

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490771 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.08.06

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.10.14

(54) АКТИВИРУЕМЫЙ ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС

(31) 63/256,410; 63/370,895

(32) 2021.10.15; 2022.08.09

(33) US

(86) PCT/US2022/078157

(87) WO 2023/064927 2023.04.20

(71) Заявитель:

СИТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.;
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

Бустани Лейла М., Пайдхунгат
Мадан М., Фокс Иллэйн Энн
Мариано, Митра Саянтан, Кавано У.
Майкл, Браэнт Раффаэлла, Стивенс
Дженнитт ЛиЭнн (US)

(74) Представитель:

Бильк А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Дмитриев
А.В., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Данное изобретение относится к активируемым гетеромультимерным биспецифическим полипептидным комплексам (ГБПК) против EGFR и CD3, и способам их получения и применения.

202490771
A1

202490771

A1

АКТИВИРУЕМЫЙ ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке США № 63/256,410, поданной 15 октября 2021 г. и № 63/370,895, поданной 9 августа 2022 г., содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ССЫЛКА НА СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS WEB

[0002] Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей (4681_001PC02_Seqlisting_ST26.xml; размер: 179 444 байт; и дата создания: 13 октября 2022 г.), представленного в данной заявке, включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Данное изобретение относится к активируемым гетеромультимерным биспецифическим полипептидным комплексам (ГБПК) против EGFR и CD3 и способам их получения и применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Генерация и активация опухолевых антиген-специфичных Т-клеток участвуют в иммуноопосредованном контроле развития заболевания и противоопухолевой активности. Для этого необходимы множественные костимулирующие рецепторы Т-клеток и негативные регуляторы Т-клеток или коингибирующие рецепторы, действующие согласованно, чтобы контролировать активацию, пролиферацию Т-клеток, а также усиление или потерю эффекторной функции. Опухолеспецифические ответы Т-клеток трудно вызвать и поддерживать у онкологических больных из-за многочисленных механизмов иммунного ускользания опухолевых клеток. Тем не менее, были предприняты попытки использовать Т-клетки для лечения онкологических заболеваний. Такие подходы включают использование биспецифических антител, взаимодействующих с Т-клетками, которые связывают как поверхностный антиген-мишень на раковой клетке, так и поверхностный антиген Т-клетки, такой как CD3, на Т-клетках. Как правило, связывая каждую мишень, биспецифические агенты, взаимодействующие с Т-клетками, удерживают Т-клетки в непосредственной физической близости с раковой клеткой и позволяют белкам и ферментам Т-клеток атаковать опухолевые клетки и вызывать апоптоз, тем самым убивая раковые клетки.

[0005] Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецепторный и

трансмембранный гликопротеин, который проявляет внутреннюю тирозинкиназную активность, регулирует многочисленные клеточные процессы, включая, но не ограничиваясь, активацию путей передачи сигнала, которые контролируют пролиферацию клеток, дифференциацию, выживание клеток, апоптоз, ангиогенез, митогенез и метастазирование (Atalay et al., *Ann. Oncology* 14:1346-1363 (2003); Tsao and Herbst, *Signal* 4:4-9 (2003); Herbst and Shin, *Cancer* 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., *Br. J. Cancer* 73:228-235 (1996)). Сверхэкспрессия EGFR связана с многочисленными видами онкологических заболеваний человека, включая рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легких, молочной железы, яичников, толстой кишки, простаты и почек. EGFR также экспрессируется в клетках нормальных тканей, но на более низких уровнях, чем экспрессируется в злокачественных клетках.

[0006] Биспецифические антитела, которые взаимодействуют с EGFR и CD3, имеют недостатки, включая токсичность, опосредованную Т-клетками (т.е. высвобождение цитокинов), и токсичность, связанную с EGFR, вследствие связывания с опухолью. Кроме того, возникают производственные проблемы из-за сложной структуры биспецифических антител и высокого уровня агрегации во время производства и масштабирования. Соответственно, существует потребность в вариантах иммунотерапии, которые имеют улучшенный профиль безопасности, а также улучшенную технологичность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] Данное изобретение относится к активируемому гетеромультимерному биспецифическому полипептидному комплексу (ГБПК) против EGFR и CD3, содержащему: (a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) и первый вариабельный домен легкой цепи (VL1), причем VH1 и VL1 вместе образуют домен, нацеленный на кластер дифференциации Т-клеток (CD3), который специфически связывает полипептид CD3, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1), (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1), (iv) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1); (b) второй полипептид, содержащий (i) второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), причем VH2 и VL2 вместе образуют домен, нацеленный на EGFR, который специфически связывает EGFR, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), и (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2); и (c) третий полипептид, который (i) содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и (ii) не содержит вариабельный домен иммуноглобулина. В некоторых аспектах полипептид CD3 представляет собой эпсилон-цепь CD3.

[0008] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного

биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, VH1 содержит: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 4) и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HG NFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и причем VL1 содержит: (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8).

[0009] В некоторых аспектах scFv содержит VH1, который имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:9, и/или VL1, который имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:10. В некоторых аспектах scFv содержит VH1, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и VL1, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

[0010] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, VH2 содержит: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO: 15), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность VIWSGGNTDYNTPFPTS (SEQ ID NO:16), и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:17). В некоторых аспектах VH2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:21. В некоторых аспектах VH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

[0011] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, Fc1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:23. В некоторых аспектах Fc1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23.

[0012] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи между VH2 и Fc1. В некоторых аспектах первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина между VH2 и Fc1. В некоторых аспектах первый полипептид содержит структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца: MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-

шарнирная область-Fc1, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

[0013] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый полипептид содержит один или более линкеров. В некоторых аспектах линкер содержит от около 1 до около 20 аминокислот.

[0014] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, VL2 содержит (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO:18), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность YASESIS (SEQ ID NO:19), и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO:20). В некоторых аспектах VL2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:22. В некоторых аспектах VL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

[0015] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, второй полипептид содержит структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца: MM2-CM2 -VL2, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь. В некоторых аспектах второй полипептид содержит один или более линкеров. В некоторых аспектах линкер содержит от около 1 до около 20 аминокислот.

