать для доставки белков или изотопов для диагностики или терапии.

Настоящее изобретение основано на открытии того, что конкретные полиспецифические средства на основе антител согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) могут быть применимыми для "вооружения" активированных Т-клеток (АТС). В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое средство на основе антитела (например, CD33-BsAb) для применения при "вооружении" АТС может дополнительно содержать домен, который связывается с эпитопом Т-клеточного антигена. В некоторых вариантах осуществления Т-клеточный антиген представляет собой CD3. В некоторых вариантах осуществления домен, который связывается с эпитопом Т-клеточного антигена, представляет собой scFv гуманизированного ОКТ3.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам получения популяции Т-клеток, "вооруженных" полиспецифическим средством на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb). В контексте настоящего изобретения можно применять стандартные способы "вооружения" Т-клеток, известные из уровня техники. Биологическую активность полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) можно измерять с помощью различных анализов, известных из уровня техники. Формы биологической активности могут включать, например, индукцию пролиферации Т-клеток, индукцию передачи сигнала в Т-клетках, индукцию экспрессии маркеров активации в Т-клетках, индукцию секреции цитокинов Т-клетками, индукцию лизиса клеток-мишеней, таких как опухолевые клетки, индукцию регрессии опухоли и/или улучшение выживаемости. В некоторых вариантах осуществления популяция Т-клеток содержит "вооружающую" дозу полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb) в диапазоне от 0,001 нг до 100 нг на 10<sup>6</sup> цитотоксических иммунных клеток.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к композиции, содержащей популяцию Т-клеток, "вооруженных" полиспецифическим средством на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb). Не желая ограничиваться какой-либо теорией, считается, что введение полиспецифического средства на основе антитела согласно настоящему изобретению в комбинации с введением активированных Т-клеток (АТС) может усиливать терапевтический ответ. В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с АТС. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью полиспецифического средства на основе антитела (например, CD33-BsAb) включает введение композиции, которая обеспечивает доставку полиспецифического средства на основе антитела (например, CD33-BsAb), и введение композиции, которая обеспечивает доставку АТС.

Виды терапии с использованием РВМС.

В некоторых вариантах осуществления полиспецифические средства на основе антител (например, CD33-BsAb) согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с препаратом мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС). В некоторых вариантах осуществления РВМС являются аллогенными. В некоторых вариантах осуществления РВМС являются сингенными. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью полиспецифического средства на основе антитела (например, CD33-BsAb) включает введение композиции, которая обеспечивает доставку полиспецифического средства на основе антитела (например, CD33-BsAb), и введение композиции, которая обеспечивает доставку РВМС.

Т-клетки, модифицированные химерным антигенным рецептором (CAR), специфичным к CD33.

Внедрение технологии химерных антигенных рецепторов (Sadelain M, et al., *Cancer Discov* 3:388-98, 2013) быстро расширяет терапевтические исследования генномодифицированных Т-клеток, перенаправленных на CD33. В настоящее время проводятся по меньшей мере три клинических испытания, в которых исследуется терапевтический потенциал CAR-Т-клеток, нацеливающих на CD33: NCT02958397 (миелоидные злокачественные новообразования), NCT02944162 (AML), NCT01864902 (AML). Однако, с видами CAR-Т-клеточной терапии связан ряд проблем. Например, в случае с CAR-Т-клеточной терапией, направленной на HER-2, изначально наблюдались токсичные нецелевые эффекты. (Morgan RA, et al., *Mol Ther* 18:843-51, 2010). Одно из устойчивых преимуществ Т-клеток, модифицированных CAR, специфичным к HER2, заключалось в том, что согласно наблюдениям они выполняли свою функцию, невзирая на низкие уровни экспрессии антигена. Остеосаркома является хорошим примером, в котором уровень экспрессии был неоднозначным (Thomas DG, et al., *Clin Cancer Res* 8:788-93, 2002), и было обнаружено, что CAR-модифицированные Т-клетки являются высокоэффективными в отношении местно-регионарных и метастатических ксенотрансплантатов (Ahmed N, et al., *Mol Ther* 17:1779-87, 2009) и в отношении опухоль-иницирующих клеток остеосаркомы (Rainusso N, et al., *Cancer Gene Ther* 19:212-7, 2012). Как и в случае с Т-клетками, "вооруженными" с помощью BsAb, циторедуктивная высокодозная химиотерапия перед инфузией Т-клеток необходима для значимых клинических ответов на CAR-модифицированные Т-клетки.

Хотя использование циторедукции однозначно стимулирует приживание и размножение инфундированных Т-клеток, повторное применение циторедукции с целью повторной попытки инфузии Т-

клеток является нецелесообразным и сводит на нет цель направленной терапии. Второстепенная токсичность, сбор, обработка, хранение, транспортировка клеток и нормативные требования к выпуску продукта для лимфоцитарной терапии остаются проблемой как с точки зрения логистики, так и с финансовой точки зрения, особенно если клетки должны быть генномодифицированными. Текущая цена, составляющая \$20000 на одного пациента, должна быть существенно уменьшена, чтобы продукт был конкурентоспособным на современном рынке лекарственных средств в свете сокращения бюджетных расходов на здравоохранение. Даже если стоимость не является ограничивающим фактором, выживание и хоминг Т-клеток являются субоптимальными, несмотря на инфузию миллиардов этих клеток. Цитолитическая эффективность Т-клеток, "вооруженных" с помощью BsAb, также не является оптимальной с учетом метаболизма антигена CD3 на поверхности Т-клеток, непрерывного отщепления BsAb и истощения Т-клеток перед встречей с опухолью. Как "вооруженные" с помощью BsAb, так и CAR-модифицированные Т-клетки не представляют исключения для иммунодепрессивного микроокружения опухолей, где Treg, опухолеассоциированные макрофаги и миелоидные супрессорные клетки действуют согласованно, блокируя их противоопухолевые свойства. Что касается конъюгируемых химическим путем BsAb, используемых при "вооружении" Т-клеток, то производство лекарственных средств является затруднительным вследствие неоднородности продукта, образования агрегатов и последующей иммуногенности, особенно если используется ОКТ3 мыши. Кроме того, CAR-модифицированные Т-клетки подвержены таким же иммунодепрессивным затруднениям, что и циркулирующие Т-клетки, в том числе иммунотолерантности в результате экспрессии PD-L1, причем это ограничение не обнаруживается в случае с BsAb.

Однако, в той степени, в какой CAR-Т-клеточная терапия считается применимой и/или подходящей, предполагается, что такая терапия может быть дополнена полиспецифическими средствами на основе антител согласно настоящему изобретению (например, CD33-BsAb, таким как средство на основе антитела Ig к CD33 и scFv антитела к CD3).

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему связывающий домен, который содержит полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb). В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой CAR первого поколения, второго поколения или третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета. В некоторых вариантах осуществления CAR содержит связывающий домен, который содержит биспецифическое средство на основе антитела к CD33 согласно настоящему изобретению, трансмембранный домен, костимулирующую сигнальную область и сигнальный домен CD3-дзета. Также настоящее изобретение относится к Т-клеткам, которые экспрессируют CAR согласно настоящему изобретению, т.е. CAR-Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к популяции CAR-Т-клеток, которые экспрессируют CAR, содержащий связывающий домен, который содержит полиспецифическое средство на основе антитела согласно настоящему изобретению (например, биспецифическое средство на основе антитела, такое как CD33-BsAb).

Другие признаки настоящего изобретения станут очевидными в рамках следующего описания иллюстративных вариантов осуществления, которые приведены для иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для его ограничения.

### Примеры

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано следующими неограничивающими примерами. Эти примеры изложены для облегчения понимания настоящего изобретения, но не предназначены для ограничения его объема и не должны толковаться как ограничивающие его объем никоим образом. Примеры не включают подробные описания традиционных способов, которые должны быть хорошо известны средним специалистам в данной области (методики молекулярного клонирования и т.д.). Если не указано иное, то части являются частями по весу, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура указана в градусах Цельсия, и давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Конструирование иллюстративного CD33-BsAb.

В данном примере описано получение иллюстративного биспецифического средства на основе антитела, которое характеризуется специфичностью по отношению к CD33 и CD3 и находится в формате IgG-scFv. Гуманизованное моноклональное антитело M195 получали путем прививания CDR из тяжелых и легких цепей M195 на каркасные области IgG1 человека на основании их гомологии с каркасными областямиIGHV1-3\*01 -IGHJ4\*01 для VH, IGKV3D-11\*02 -IGKJ4\*01 для VL соответственно. Среди конструкций с двумя тяжелыми цепями и двумя легкими цепями для четырех вариантов huM195 синтезировали гены и обеспечивали экспрессию в клетках DG44. Иллюстративные аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи включают SEQ ID NO: 1-2 и 3-4 соответственно.

Конструировали иллюстративное средство на основе антитела CD33-BsAb (BiClone 133) в формате IgG-scFv (фиг. 1A). Для конструирования иллюстративного средства CD33-BsAb использовали гуманизованную тяжелую цепь антитела к CD33, соответствующую SEQ ID NO: 9, и гуманизованную лег-

кую цепь антитела к CD33, соответствующую SEQ ID NO: 10. Иллюстративные средства CD33-BsAb могут содержать константную область, содержащую Fc-область hIgG1 с мутацией N297A. Мутация N297A предлагается для устранения гликозилирования Fc-области.

Последовательности ДНК и белка для тяжелой цепи иллюстративного CD33-BsAb приведены ниже.  
SEQ ID NO: 23 – последовательность ДНК тяжелой цепи BiClone133

(лидерная последовательность тяжелой цепи подчеркнута)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCCACCGGCGAGGT  
GCAGCTGGTGCAGTCTGGACCCGAGGTCGTGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGATCT  
CCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCCGACTACAACATGCACTGGGTGCGACAG  
GCCCACGGCCAGTCCCTGGAATGGATCGGCTACATCTACCCCTACAACGGCGGCAC  
CGGCTACAACCAGAAGTCAAGTCTCGGGCCACCCTGACCGTGGACAACCTTGCCTC  
TACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTGAGATCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTG  
CGCCAGAGGCAGACCCGCCATGGACTATTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACCGTGT  
CTAGCGCTTCTACCAAGGGCCCTCTGTGTTTCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCCAC  
CTCTGGTGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTCGTGAAGGACTACTTCCCGAGCCCGT  
GACCGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACCTCTGGCGTGCACACCTTCCCTGCTGT  
GCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCGTGACAGTGCCTCCAGCTCT  
CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAATACCAAGGT  
GGACAAGCGGGTGAACCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCT  
CTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGG  
ACACCCTGATGATCTCCCGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC  
ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGACAAC  
GCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACGCCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGT  
GCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCGCCGTGT  
CCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAG  
CCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGCAGGGACGAGCTGACCAAGAA  
CCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGA  
ATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGG  
ACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGC  
AGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA  
CCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

SEQ ID NO: 24 – аминокислотная последовательность тяжелой цепи  
BiClone133 (лидерная последовательность тяжелой цепи подчеркнута)

MGWSCILFLVATATGEVQLVQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYNMHWVR  
QAHGQSLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSRATLTVDNSASTAYMEVSSLRSEDTAVYYC  
ARGRPAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV  
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV  
EPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF  
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI  
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY  
KTRTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Конструировали иллюстративное средство на основе антитела CD33-BsAb, которое содержало сли-  
тый полипептид с гуманизированной легкой цепью антитела к CD33, удлиненной таким образом, чтобы  
содержать C-концевой линкер Gly-Ser (например, (G4S)<sub>3</sub>), за которой располагался scFv с аффинностью  
ко второму компоненту, например, CD3, посредством включения scFv гуманизированного ОКТ3. После-  
довательности ДНК и белка для слитого полипептида иллюстративного CD33-BsAb приведены ниже.

SEQ ID NO: 25 – последовательность ДНК легкой цепи BiClone133  
(лидерная последовательность легкой цепи подчеркнута)

ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGGTGGGCTACCGCCACCGGCGAGAT  
CGTGCTGACTCAGTCTCCTGCCACCCTGTCCGTGTCCCTGGGCGAGAGAGCCACCAT  
CTCTTGCAGAGCCTCCGAGTCCGTGGACAACCTACGGCATCTCCTTCATGAACTGGTT  
CCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTCGGCTGCTGATCTACGCCGCTTCCAATCAGGG  
CTCTGGCGTGCCCGCTAGATTCTCCGGATCTGGCCCTGGCACCGACTTTACCCCTGAC  
CATCTCCTCCATGGAACCCGAGGACTTCGCCATGTACTTTTGGCAGCAGTCCAAAGA  
GGTGCCCTGGACCTTTGGCGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCG  
CTCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCACCTTCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCTC  
TGTCGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT  
GGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCA  
AGGACAGCACCTACTCCCTGTCCCTCCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG  
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGAC  
CAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGCAGTGGCGGGCGGAGGATCTGGCGGAGGTG  
GAAGCGGAGGGGAGGATCTCAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGGCGGAGTGGT  
GCAGCCTGGCAGATCCCTGAGACTGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTACCCCG  
GTACACCATGCACTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGTGCCTGGAATGGATCGGCT  
ACATCAACCCCTCCCGGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACCGGTTT  
ACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCGCCTTTCTGCAGATGGACTCCCTGCGG  
CCTGAGGATACCGCGTGTACTTCTGCGCCCGTACTACGACGACCACTACTCCCTG  
GACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGTGACAGTGTCTGCTGCTGGTGGCGGAGGAAGTGG  
GGGAGGCGGATCAGGTGGTGGTGGATCAGGCGGGGAGGTTTCAAGGGGGTGGCGGT  
TCTGGGGGAGGGGGCTCTGATATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCCAGCCTGAGCGCC  
TCCGTGGGAGATCGCGTGACAATTACCTGCTCTGCCTCCTCCTCCGTGTCTTACATGA  
ATTGGTATCAGCAGACCCCTGGGAAGGCTCCTAAGCGGTGGATCTACGACACCTCC  
AAGCTGGCCTCTGGCGTGCCAGCAGGTTTTCTGGCTCCGGCAGCGGCACAGATTAT  
ACCTTACCATCAGCTCCCTGCAGCCAGAAGATATCGCTACCTATTATTGTCAGCAG  
TGGTCTCCAACCTTTACCTTCGGCTGCGGCACAAAGCTGCAGATCACAAGA