[0016] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, Fc2 связывается с Fc1. В некоторых аспектах Fc2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:28. В некоторых аспектах Fc2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28. В некоторых аспектах Fc2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29.

[0017] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, по меньшей мере один из первого полипептида и третьего полипептида дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина. В некоторых аспектах первый полипептид и третий полипептид содержат шарнирную область иммуноглобулина. В некоторых аспектах шарнирная область иммуноглобулина первого полипептида и шарнирная область иммуноглобулина третьего полипептида содержат одинаковую

аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах шарнирная область иммуноглобулина первого полипептида и шарнирная область иммуноглобулина третьего полипептида содержат разные аминокислотные последовательности.

[0018] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, третий полипептид содержит шарнирную область иммуноглобулина в структурной организации от amino-конца до карбокси-конца: шарнирная область-Fc2.

[0019] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый, второй и/или третий полипептид содержат один или более линкеров. В некоторых аспектах MM1 связан с CM1 через линкер L1. В некоторых аспектах MM2 связан с CM2 через линкер L2. В некоторых аспектах аминокислотные последовательности L1 и L2 являются одинаковыми. В некоторых аспектах аминокислотные последовательности L1 и L2 различаются.

[0020] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, каждый CM1 и CM2 содержат субстрат для протеазы, которая присутствует в микроокружении опухоли субъекта, имеющего онкологическое заболевание. В некоторых аспектах CM1 и CM2 содержат субстраты для одной и той же протеазы. В некоторых аспектах CM1 и CM2 содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых аспектах каждый из CM1 и CM2 независимо содержат субстрат для протеазы, выбранной из группы протеаз, представленных в Таблице 2. В некоторых аспектах по меньшей мере один из CM1 и CM2 содержит субстрат для сериновой протеазы или матриксной металлопептидазы (ММП). В некоторых аспектах CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 и/или CM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых аспектах CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых аспектах CM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

[0021] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, MM1 и/или MM2 содержат от около 5 аминокислот до около 40 аминокислот. В некоторых аспектах MM1 выбран из группы, состоящей из: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:72. В некоторых аспектах MM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых аспектах MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

[0022] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, по меньшей мере один из одного или более линкеров выбран из группы, состоящей из: (i) глицин-серинового линкера, выбранного из группы, состоящей из (GS)_n, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, (GGS)_n, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), (GGGS)_n (SEQ ID NO:40), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), (GGGGS)_n (SEQ ID NO:126), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), (GSGGS)_n (SEQ ID NO:41), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20, или от около 1 до около 10), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:12), GSGG (SEQ ID NO:42), GGSGG (SEQ ID NO:43), GSGSG (SEQ ID NO:44), GSGGG (SEQ ID NO:45), GGGSG (SEQ ID NO:46), и GSSSG (SEQ ID NO:47), GGGGSGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO:48), GGGGSGS (SEQ ID NO:49), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:50), GGGGSGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:51), GGGGS (SEQ ID NO:52), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:53), GGGGS (SEQ ID NO:54), GGSGGGGS (SEQ ID NO:55), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56), GSSGGSGGSGG (SEQ ID NO:57), GGGSGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:58), GGGSSGGS (SEQ ID NO:127) и GS; и (ii) линкера, содержащего глицин и серин, и по меньшей мере один из лизина, треонина или пролина, выбранного из группы, состоящей из GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO:59), SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO:60), GGSLDPKGGGGS (SEQ ID NO:61), PKSCDKTHTCPPAPELLG (SEQ ID NO:62), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:63), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:64), GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO:65) и GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:66).

[0023] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и (3) третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

[0024] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:120, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и (3)

третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

[0025] В данном документе описана фармацевтическая композиция, содержащая активируемый биспецифический полипептидный комплекс, раскрытый в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0026] В данном документе также описан набор, содержащий фармацевтическую композицию, содержащую активируемый биспецифический полипептидный комплекс, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0027] В данном документе также описана нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидные последовательности, которые кодируют первый полипептид, второй полипептид и третий полипептид активируемого биспецифического полипептида, описанного в данном документе. Дополнительно в данном документе предложены векторы, содержащие описанную нуклеиновую кислоту, и клетки-хозяева, содержащие указанные векторы.

[0028] Также в данном документе описан способ получения активируемого биспецифического полипептидного комплекса, включающий: (a) культивирование клетки-хозяина в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения активируемого биспецифического полипептидного комплекса; и (b) выделение активируемого биспецифического полипептидного комплекса.

[0029] Также в данном документе описан способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества активируемого биспецифического полипептидного комплекса, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах субъект представляет собой человека. В некоторых аспектах заболевание представляет собой онкологическое заболевание. В некоторых аспектах активируемый биспецифический полипептид или фармацевтическая композиция предназначены для применения для ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

[0030] Также в данном документе описано применение активируемого биспецифического полипептидного комплекса, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе, при производстве лекарственного средства для лечения онкологического заболевания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0031] На Фиг. 1 представлена схема активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса (ГБПК) против EGFR и CD3, описанного в данном документе.

[0032] На Фиг. 2А представлено связывание с EGFR посредством C1106 (контроля -

активируемого двухвалентного, биспецифического антитела с двумя плечами против EGFR и CD3), Комплекса-57 (активируемого ГБПК) и Комплекса-67 (активируемого ГБПК), и активированного СИ106, активированного Комплекса-57 и активированного Комплекса-67.

[0033] На Фиг. 2В представлено связывание с CD3 посредством СИ106 (контроля), Комплекса-57 (активируемого ГБПК), Комплекса-67 (активируемого ГБПК) и активированного СИ106, активированного Комплекса-57 и активированного Комплекса-67.