SEQ ID NO: 26 – аминокислотная последовательность легкой цепи  
BiClone133 (лидерная последовательность легкой цепи подчеркнута)

MGWSCIIFLVATATGEIVLTQSPATLSVSLGERATISCRASESVDNYSIFMWNWF  
QQKPGQPRLLIYAASNQGSVVPARFSGSGPGTDFLTLSMPEPDMYFCQQSKEVPW  
TFGGGTLKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYREAKVQWKVDNALQ  
SGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
TSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCKASGYTFTRYTMHWVRQA  
PGKCLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDRFTISRDNKNTAFLQMDSLRPEDTGVYFCARY  
YDDHYSLDYWGQTPVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQS  
PSSLSASVGDRTTCSASSVSVMNYYQTPGKAPKRWIYDTSKLSAGVPSRFSGSGSG  
TDYFTISSLPEDIATYYCQQWSSNPFTFGCGTKLQITR

ДНК, кодирующую как иллюстративную тяжелую цепь, так и иллюстративный слитый полипептид, подвергали оптимизации кодонов и встраивали в вектор экспрессии в клетках млекопитающих, вводили путем трансфекции в клетки CHO-S, и отбирали стабильные клоны с наиболее высоким уровнем экспрессии. Образцы надосадочной жидкости собирали из встряхиваемых колб и очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А.

Биохимический анализ чистоты иллюстративного CD33-BsAb показан на фиг. 1B. Иллюстративный CD33-BsAb оставался стабильным согласно SDS-PAGE и SEC-HPLC после нескольких циклов замораживания и оттаивания (данные не показаны).

Некоторые преимущества иллюстративного CD33-BsAb включают следующее.

Избегание трогоцитоза и неспецифического удаления ретикулоэндотелиальной системой: иллюстративный CD33-BsAb является агликозилированным благодаря точечной мутации в своем Fc-домене (N297A). Неспецифическое связывание с CD16 (FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIA), таким образом, блокируется. Предполагается, что это предотвращает трогоцитоз CD3, который может быть пагубным для Т-клеток. Без связывания с FcR наблюдается меньшая конкуренция за BsAb и, следовательно, количественно более эффективная доставка BsAb к Т-клеткам и опухолевым клеткам. В сочетании с мутацией

K322A также устраняется связывание с компонентами системы комплемента. При отсутствии связывания с Fc-областью и отсутствии активации комплемента синдром высвобождения цитокинов будет существенно ослабляться.

Легкость аффинной очистки: иллюстративный CD33-BsAb характеризуется неизменной аффинностью к белку A и белку G и, следовательно, легкостью очистки в ходе получения.

Пример 2. Активность иллюстративного CD33-BsAb *in vitro*.

В данном примере описана активность иллюстративного CD33-BsAb *in vitro* в формате IgG-scFv. В частности, в данном примере описана способность иллюстративного средства на основе антитела CD33-BsAb специфично связываться с клетками, экспрессирующими CD33, и опосредовать клеточноспецифическое Т-клеточное уничтожение.

CD33-BsAb (BiClone 133), связывающийся с Т-клетками.

Связывание иллюстративного средства на основе антитела CD33-BsAb с клетками-мишенями тестировали с помощью иммуноокрашивания в рамках FACS. CD33-BsAb (BiClone 133) связывался с CD33(+) линиями клеток AML U937, MV-4-11, MOLM13 и M-07e, не реагируя при этом с CD33(-) линиями лейкозных клеток MOLT4 и CMLT1 (фиг. 2).

CD33-BsAb опосредует Т-клеточную цитотоксичность, специфичную по отношению к лейкозному антигену.

Для оценивания того, может ли иллюстративное средство на основе антитела CD33-BsAb перенаправлять Т-клетки на уничтожение лейкозных клеток, Т-клеточную цитотоксичность в отношении CD33(+) клеток AML тестировали в стандартных 4-часовых анализах высвобождения <sup>51</sup>Cr. При наличии CD33-BsAb (BiClone 133) наблюдалось существенное уничтожение линий клеток AML уже при EC<sub>50</sub>, составляющей 1,1 пМ (для клеток AML HL60). CD33(-) лейкозные клетки не подвергались влиянию (фиг. 3).

CD33-BsAb перенаправлял Т-клетки на уничтожение линий лейкозных клеток человека с мутацией FLT3/ITD.

Убедительно подтверждено документальными доказательствами, что прогноз у пациентов с мутациями по типу внутренней tandemной дупликации (ITD) в гене FMS-подобной тирозинкиназы-3 (FLT3) (FLT3/ITD) является неблагоприятным. При детском AML отрицательные последствия этих мутаций являются более выраженными (Levis M, *Leukemia* 17:1738-52, 2003). Для оценивания того, может ли иллюстративное средство на основе антитела CD33-BsAb перенаправлять Т-клетки на AML с мутациями FLT3/ITD, использовали линию клеток AML MOLM13, которая содержит данную мутацию. Как показано на фиг. 4, CD33-специфичный BsAb лизировал клетки MOLM13 при EC<sub>50</sub>, составляющей 2,4 пМ.

Пример 3. Активность иллюстративного CD33-BsAb *in vivo*.

В данном примере описана активность иллюстративного CD33-BsAb в формате IgG-scFv *in vivo*. В частности, в данном примере описана эффективность иллюстративного средства на основе антитела CD33-BsAb в ксенотрансплантатной модели AML.

Эффективность CD33-BsAb в отношении клеток AML человека, содержащих мутации FLT3/ITD, у гуманизированных мышей.

Для исследований терапии *in vivo* использовали мышей NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG). Мышей произвольным образом распределяли в 5 групп, и все они получали 1 миллион клеток MOLM13, содержащих ген люциферазы светлячка: 1 - отсутствие лечения; 2 - только CD33-BsAb; 3 - только активированные Т-клетки (АТС); 4 - АТС (iv, внутривенная инъекция)/CD33-BsAb и 5 - АТС (ip, внутрибрюшинная инъекция)/CD33-BsAb. Лечение начинали в день 6, когда сформировалась лейкозная опухоль. В течение трех недель мыши получали еженедельную инъекцию 10 миллионов АТС. BsAb (100 мкг/мышь) вводили за день до и через день после инъекции Т-клеток. Для поддержания роста Т-клеток *in vivo* подкожно вводили 1000 МЕ интерлейкина-2 два раза в неделю. Еженедельно выполняли биолюминесцентную визуализацию для оценивания бремени лейкоза. Как показано на фиг. 5, введение АТС в присутствии BsAb обеспечивало лечение мышей с лейкозом. Эффективным было как внутрибрюшинное, так и внутривенное введение АТС. Важно отметить, что введение АТС или BsAb по отдельности было неспособно обеспечить подавление роста опухоли. Если сигнал от опухоли больше не выявлялся при визуализации, мышей оценивали посредством полного вскрытия. Никаких оставшихся лейкозных клеток не было выявлено.

Эффективность CD33-BsAb в отношении AML человека на поздней стадии у гуманизированных мышей.

Для исследования того, может ли CD33-BsAb лечить AML на поздней стадии, мышам NSG инокулировали 1 миллион лейкозных клеток MOLM13. Начиная с 7 дней после инъекции лейкозных клеток, мыши получали лечение с помощью еженедельных инъекций 10 миллионов АТС человека внутривенно в течение 3 недель. Через 28 дней после инъекции лейкозных клеток мыши получали лечение с помощью 2 инъекций по 100 мкг/доза BsAb в неделю в течение четырех недель. Как показано на фиг. 6, после введения BsAb наблюдалось быстрое лечение лейкоза.

Эффективность более низких доз CD33-BsAb в отношении AML человека у гуманизированных мышей.

Для исследования терапевтического эффекта более низких доз BsAb мыши NSG получали 1 миллион клеток AML MOLM13. Через 6 дней мышей произвольным образом распределяли в 4 группы: 1 - только АТС; 2 - АТС/BsAb, 100 мкг/мышь; 3 - АТС/BsAb, 30 мкг/мышь и 4 - АТС/BsAb, 10 мкг/мышь. АТС инъецировали внутривенно. Для поддержания роста Т-клеток *in vivo* подкожно вводили 1000 МЕ интерлейкина-2 два раза в неделю. Лечение начинали в день 6, когда сформировалась лейкозная опухоль. В течение трех недель мыши получали еженедельные инъекции 10 миллионов АТС. BsAb (в различных дозах, как упомянуто выше) вводили за день до и через день после инъекции Т-клеток. Еженедельно выполняли биолюминесцентную визуализацию для оценивания бремени лейкоза. Как показано на фиг. 7, лечение наблюдалось только у мышей, получавших как BsAb, так и АТС, тогда как в группе, получавшей только АТС, наблюдался рост лейкозной опухоли. Важно отметить, что даже 10 мкг BsAb были настолько же эффективными, как 100 мкг антитела.

Таким образом, иллюстративный CD33-BsAb демонстрировал неожиданную эффективность *in vivo*. Например, иллюстративный CD33-BsAb приводил к излечению у животных, несущих линии лейкозных клеток человека, *in vivo* даже в случаях, когда бремя лейкоза было значительным. Более того, ПК иллюстративного CD33-BsAb аналогична ПК у IgG. Это может позволять давать более низкие лечебные дозы и менее частые инъекции (см. фиг. 7).

Иллюстративный CD33-BsAb является эффективным в отношении АML человека *in vivo* при очень низких дозах.

Для тестирования действенности иллюстративного средства на основе антитела CD33-BsAb (IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3) *in vivo* у мышей NSG формировали ксенотрансплантаты путем внутривенной инъекции люцифераза(+) клеток AML MOLM13, несущих мутации по типу внутренних tandemных дупликаций в гене FMS-подобной тирозинкиназы (FLT3-ITD). Т-клетки периферической крови человека активировали с помощью микрогранул, покрытых антителами к CD3/CD28, в течение 7 дней и инъецировали один раз в неделю в течение трех недель, начиная через семь дней после имплантации лейкозных клеток. Дозу иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, инъецируемого за день до и через день после каждого введения Т-клеток, снижали от 100 мкг на дозу до 0,01 мкг на дозу. Хотя инъекция иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), либо Т-клеток в отдельности не вызвала значительного противоопухолевого эффекта, иллюстративное средство на основе антитела CD33-BsAb (BsAb) во всех тестируемых концентрациях в комбинации с Т-клетками человека, в том числе в наиболее низкой концентрации 0,1 мкг/доза BsAb с Т-клетками человека, ингибировало рост лейкозной опухоли. Примечательно, что BsAb при 1 мкг/доза (как и в более высоких концентрациях) приводил к излечению в присутствии Т-клеток человека (см. фиг. 8А и фиг. 8В). Таким образом, эти данные подтверждают, что иллюстративное средство на основе антитела CD33-BsAb (IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3), вводимое в комбинации с Т-клетками, может эффективно снижать бремя рака *in vivo* в широком диапазоне концентраций. Хотя дозирование показано с использованием мышинной модели, можно применять стандартные способы, известные специалистам в данной области, для приведения показателей исследований на животных к показателям у людей, например, способы расчета скорректированной дозы и т.д.

Пример 4. Тетравалентность CD33-BsAb улучшает действенность.

В данном примере анализируют эффект валентности в отношении действенности иллюстративного биспецифического средства на основе антитела IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3. Хотя были разработаны платформы биспецифических антител с различными биологическими свойствами, а некоторые даже вошли в клиническую практику, существует постоянная потребность в эффективных терапевтических средствах, привлекающих Т-клетки (Wu Z, Cheung NV. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): from technology to therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2017). Однако, в отличие от большинства платформ биспецифических антител, Настоящее изобретение основано на открытии того, что тетравалентное (2+2) биспецифическое антитело IgG(L)-scFv может обладать благоприятными характеристиками. Иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3, имеет два связывающих фрагмента, направленных на CD33 на клетках-мишенях, и два связывающих фрагмента, направленных на CD3 на Т-клетках. Для исследования значимости валентности получали бивалентное (1+1) биспецифическое средство на основе антитела IgG к CD33 и CD3 ("гетеродимер") с помощью способа контролируемого обмена Fab-фрагментами. (Labrijn AF, Meesters JI, Priem P, et al. Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific Igg1. *Nat Protoc.* 2014;9(10):2450-2463). ENREF\_2 Данный гетеродимер, связывающийся с CD33 и CD3, состоял из двух молекул полуантител IgG к CD3 (huOKT3) и CD33 (huM195), которые были преимущественно спаренными с образованием гетеродимерного биспецифического антитела IgG. Для сравнения действенности иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (BsAb), и гетеродимера использовали клетки THP1 и MOLM13 в анализе уничтожения. Как показано на фиг. 9, иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3, опосредовал в 12 раз более сильную TDCC в отношении клеток AML THP1 и MOLM13, чем TDCC, опосредованная гетеродимером. Затем иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3 (BsAb), и соответствующий гетеродимер сравнивали *in vivo*. Мышам NSG внутривенно имплантировали клетки MOLM13, и на шестой день они получали лечение с помощью очень низких доз BsAb (0,1 мкг/мышь/доза) в комбинации с активированными Т-

клетками. Рост опухоли отслеживали с помощью биолюминесценции (выражали в виде суммарного потока в ф/с). Хотя комбинация Т-клеток и гетеродимера была относительно неэффективной при подавлении роста опухоли, что было весьма сходным с картиной в группе, получавшей Т-клетки в отдельности, иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3 (BsAb), в комбинации с Т-клетками значительно замедлял рост лейкозной опухоли (фиг. 10, А и В). В совокупности эти данные подтверждают, что тетравалентный IgG(L)-scFv обладает увеличенной действенностью по сравнению с соответствующим бивалентным гетеродимером IgG.