[0034] На Фиг. 3А представлена цитотоксичность по отношению к клеткам НТ29 после обработки активированным СИ106 (контролем), Комплексом-57 и Комплексом-67, а также СИ106 (двухвалентной биспецифической контрольной конструкцией с двумя плечами) и Комплексом-57.

[0035] На Фиг. 3В показана цитотоксичность в отношении к клеткам НТ29 после обработки СИ106 (контролем), Комплексом-67, активированным СИ106 (контролем) и активированным Комплексом-67.

[0036] Фиг. 4 представлен объем опухоли в модели опухоли ксенотрансплантата НТ29-luc2 как функция времени после обработки носителем, 1,0 мг/кг СИ106 (контролем) и 0,2, 0,6 и 1,8 мг/кг Комплексом-67.

[0037] На Фиг. 5 представлен объем опухоли в модели опухоли ксенотрансплантата НСТ116 как функция времени после обработки носителем, 0,3 мг/кг и 1 мг/кг активированного Комплекса-67 и Комплекса-67.

[0038] На Фиг. 6 представлено процентное содержание (%) мономера в зависимости от концентрации для СИ106 (контроля), Комплекса-57 и Комплекса-67.

[0039] На Фиг. 7А-7С представлена оценка связывания СИ107 с помощью проточной цитометрии с EGFR и CD3, экспрессируемыми на поверхности клеток НТ29 (А), клеток НСТ116 (В) или клеток Jurkat (С). Кажущуюся К_d рассчитывали на основе экспериментов в двух повторностях на клетках НТ29 и экспериментов в трех повторностях на клетках Jurkat.

[0040] На Фиг. 8А-8D представлен процент цитотоксичности, опосредованной СИ107, в отношении клеток НСТ116-Luc2 (А, С) и клеток НТ29-Luc2 (В, D). Через 48 часов культивирования измеряли жизнеспособность и цитотоксичность клеток НСТ116-Luc2 или НТ29Luc2 по сравнению с необработанными контролями (А, В). Через 16 часов культивирования экспрессию CD69 измеряли с помощью способа проточной цитометрии. MFI представляет собой среднюю интенсивность флуоресценции (С, D).

[0041] На Фиг. 9А-9Е представлено высвобождение цитокинов после обработки СИ107, измеренное через 16 часов культивирования. (А) IFN- γ , (В) IL-2, (С) IL-6, (D) MCP-

1 и (E) TNF- α .

[0042] На Фиг. 10А-10В представлен объем опухоли после лечения исследуемыми ТСВ у мышей, имеющих опухоли HT29-Luc2 и которые привиты РВМС человека. (А) Мышам вводили раз в неделю в течение 3 недель носитель (ФСБ) или 0,3 мг/кг СИ020, СИ011, СИ040 или СИ048 (n=8 на группу). Объем опухоли измеряли два раза в неделю. (В) Мышам NSG, имеющим опухоли HT29-Luc2 и которые привиты РВМС человека, вводили носитель или 1 мг/кг СИ020, СИ011, СИ040 или СИ048. Опухоли отбирали на исследование через 7 дней после введения дозы и проводили иммуногистохимический анализ на CD3. Темное окрашивание указывает на клетки CD3+.

[0043] На Фиг. 11А-11В представлены объемы опухолей после лечения СИ107 один раз в неделю в течение 3 недель в моделях ксенотрансплантатных опухолей HT29 (А) и НСТ116 (В). Объем опухоли измеряли два раза в неделю. * p<0,5; ** p<0,01; **** p<0,0001.

[0044] На Фиг. 12А-12В представлены уровни IL-6 (А) и IFN- γ (В), измеренные через 8 часов после введения дозы СИ107.

[0045] На Фиг. 12С представлены уровни аспартатаминотрансферазы (АСТ), измеренные с помощью химического анализа сыворотки через 48 часов после введения дозы СИ107 (С).

[0046] На Фиг. 12D представлены концентрации Акт.-СИ107 и СИ107 в плазме, измеренные с помощью ИФА с использованием антиидиотипического иммобилизованного антитела и обнаружения с помощью иммобилизованного антитела против Fc человека. Линии СИ107 представляют данные для 3 отдельных животных, которым вводили дозу СИ107 2,0 мг/кг; линии Акт.-ТСВ представляют данные для отдельных животных, которому вводили 0,06 мг/кг или 0,18 мг/кг Акт.-ТСВ.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0047] Для того чтобы данное раскрытие могло быть более понятным сначала приводятся определения конкретных терминов. При использовании в контексте данной заявки, за исключением случаев, когда в данном документе прямо предусмотрено иное, каждый из следующих терминов имеет значение, изложенное ниже. Дополнительные определения приводятся по всему тексту заявки.

Определения

[0048] Используемые в контексте данного документа термины «гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс» и «ГБПК» используются взаимозаменяемо для обозначения набора полипептидов, которые вместе образуют комплекс, который имеет связывающие домены, которые способны связываться

с двумя разными биологическими мишенями.

[0049] Термин «активируемый», когда он используется в связи с термином «гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс» или «ГБПК», в контексте данного документа относится к ГБПК, связывающая активность которого нарушена присутствием присоединенных маскирующих фрагментов к структуре ГБПК. Термины «активированный» и «акт.» могут использоваться для обозначения активированного ГБПК. Термины «субъект» и «пациент» используются в контексте данного документа взаимозаменяемо.

[0050] В контексте данного документа термин «EGFR» относится к рецепторному и трансмембранному гликопротеину и члену суперсемейства протеинкиназ. Рецептор эпидермального фактора роста человека представляет собой трансмембранный рецептор массой 170 кДа, кодируемый протоонкогеном *c-erb B-1*, и проявляет внутреннюю тирозинкиназную активность (Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002)). Также известны изоформы и варианты EGFR (например, альтернативные транскрипты РНК, укороченные версии, полиморфизмы и т.д.), которые предполагаются для использования в контексте данного документа. EGFR регулирует многочисленные клеточные процессы через пути передачи сигнала, опосредованные тирозинкиназой, включая, но не ограничиваясь, активацию путей передачи сигнала, которые контролируют пролиферацию клеток, дифференциацию, выживаемость клеток, апоптоз, ангиогенез, митогенез и метастазирование (Atalay et al., Ann. Oncology 14:1346-1363 (2003); Tsao and Herbst, Signal 4:4-9 (2003); Herbst and Shin, Cancer 94:1593-1611 (2002); Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 73:228-235 (1996)). Сверхэкспрессия EGFR связана с многочисленными видами онкологических заболеваний человека, включая рак мочевого пузыря, головного мозга, головы и шеи, поджелудочной железы, легких, молочной железы, яичников, толстой кишки, простаты и почек. EGFR также экспрессируется в клетках нормальных тканей, но на более низких уровнях, чем экспрессируется в злокачественных клетках. Иллюстративные антигенсвязывающие белки против EGFR включают, но не ограничиваются, дикий тип EGFR человека (№ доступа NCBI: NG_007726.E), вариант 1 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_005219.2), вариант 2 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_958439.1), вариант 3 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_958440.1), вариант 4 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_958441.1), вариант 5 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_001333826.1), вариант 6 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_001333827.1), вариант 7 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа

NCBI: NP_001333828.1), вариант 8 транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NM_001346941.2), вариант EGFRvIII транскрипта дикого типа EGFR человека (№ доступа NCBI: NP_001333870.1) и т.п.

[0051] Используемый в контексте данного документа термин «CD3» или «кластер дифференциации 3» относится к белковому комплексу из шести цепей, которые являются субъединицами рецепторного комплекса Т-клеток. (Janeway et al., p. 166, 9th ed.) Гетеродимер TCR $\alpha\beta$ связывается с субъединицами CD3, образуя антигенный рецептор TCR на клеточной поверхности. Две цепи CD3 ϵ , цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и гомодимер цепей CD3 ζ завершают комплекс рецептора Т-клеток, который участвует в распознавании пептидов, связанных с главным комплексом гистосовместимости класса I и II, и включает активацию Т-клеток. Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и субпопуляцией тимоцитов. CD3-направленный домен, который специфически связывает полипептид CD3, описанный в данном документе, может происходить от любого позвоночного животного, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). Данный термин включает «полноразмерный» непротессированный CD3 (например, непротессированный или немодифицированный CD3 ϵ или CD3 γ), а также любую форму CD3, которая образуется в результате процессинга в клетке. Данный термин также включает варианты CD3 природного происхождения, включая, например, сплайсинговые варианты или аллельные варианты. Описанный в данном документе направленный домен против CD3 может специфически связываться с диким типом CD3E человека (№ доступа NCBI: NM_000733.3).

[0052] Используемый в контексте данного документа термин «Т-клетка» определяется как лимфоцит, происходящий из тимуса, который участвует во множестве клеточно-опосредованных иммунных реакций. Используемый в контексте данного документа термин «регуляторная Т-клетка» относится к Т-клетке CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. «Трег» представляет собой аббревиатуру, используемую в данном документе для обозначения регуляторной Т-клетки.

[0053] Используемый в контексте данного документа термин «Т-хелпер» относится к Т-клетке CD4⁺; Т-хелперы распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса II. Существует по меньшей мере два типа Т-хелперов: Th1 и Th2, которые продуцируют разные цитокины. Т-хелперы при активации становятся CD25⁺, но лишь временно становятся FoxP3⁺.

[0054] Используемый в контексте данного документа термин «цитотоксическая Т-клетка» относится к Т-клетке CD8⁺; цитотоксические Т-клетки распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса I.

[0055] Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепей антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные области или домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) антигенсвязывающего белка, такого как антитело, могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и /или форме структурно определенных петель), такие как гипервариабельные области (HVR) или области, определяющие комплементарность (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Как правило, в каждой вариабельной области тяжелой цепи имеется три HVR (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3) или CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3) или CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) в каждой вариабельной области легкой цепи. В данной области техники известно, что «каркасные области» и «FR» относятся к частям вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, не являющихся HVR или CDR. В общем, имеется четыре FR в каждой вариабельной области полноразмерной тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой вариабельной области полноразмерной легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). В рамках каждой VH и VL, три HVR или CDR и четыре FR обычно расположены от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, HVR1, FR2, HVR2, FR3, HVR3, FR4 в случае HVR, или FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 в случае CDR (см. также Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.*, 195, 901-917 (1987)). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, могут быть выделены с использованием домена VH или VL из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH, соответственно. См., например, Portolano et al. *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

[0056] Используемый в контексте данного документа термин «вариабельная область тяжелой цепи» (VH) относится к области, содержащей HVR-H1, FR-H2, HVR-H2, FR-H3 и HVR-H3 тяжелой цепи. Например, вариабельная область тяжелой цепи может содержать CDR-H1, FR-H2, CDR-H2, FR-H3 и CDR-H3 тяжелой цепи. В некоторых аспектах вариабельная область тяжелой цепи также содержит по меньшей мере часть FR-H1 и/или по меньшей мере часть FR-H4.

[0057] Используемый в контексте данного документа термин «константная область тяжелой цепи» относится к области, содержащей по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Неограничивающие иллюстративные константные

области тяжелой цепи включают γ , δ и α . Неограничивающие иллюстративные константные области тяжелой цепи также включают ϵ и μ .

[0058] Используемый в контексте данного документа термин «вариабельная область легкой цепи» (VL) относится к области, содержащей HVR-L1, FR-L2, HVR-L2, FR-L3 и HVR-L3 легкой цепи. В некоторых аспектах вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, FR-L2, CDR-L2, FR-L3 и CDR-L3 легкой цепи. В некоторых аспектах вариабельная область легкой цепи также содержит FR-L1 и/или FR-L4.

[0059] Используемый в контексте данного документа термин «константная область легкой цепи» относится к области, содержащей константный домен легкой цепи, C_L . Неограничивающие иллюстративные константные области легкой цепи включают λ и κ .