Пример 5. При совместном введении иллюстративного CD33-BsAb и IL2 улучшается эффективность.

В данном примере анализируется эффект введения иллюстративного биспецифического средства на основе антитела IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, в комбинации с цитокином IL2. Поскольку активированные Т-клетки культивировали в присутствии IL2, то проводили тестирование того, улучшает ли эффективность дополнительное введение IL2 после введения Т-клеток. Результаты показали, что Т-клетки, перенаправленные посредством иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, характеризовались улучшенным противолейкозным эффектом в присутствии IL2, что позволяет предположить благотворную роль данного цитокина для функционирования Т-клеток *in vivo* (фиг. 11).

Пример 6. Эффективность иллюстративного CD33-BsAb в отношении проявлений экстрамедуллярного лейкоза.

В данном примере подтверждается эффективность иллюстративного биспецифического средства на основе антитела при лечении даже плохо поддающихся лечению опухолей. В настоящее время эффективное лечение проявлений экстрамедуллярного лейкоза (ЕМ-лейкоза) является весьма затруднительным. Проявления ЕМ-лейкоза включают большое разнообразие клинически значимых явлений, которые часто представляют собой терапевтические дилеммы. Миелоидная саркома (MS) и гемодермия (LC) представляют собой два проявления ЕМ-лейкоза. Молекулярные механизмы, лежащие в основе ЕМ-вовлечения, четко не определены, и прогностическая значимость ЕМ-вовлечения не полностью понятна. Таким образом, было трудно определить оптимальное лечение для пациентов с проявлениями ЕМ-лейкоза, такими как MS или LC.

Модель ЕМ-лейкоза создавали путем подкожной имплантации клеток MOLM13. Свежевыделенные РВМС человека инъецировали внутривенно один раз в неделю, начиная через семь дней после имплантации лейкозных клеток, и иллюстративное биспецифическое средство на основе антитела инъецировали за день до и через день после каждого введения Т-клеток. В этой модели РВМС должны были мигрировать из брюшной полости по кровотоку перед инфильтрацией подкожного очага опухоли. В контрольных группах, не получавших лечение или получавших РВМС в отдельности, опухоли быстро росли, превосходя объем 2000 мм<sup>3</sup>, при котором требовалась эвтаназия животных, в течение периода первых четырех недель после имплантации лейкозных клеток. Среди групп лечения после первоначального скачка роста наблюдалась быстрая регрессия у животных, получавших лечение с помощью РВМС, так и иллюстративного биспецифического средства на основе антитела (в группе РВМС/BsAb) (фиг. 12А). Для тестирования эффективности иллюстративного биспецифического средства на основе антитела в отношении других ксенотрансплантатов АМЛ подкожно инъецировали линии клеток THP1 и HL60, и через одну неделю выполняли лечение с помощью РВМС вместе с иллюстративным биспецифическим средством на основе антитела (BsAb) или без него. РВМС, перенаправленные посредством иллюстративного биспецифического средства на основе антитела, значительно замедляли рост лейкозной опухоли, тогда как РВМС в отдельности оказывали минимальный противоопухолевый эффект или не оказывали его вовсе (фиг. 12В и фиг. 12С).

Пример 7. Интернализация CD33 не нарушала функцию CD33-BsAb.

В настоящем примере представлены документальные подтверждения неожиданных характеристик интернализации, эффективности и (ограниченных) побочных эффектов определенных CD33-BsAb, предусмотренных в настоящем изобретении.

CD33 интернализируется и будет нарушать привлечение эффекторных клеток после связывания с антителами. Хотя данное явление является благоприятным для конъюгатов антитело-лекарственное средство, это может сделать биспецифическое средство на основе антитела к CD33 неэффективным. Более того, общепринято считать, что по отношению к CD33 должна сохраняться моновалентность (например, в ViTE или гетеродимере), поскольку перекрестное связывание с CD33 может ускорить его эндоцитоз. Таким образом, эффект валентности оценивали по скорости эндоцитоза. Клетки АМЛ MOLM13 окрашивали с помощью huM195 (бивалентного по отношению к CD33), иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3 (бивалентного по отношению к CD33) или гетеродимера при 37 или 4°C (с замедлением интернализации). При 4°C, при том, что связывание IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, с CD33 и связывание huM195 с CD33 были сравнимыми, связывание гетеродимера с CD33 характеризовалось почти в два раза меньшей avidностью (фиг. 13, А). При 37°C как huM195, так и гетеродимер приводили к интернализации CD33 в течение периода первых 4 ч после окрашивания, хотя в случае с huM195 наблюдалось более сильная интернализация, чем в случае с гетеродимером (фиг. 6В). В тех же самых условиях иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3, вел себя идентично гетеро-

димеру, и эти результаты были совершенно неожиданными. Интересно отметить, что связывание иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, с CD3 было в 27 и 2,5 раза слабее, чем связывание huOKT3 и гетеродимера с CD3 (фиг. 13, С). Хотя можно было бы ожидать, что при этом более низком связывании иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, с CD3 будет снижаться вероятность развития синдрома высвобождения цитокинов, неожиданно было обнаружено, что иллюстративный тетравалентный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3, является более действенным, чем гетеродимер, в осуществлении TDCC (фиг. 9). Иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3, инъецировали за день до введения Т-клеток *in vivo*. В этих условиях ожидалась интернализация; тем не менее, эффект противодействия AML *in vivo* все еще был существенным, что позволяло предположить, что остаточная поверхностная экспрессия CD33 (20% в линии клеток MOLM13) была достаточной для противолейкозной функции иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3.

Пример 8. CD33 не экспрессировался на гемопоэтических стволовых клетках пуповинной крови (HSC).

CD33 считается специфическим маркером миелоидной линии дифференцировки, и лечение с помощью антител к CD33 может нарушать долгосрочный гемопоэз, что может ограничивать терапевтический потенциал. (Hauswirth AW, Florian S, Printz D, et al. Eur J Clin Invest. 2007;37(1):73-82 & Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, Simpson C, et al. Blood. 2005;106(13):4086-4092). Когда CD34+ клетки пуповинной крови окрашивали иллюстративным BsAb к CD33 (фиг. 14, А), то почти все CD34(+)CD38(-) HSC были отрицательными, тогда как все CD34(+)CD38(+) гемопоэтические клетки-предшественники (HPC) были положительными. Даже на HPC экспрессия CD33 была более чем в 20 раз ниже, чем на миелоидных клетках. CD34(+) клетки, выделенные из пуповинной крови, тестировали в отношении чувствительности к TDCC в стандартном анализе высвобождения хрома. В отличие от клеток MOLM13, лизируемых под действием иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, CD34(+) популяция была относительно нечувствительной к TDCC (фиг. 14, В). Низкий уровень уничтожения (<5%), наблюдаемый при высоких концентрациях (1 мкг/мл) иллюстративного IgG-scFv, связывающегося с CD33 и CD3, может объясняться наличием остаточной CD34(-)CD33(+) популяции (экспрессия CD33 в этой популяции была выше, чем на CD34(+)CD38(+) гемопоэтических клетках-предшественниках) (фиг. 14, С).

Таким образом, эти данные подтверждают, что иллюстративный IgG-scFv, связывающийся с CD33 и CD3, согласно настоящему изобретению проявляет стойкую эффективность *in vitro* и *in vivo* при наличии неожиданных характеристик и свойств, которые могут быть терапевтически благоприятными.

#### Эквиваленты

Формы единственного числа, используемые в настоящем изобретении в описании и формуле изобретения, если четко не указано противоположное, следует понимать как охватывающие определяемые объекты во множественном числе. Выражения в формуле изобретения или описании, которые включают "или" между одним или более членами группы, считаются удовлетворенными, если один, более одного или все члены группы присутствуют в данном продукте или способе, используются в нем или иным образом имеют отношение к нему, если не указано противоположное или иное не очевидно из контекста. Настоящее изобретение включает варианты осуществления, в которых ровно один член группы присутствует в данном продукте или способе, используется в нем или иным образом имеет отношение к нему. Настоящее изобретение также включает варианты осуществления, в которых более одного или все члены группы присутствуют в данном продукте или способе, используются в нем или иным образом имеют отношение к нему. Кроме того, следует понимать, что настоящее изобретение охватывает все видоизменения, комбинации и перестановки, в которых одно или более ограничений, элементов, частей, описательных терминов и т.д. из одного или более из перечисленных пунктов формулы изобретения введены в другой пункт формулы изобретения, зависимый от того же самого основного пункта формулы изобретения (или, в соответствующих случаях, любого другого пункта), если не указано иное или если для среднего специалиста в данной области не будет очевидно возникновение противоречия или несоответствия. Если элементы представлены в виде списков (например, в виде группы Маркуша или в аналогичном формате), то следует понимать, что также раскрыта каждая подгруппа элементов, и любой(любые) элемент(элементы) могут быть удалены из группы. Следует понимать, что, как правило, если настоящее изобретение или аспекты настоящего изобретения обозначены как содержащие конкретные элементы, признаки и т.д., то определенные варианты осуществления настоящего изобретения или аспекты настоящего изобретения состоят из таких элементов, признаков и т.д. или по существу состоят из них. В целях простоты эти варианты осуществления не в каждом случае конкретно и недвусмысленно изложены в настоящем изобретении. Также следует понимать, что любой вариант осуществления или аспект настоящего изобретения может быть явным образом исключен из формулы изобретения, независимо от того, упоминается ли конкретное исключение в описании. Публикации, веб-сайты и другие справочные материалы, на которые даны ссылки в настоящем изобретении для описания предпосылок настоящего изобретения и для предоставления дополнительных подробностей, относящихся к его практическому осуществлению, настоящим включены в настоящее описание посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое средство на основе антитела, содержащее две идентичные тяжелые цепи иммуноглобулина и два идентичных слитых полипептида, где каждая тяжелая цепь содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 1 или 2, и где каждый слитый полипептид содержит:

(i) легкую цепь иммуноглобулина, содержащую последовательность переменного домена легкой цепи, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 3 или 4, и

(ii) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv),

где каждая из тяжелых цепей имеет парную легкую цепь слитых полипептидов, причем каждая пара тяжелой цепи и легкой цепи связывается с CD33, и где scFv слитого полипептида связывается с CD3.

2. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где каждая из тяжелых цепей содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи, определенную под SEQ ID NO: 1 или 2.

3. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где легкая цепь слитого полипептида содержит последовательность переменного домена легкой цепи, определенную под SEQ ID NO: 3 или 4.

4. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где каждая из тяжелых цепей содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 9.

5. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где легкая цепь слитого полипептида содержит последовательность легкой цепи, определенную под SEQ ID NO: 10.

6. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где scFv слит с C-концом легкой цепи иммуноглобулина.

7. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где слитый полипептид дополнительно содержит линкер.

8. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где слитый полипептид содержит scFv, содержащий последовательность, определенную под любым из SEQ ID NO: 11-17 и 27.

9. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где тяжелая цепь содержит Fc-область с одной или более мутациями, выбранными из K322A и D265A.

10. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где каждая из тяжелых цепей содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 24.

11. Биспецифическое средство на основе антитела по п.1, где каждый из слитых полипептидов содержит последовательность, определенную под SEQ ID NO: 26.

12. Композиция для лечения рака, выбранного из острого миелоидного лейкоза, бифенотипического лейкоза, миелодиспластических синдромов, хронического миеломоноцитарного лейкоза, миелоидного бластного криза при хроническом миелоидном лейкозе и форм острого лимфобластного лейкоза, содержащая эффективное количество биспецифического средства на основе антитела по любому из пп.1-11 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

13. Способ лечения рака, выбранного из острого миелоидного лейкоза, бифенотипического лейкоза, миелодиспластических синдромов, хронического миеломоноцитарного лейкоза, миелоидного бластного криза при хроническом миелоидном лейкозе и форм острого лимфобластного лейкоза, у пациента, включающий введение указанному пациенту биспецифического средства на основе антитела по любому из пп.1-11.

14. Способ по п.13, дополнительно включающий введение препарата активированных Т-клеток.

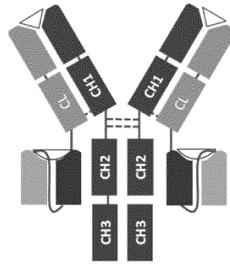
15. Способ по п.13 или 14, дополнительно включающий введение IL2.

16. Т-клетка, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую подлежащее экспрессии биспецифическое связывающее средство по любому из пп.1-10.

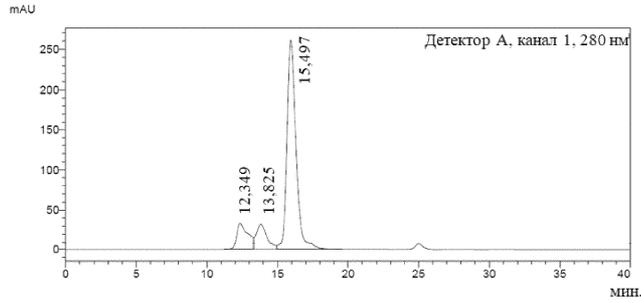
17. Популяция Т-клеток, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую подлежащее экспрессии биспецифическое связывающее средство по любому из пп.1-10.