[0060] Используемый в контексте данного документа термин «легкая цепь» (LC) относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере вариабельную область легкой цепи с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых аспектах легкая цепь содержит по меньшей мере часть константной области легкой цепи. Используемый в контексте данного документа термин «полноразмерная легкая цепь» относится к полипептиду, содержащему вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи с лидерной последовательностью или без нее.

[0061] Используемый в контексте данного документа термин «антитело» относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина (Ig), то есть молекулам, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается (иммунореагирует) с антигеном. «Антигенсвязывающая часть» антитела или полипептида (также называемая «антигенсвязывающим фрагментом») относится к одной или более частям антитела или полипептида, которые специфически связываются с целевым антигеном. Антитела и антигенсвязывающие части включают, но не ограничиваются, поликлональные, моноклональные, химерные доменные антитела, одноцепочечные антитела, Fab- и F(ab')₂-фрагменты, scFv, Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты однодоменного антитела (sdAb), переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (DART), иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом; выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), и комбинацию двух или более выделенных CDR, которые необязательно могут быть соединены синтетическим линкером, и экспрессионную библиотеку Fab. Антитело нечеловеческого происхождения, например антитело верблюдовых, может быть гуманизировано рекомбинантными способами для снижения его иммуногенности у человека.

[0062] Последовательности CDR, указанные в данном документе, определяются в

соответствии с системой нумерации по Кабату (т.е. «CDR по Кабату»), как описано в Abhinandan, K. R. and Martin, A.C.R. (2008) "Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains", *Molecular Immunology*, 45, 3832-3839, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. CDR по Кабату определяются как CDR-L1: остатки L24-L34; CDR-L2: остатки L50-L56; CDR-L3: остатки L89-L97; CDR-H1: остатки H31-H35; CDR-H2: остатки H50-H65; и CDR-H3: остатки H95-H102, где «L» относится к вариабельному домену легкой цепи, а «H» относится к вариабельному домену тяжелой цепи.

[0063] Фразы «специфически связывает» или «иммуноспецифически связывает» означают, что антитело реагирует с одной или более антигенными детерминантами желаемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с ними с гораздо более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$), причем меньшее значение K_d означает большую аффинность. Иммунологические связывающие свойства выбранных полипептидов можно количественно оценить с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, причем эти скорости зависят от концентраций компонентов комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые одинаково влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как «константу скорости ассоциации» (k_{on}), так и «константу скорости диссоциации» (k_{off}) можно определить путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (См. *Nature* 361:186-87 (1993)). Соотношение k_{off}/k_{on} позволяет исключить все параметры, не связанные с аффинностью, и оно равно константе диссоциации K_d . (См., как правило, Davies et al. (1990) *Annual Rev Biochem* 59:439-473). В некоторых аспектах домен, направленный на антиген, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с соответствующим антигеном, демонстрируют K_d менее около 10 мкМ, и в некоторых аспектах менее около 100 мкМ по отношению к целевому антигену.

[0064] Иммуноглобулин может происходить из любого из общеизвестных изотипов, включая, но не ограничиваясь, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изотип» относится к классу или подклассу антитела (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

[0065] Антитело или полипептид «против антигена» относится к антителу или полипептиду, которые специфически связываются с антигеном. Например, полипептид

против CD3 специфически связывается с CD3.

[0066] Используемые в контексте данного документа термины «ММ» и «маскирующий фрагмент» используются взаимозаменяемо для обозначения пептида, который препятствует связыванию направленного домена с соответствующим антигеном. Например, ММ1 представляет собой пептид, который препятствует связыванию первого направленного домена с первой мишенью, а ММ2 представляет собой пептид, который препятствует связыванию второго направленного домена со второй мишенью. Степень, в которой маскирующий фрагмент препятствует связыванию направленного домена с соответствующей мишенью, количественно определяется его «эффективностью маскировки». Термины «эффективность маскировки» и «МЕ» используются в контексте данного документа взаимозаменяемо для обозначения соотношения, которое определяется следующим образом:

$$ME = \frac{EC50, \text{ активированного ГБПК (т.е. не расщепленного протеазой)}}{EC50, \text{ активированного ГБПК}}$$

[0067] Используемые в контексте данного документа термины «СМ» и «расщепляемый фрагмент» используются взаимозаменяемо для обозначения пептидного субстрата, который чувствителен к расщеплению протеазой, активация которой повышается в опухолевых клетках. Опосредованное протеазой расщепление СМ приводит к высвобождению ММ из структуры активированного ГБПК, тем самым образуя «активированный» (т.е. немаскированный) продукт, причем каждый соответствующий «активированный» (т.е. немаскированный) первый и/или второй направленный домен может свободно связывать свою соответствующую мишень.

[0068] Используемый в контексте данного документа термин «выделенный полинуклеотид» относится к рекомбинантному полинуклеотиду или полинуклеотиду синтетического происхождения, который в силу своего происхождения (1) не связан со всем или с частью полинуклеотида, в котором «выделенный полинуклеотид» встречается в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе в виде части более крупной последовательности. Полинуклеотиды согласно данного изобретения включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие первый, второй и третий полипептиды.

[0069] Используемый в контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к положениям, в которых описываемые таким образом компоненты находятся во взаимосвязи, обеспечивающей их функционирование предполагаемым для них образом. Регуляторная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, связывается таким образом, что экспрессия

кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с регуляторными последовательностями.

[0070] Как обсуждалось в данном документе, незначительные вариации в аминокислотных последовательностях, описанных в данном документе (т.е. каждой референтной последовательности), рассматриваются как охватываемые данным изобретением, при условии, что полученная аналогичная последовательность сохраняет по меньшей мере 75%, более предпочтительно, по меньшей мере, 80%, 90%, 95% и наиболее предпочтительно 99% идентичности последовательности с референтной последовательностью. В частности, предложены консервативные замены аминокислот. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, родственных по природе своих боковых цепей. Аминокислоты можно разделить на семейства: (1) кислые аминокислоты представляют собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты представляют собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты представляют собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты представляют собой глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, принадлежащие к семейству алифатических гидроксилсодержащих аминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, принадлежащие к семейству амидсодержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, принадлежащие к семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, принадлежащие к семейству ароматических аминокислот. Например, в описанных в данном документе полипептидах и полипептидных комплексах ГБПК разумно ожидать, что выделенная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать существенного влияния на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту внутри CDR или каркасной области. Приводит ли изменение аминокислоты к образованию функционального полипептидного комплекса, можно легко определить путем анализа специфической активности полученной молекулы, т.е. полученной аналогичной последовательности. В данном документе подробно описаны такие анализы. Предпочтительные амино- и карбокси-концы аналогичных последовательностей расположены вблизи границ функциональных доменов.

Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или запатентованными базами данных последовательностей. Предпочтительно используют компьютеризированные способы сравнения для идентификации фрагментов последовательностей или доменов предсказанной конформации белка, которые встречаются в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые складываются в известную трехмерную структуру. Bowie et al. *Science* 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут распознавать фрагменты последовательностей и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов согласно данного изобретения.

[0071] Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики референтной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна иметь тенденцию к разрыву спирали, которая возникает в референтной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, характеризующих референтную последовательность). Примеры признанных в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

[0072] Иллюстративные аминокислотные замены также включают те, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу в областях активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, отличных от расщепляемого линкера, содержащего CM, (2) уменьшают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания с антигеном и (5) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогичных последовательностей. Такие аминокислотные замены можно идентифицировать с использованием известных способов мутагенеза и/или способов направленной молекулярной эволюции с использованием описанных в данном документе анализов. См., например, международную публикацию № WO 2001/032712, пат. США № 7,432,083, публ. заявки на пат. США №2004/0180340 и пат. США № 6,297,053, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки. Аналогичные последовательности можно получить путем введения одной или более мутаций в референтную последовательность в активируемый ГБПК. Например, в

референтной последовательности могут быть сделаны одиночные или множественные аминокислотные замены (предпочтительно в части полипептида вне домена(ов), образующего межмолекулярные контакты).

[0073] В контексте данного документа, под «фармацевтически приемлемым» или «фармакологически совместимым» подразумевается материал, который не является биологически или иным образом нежелательным, например, материал может быть включен в фармацевтическую композицию, вводимую индивидууму или субъекту, не вызывая каких-либо значимых нежелательных биологических явлений или вредного взаимодействия с любыми другими компонентами композиции, в которой он содержится. Фармацевтически приемлемые носители или эксципиенты, например, соответствуют необходимым стандартам токсикологических и производственных испытаний и/или включены в Руководство по неактивным ингредиентам, подготовленного Управлением за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

[0074] Используемый в контексте данного документа термин «пациент» включает любого пациента, страдающего онкологическим заболеванием. Термины «субъект» и «пациент» используются в контексте данного документа взаимозаменяемо.

[0075] Термины «онкологическое заболевание», «раковое» или «злокачественное» относятся или описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры онкологических заболеваний включают, например, меланому, такую как неоперабельная или метастатическая меланома, лейкоз, лимфому, бластому, карциному и саркому. Более конкретные примеры таких видов онкологических заболеваний включают хронический миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с филадельфийской хромосомой (Ph⁺ ALL), плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почек, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатома, рак молочной железы, рак толстой кишки, а также рак головы и шеи, рак желудка, герминогенную опухоль, детскую саркому, синоназальную лимфому из натуральных киллеров, множественную миелому, острый миелогенный лейкоз (ОМЛ) и хронический лимфоцитарный лейкоз (ХМЛ).

[0076] Используемый в контексте данного документа термин «опухоль» относится к любому скоплению ткани, возникающему в результате избыточного роста или пролиферации клеток, как доброкачественному (нераковому), так и злокачественному

(раковому), включая предраковые поражения.

[0077] «Введение» относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтический агент, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Пути введения описанных в данном документе составов включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемая в контексте данного документа фраза «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного введения, как правило, осуществляемые путем инъекции, и включают, но не ограничиваются, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подэпидермисную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых аспектах состав вводят непарентеральным путем, в некоторых аспектах - перорально. Другие непарентеральные пути включают местный, эпидермальный путь введения или введение через слизистые оболочки, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также можно осуществлять, например, один раз, множество раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов.

[0078] «Лечение» или «терапия» субъекта относится к любому типу вмешательства или процессу, выполняемого по отношению к субъекту, или введению активного агента субъекту с целью обращения вспять, облегчения, улучшения состояния, ингибирования, замедления прогрессирования, замедления развития, уменьшения тяжести или рецидива симптома, осложнения или состояния, или биохимических признаков, связанных с заболеванием.

[0079] Используемый в контексте данного документа термин «эффективное лечение» относится к лечению, вызывающему благоприятный эффект, например, улучшение по меньшей мере одного симптома заболевания или расстройства. Положительный эффект может принимать форму улучшения по сравнению с исходным уровнем, т.е. улучшения по сравнению с измерением или наблюдением, проведенным до начала терапии согласно указанного способа. Положительный эффект может также принимать форму прекращения, замедления, уменьшения или стабилизации вредного прогрессирования маркера опухоли. Эффективное лечение может означать облегчение по меньшей мере одного симптома, связанного с онкологическим заболеванием. Такое эффективное лечение может, например, уменьшить боль пациента, уменьшить размер

и/или количество поражений, может уменьшить или предотвратить метастазирование опухоли и/или может замедлить рост опухоли.

[0080] Термин «эффективное количество» относится к количеству агента, которое обеспечивает желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этот результат может представлять собой снижение, улучшение, облегчение, уменьшение, замедление и/или смягчение одного или более признаков, симптомов или причин заболевания, или любое другое желаемое изменение биологической системы. В отношении солидной опухоли, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы вызвать сокращение объема опухоли и/или уменьшить скорость роста опухоли (например, для подавления роста опухоли) или предотвратить или задержать другую нежелательную пролиферацию клеток. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предупреждения или задержки развития рецидива опухоли. Эффективное количество можно вводить в одном или более введениях. Эффективное количество препарата или композиции может: (i) снижать количество раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли; (iii) ингибировать, задерживать, замедлять до некоторой степени и останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать, замедлять до некоторой степени и останавливать метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предупреждать или вызывать отсрочку возникновения и/или рецидива опухоли; и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или более симптомов, связанных с онкологическим заболеванием.