18. Композиция для лечения рака, выбранного из острого миелоидного лейкоза, бифенотипического лейкоза, миелодиспластических синдромов, хронического миеломоноцитарного лейкоза, миелоидного бластного криза при хроническом миелоидном лейкозе и форм острого лимфобластного лейкоза, содержащая популяцию Т-клеток по п.17 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Модульный  
IgG-scFv

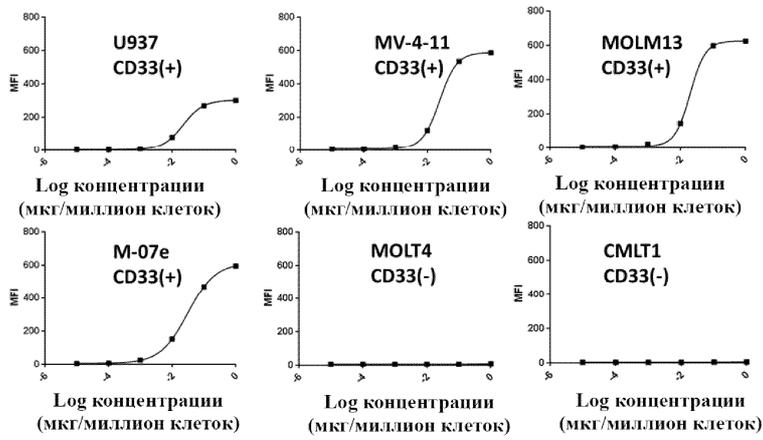


Фиг. 1А

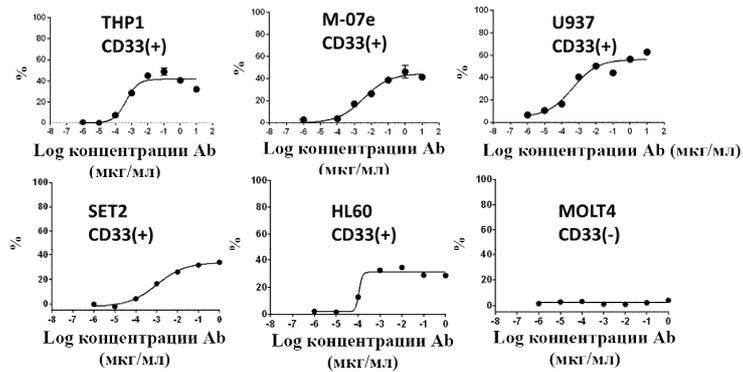


№ пика	Время удерживания	Площадь	Высота	Обозначение	% площади
1	12,349	1869848	33573		12,244
2	13,825	1737834	32433	V	11,379
3	15,947	11664374	260897	V	76,377
Всего		15272056	326903		100,000