[0081] «Иммунный ответ» относится к действию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, естественных киллеров (NK-клеток), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток и нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью, селезенкой и/или костным мозгом (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к избирательному нацеливанию, связыванию, повреждению, уничтожению и/или устранению из тела позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других аномальных клеток, или, в случаях аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных человеческих клеток или тканей.

[0082] Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее либо одну, либо обе, либо любую комбинацию из них. Используемые в контексте данного документа существительные в единственном числе следует понимать как относящиеся к «одному или более» из любого заявленного или перечисленного

компонента.

[0083] Кроме того, используемый в контексте данного документа термин «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим компонентом или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в контексте фразы данного документа, такой как «А и/или В», предназначен для включения «А и В», «А или В», «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в контексте фразы, такой как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А,В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно).

[0084] Следует понимать, что везде, где в данном документе аспекты описаны с термином «содержащий», в других случаях также предусмотрены аналогичные аспекты, описанные с применением терминов «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

[0085] Термин «около» относится к значению или составу, которые находятся в пределах допустимого диапазона погрешностей для конкретного значения или состава, как определено специалистом в данной области техники, что будет зависеть, в частности, от того, как значение или состав измеряются или определяются, то есть от ограничений системы измерения. Например, «около» или «состоящий по существу из» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. Альтернативно, «около» или «состоящий по существу из» может означать диапазон до 10% или 20% (т.е. $\pm 10\%$ или $\pm 20\%$). Например, около 3 мг может включать любое количество от 2,7 мг до 3,3 мг (для 10%) или от 2,4 мг до 3,6 мг (для 20%). Более того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать величину до одного порядка или до 5-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения указаны конкретные значения или составы, если не указано иное, значение слова «около» следует предполагать находящимся в пределах допустимого диапазона ошибок для этого конкретного значения или состава.

[0086] Как описано в данном документе, любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или диапазон целочисленных значений следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, при необходимости, их дроби (например, одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иное.

[0087] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в контексте данного документа, имеют то же значение, что и общедоступное обычному специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC

Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 5th ed., 2013, Academic Press; и the Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, Oxford University Press, специалисту предложен общий словарь многих терминов, используемых в данном раскрытии.

[0088] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их принятой форме *Système International de Unites (SI)*. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на спецификацию в целом. Соответственно, определенные выше термины более полно определены посредством ссылки на описание изобретения в целом.

[0089] Схематические представления активируемых полипептидов согласно данного изобретения, например, на Фиг. 1, не являются эксклюзивными. Другие элементы последовательности, такие как линкеры, спейсеры и сигнальные последовательности, могут присутствовать до, после или между перечисленными элементами последовательности в таких схематических представлениях. Также следует понимать, что MM и CM могут быть присоединены к VH антитела или полипептида вместо VL антитела или полипептида, и наоборот.

[0090] Более подробно различные аспекты данного изобретения описаны в следующих подразделах.

Активируемый Гетеромультимерный Биспецифический Полипептидный Комплекс Против EGFR и CD3

[0091] Данное изобретение относится к активируемому гетеромультимерному биспецифическому полипептиду (ГБПК) против EGFR и CD3, содержащему: (a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) и первый вариабельный домен легкой цепи (VL1), причем VH1 и VL1 вместе образуют домен, нацеленный на кластер дифференциации Т-клеток (CD3), который специфически связывает полипептид CD3, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1), (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1), (iv) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1); (b) второй полипептид, содержащий (i) второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), причем VH2 и VL2 вместе образуют домен, нацеленный на EGFR, который специфически связывает EGFR, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), и (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2); и (c) третий полипептид, который (i) содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и (ii) не содержит вариабельный домен иммуноглобулина, и при этом MM1 представляет собой пептид, который препятствует связыванию CD3-

направленного домена с полипептидом CD3, а MM2 представляет собой пептид, который препятствует связыванию EGFR-направленного домена с EGFR. Как продемонстрировано в приведенных в данном документе примерах, активируемые ГБПК по данному изобретению обеспечивают преимущества перед активируемыми или маскированными молекулами, известными в данной области техники, включая устойчивость к агрегации, низкие уровни агрегации, зависящей от концентрации, что особенно полезно во время очистки, когда могут образовываться относительно высокие концентрации активируемого продукта ГБПК, высокую эффективность при активации и улучшенную противоопухолевую активность (при активации).

[0092] Как описано в данном документе выше, среди компонентов, присутствующих в первом полипептиде активируемого ГБПК против EGFR и CD3, ГБПК представляет собой домен, нацеленный на CD3 Т-клетки, содержащий одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает полипептид CD3. В некоторых аспектах полипептид CD3 представляет собой эпислон-цепь CD3. В некоторых аспектах scFv (scFv против CD3), предложенный в данном документе, содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и переменный домен легкой цепи (VL1).

[0093] VH1 содержит CDR1 переменной области тяжелой цепи (CDR1 VH, также называемую в данном документе CDRH1), CDR2 переменной области тяжелой цепи (CDR2 VH, также называемую в данном документе CDRH2) и CDR3 переменной области тяжелой цепи (VH CDR3, также называемую в данном документе CDRH3), VL1 содержит CDR1 переменной области легкой цепи (CDR1 VL, также называемую в данном документе CDRL1), CDR2 переменной области легкой цепи (CDR2 VL, также называемую в данном документе CDRL2) и CDR3 переменной области легкой цепи (CDR3 VL, также называемую в данном документе CDRL3).