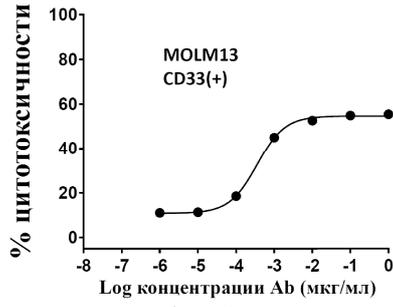
Фиг. 1В



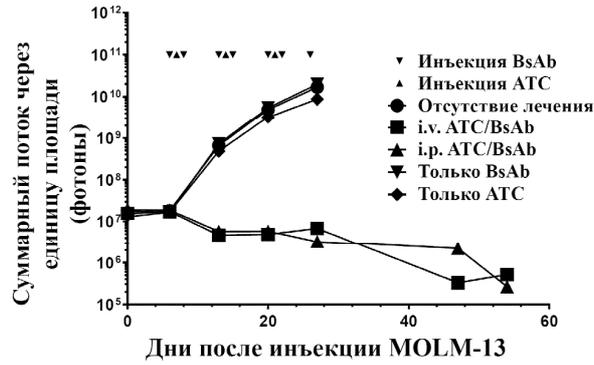
Фиг. 2



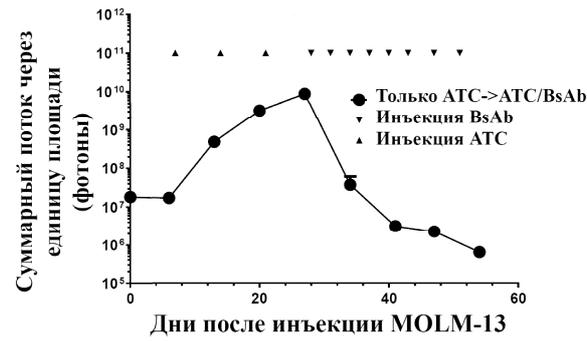
Фиг. 3



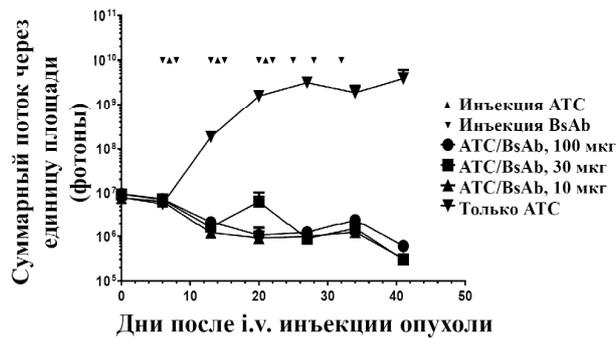
Фиг. 4



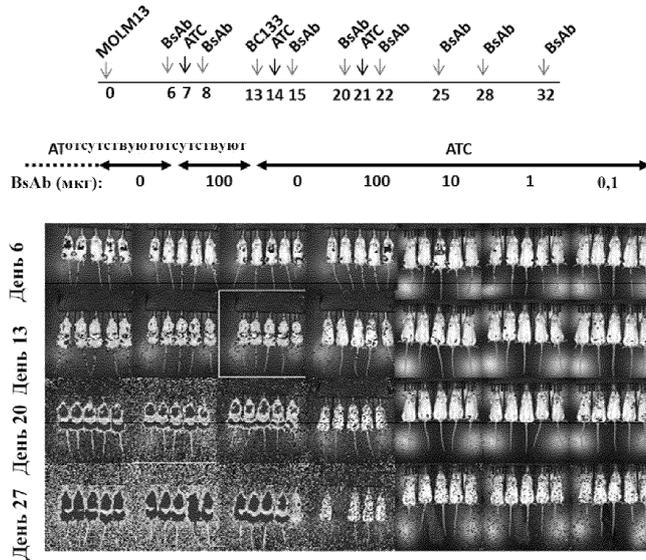
Фиг. 5



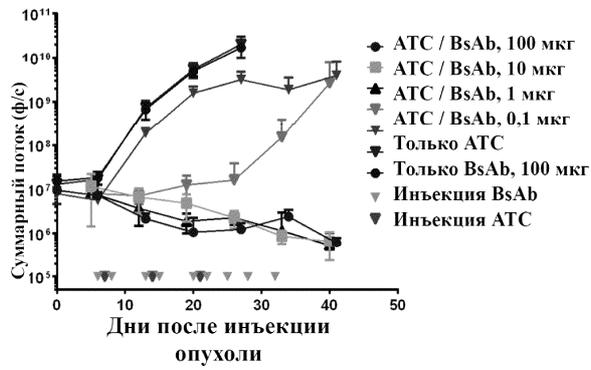
Фиг. 6



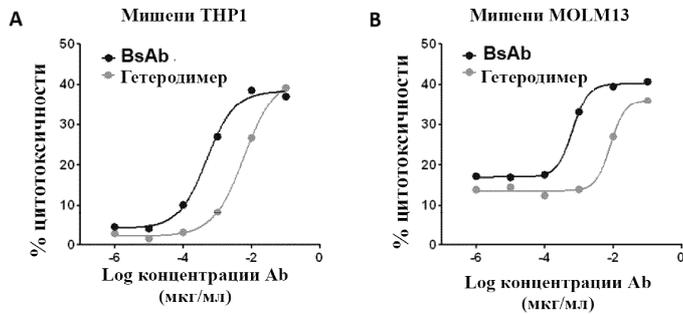
Фиг. 7



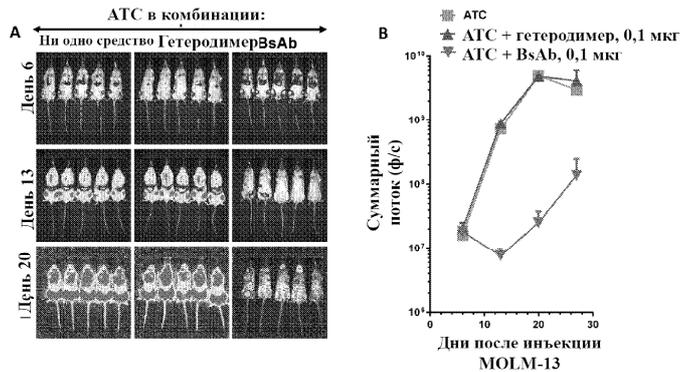
Фиг. 8А



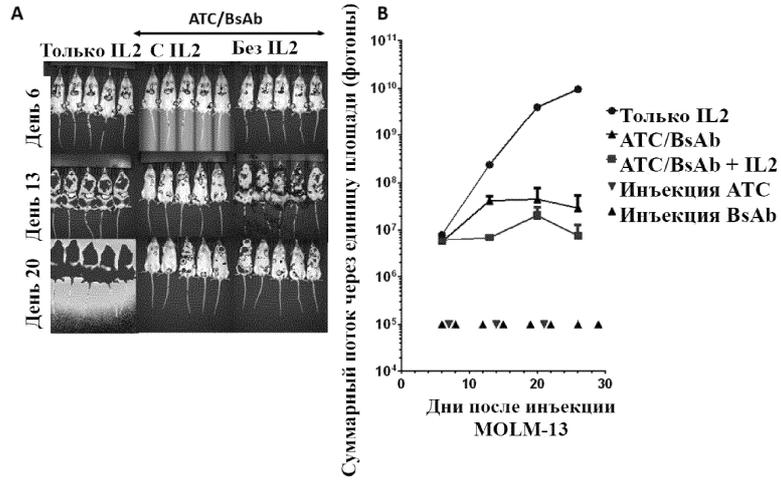
Фиг. 8В



Фиг. 9



Фиг. 10



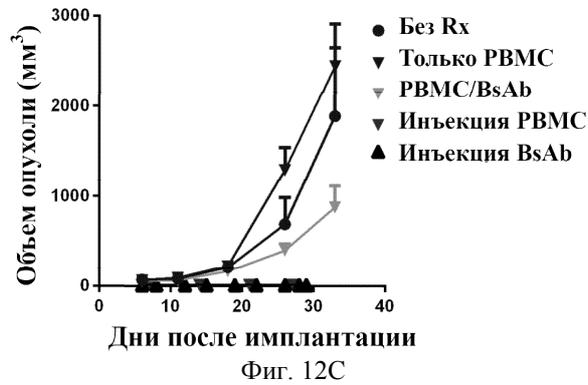
Фиг. 11



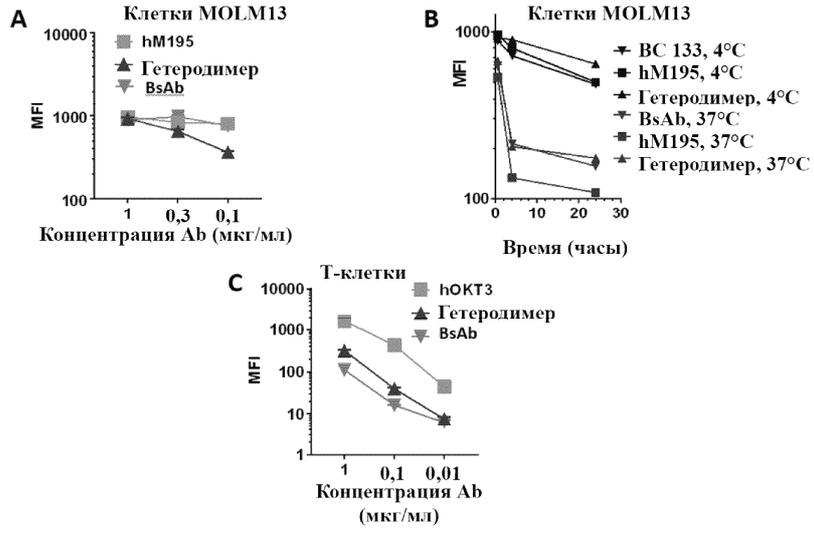
Фиг. 12А



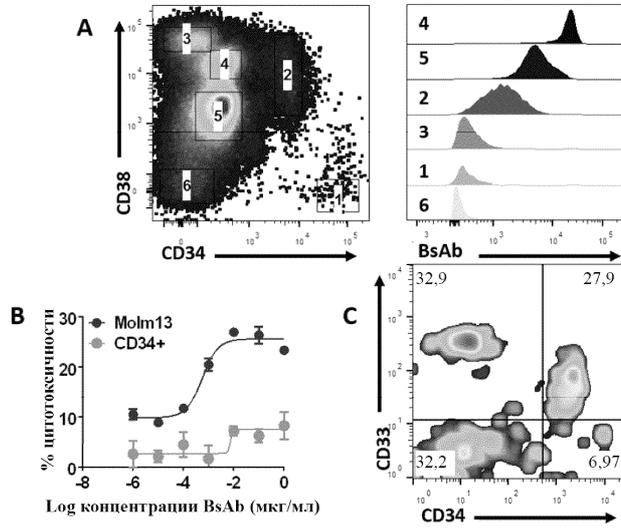
Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 13



Фиг. 14