[0094] Активируемый ГБПК против EGFR и CD3, предложенный в данном документе, содержит маскирующий фрагмент (MM). Используемые в контексте данного документа термины «маскирующий фрагмент» и «MM» используются взаимозаменяемо для обозначения пептида, который при расположении проксимальнее направленного домена препятствует связыванию направленного домена с его мишенью. В некоторых аспектах MM представляет собой аминокислотную последовательность, которая соединена или иным образом присоединена к активируемому ГБПК против EGFR и CD3, и присоединена к активируемому ГБПК против EGFR и CD3 таким образом, что каждый MM снижает способность активируемого ГБПК против EGFR и CD3 специфически связываться со своими мишенями. В некоторых аспектах MM1 предотвращает или снижает способность активируемого ГБПК против EGFR и CD3 специфически

связываться с CD3. В некоторых аспектах MM2 предотвращает или снижает способность активируемого ГБПК против EGFR и CD3 специфически связываться с EGFR. В некоторых аспектах MM специфически связывается с антиген-направленным доменом(ами). Подходящие MM можно идентифицировать с использованием любого из множества известных способов.

[0095] Например, маскирующие фрагменты против EGFR, которые подходят для использования в практике реализации данного изобретения в связи с различными доменами связывания антител, включают любые, известные в данной области техники, в том числе те, которые описаны, например, в публикациях РСТ № WO 2013/163631, WO 2015/013671, WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. Маскирующие фрагменты против CD3, подходящие для использования в практике реализации данного изобретения, включают любые из тех, которые известны в данной области техники, включая описанные, например, в WO2013/163631, WO 2015/013671, WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0096] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, предложенного в данном документе, MM1 и/или MM2 содержат от 5 аминокислот до около 40 аминокислот или в рамках любого диапазона между ними, включающего как 5 аминокислот, так и 40 аминокислот. Используемый в контексте данного документа термин «MM1» обозначает маскирующий фрагмент для CD3-направленного домена. Используемый в контексте данного документа термин «MM2» обозначает маскирующий фрагмент для EGFR-направленного домена.

[0097] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, предложенного в данном документе, MM1 выбран из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 1, 67, 68, 69, 70, 71 и 72. В некоторых аспектах MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых аспектах MM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых аспектах MM1 содержит последовательность SEQ ID NO:1 и MM2 содержит последовательность SEQ ID NO:13. В некоторых аспектах MM1 содержит последовательность SEQ ID NO:72 и MM2 содержит последовательность SEQ ID NO:13.

[0098] В некоторых аспектах данного изобретения одноцепочечный вариабельный фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD

(SEQ ID NO:4), и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и переменный домен легкой цепи (VL1), содержащий (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8).

[0099] В некоторых аспектах данного изобретения VH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9. В некоторых аспектах данного изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10. В конкретном аспекте данного изобретения scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11 (которая содержит последовательности SEQ ID NO: 9 и 10).

[0100] В некоторых аспектах данного изобретения VH1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:9. В некоторых аспектах данного изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:10.

[0101] В некоторых аспектах данного изобретения первый полипептидный одноцепочечный переменный фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4), (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5), и содержит переменный домен тяжелой цепи, который на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичный последовательности SEQ ID NO:9.

[0102] В некоторых аспектах данного изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность, которая содержит (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), (ii) CDR2 VL, содержащую

аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8), причем аминокислотная последовательность VL1 на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:10.

[0103] В некоторых аспектах, когда VH1 содержит: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4), и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и VL1 содержит (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7) и (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8), MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

[0104] В альтернативном аспекте одноцепочечный вариабельный фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 128), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 129), и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130); и вариабельный домен легкой цепи (VL1), содержащий (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:131), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO:132) (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO:133).

[0105] В некоторых из этих аспектов данного изобретения VH1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:134. В некоторых аспектах данного изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:135. В конкретном аспекте данного изобретения scFv содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:122 (которая содержит последовательности SEQ ID NO: 134 и 135).

[0106] В некоторых аспектах данного изобретения VH1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей

мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:134. В некоторых аспектах данного изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:135.

[0107] В некоторых аспектах данного изобретения первый одноцепочечный переменный фрагмент полипептида содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 128), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 129), (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130), и содержит переменный домен тяжелой цепи на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентичный последовательности SEQ ID NO:135.

[0108] В некоторых аспектах данного изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность, которая содержит (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:131), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO:132), (iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO:133), причем аминокислотная последовательность VL1 на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:135.

[0109] В некоторых из этих аспектов, когда VH1 содержит (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO:128), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:129) и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130); и VL1 содержит (i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:131), (ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO:132), (iii)

CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO:133), MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

[0110] EGFR-направленный домен содержит VH2 (расположенный внутри 1^{го} полипептида) и VH1 (расположенный внутри второго полипептида). VH2 содержит CDR1 варибельной области тяжелой цепи (CDR1 VH, также называемую в данном документе CDRH1), CDR2 варибельной области тяжелой цепи (CDR2 VH, также называемую в данном документе CDRH2) и CDR3 варибельной области тяжелой цепи (VH CDR3, также называемую в данном документе CDRH3), VL2 содержит CDR1 варибельной области легкой цепи (CDR1 VL, также называемую в данном документе CDRL1), CDR2 варибельной области легкой цепи (CDR2 VL, также называемую в данном документе CDRL2) и CDR3 варибельной области легкой цепи (CDR3 VL, также называемую в данном документе CDRL3).

[0111] В некоторых аспектах данного изобретения EGFR-направленный варибельный домен тяжелой цепи (VH2) содержит: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO:15), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность VIWSGGNTDYNTPTFS (SEQ ID NO:16) и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:17).

[0112] В некоторых аспектах данного изобретения VH2 содержит: (i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO:15), (ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность VIWSGGNTDYNTPTFS (SEQ ID NO:16). и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:17, причем аминокислотная последовательность VH2 на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:21

[0113] В некоторых аспектах данного изобретения VH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

[0114] В некоторых конкретных аспектах данного изобретения активируемый ГБПК содержит первый полипептид, содержащий MM1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1; VH1, содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; VL1, содержащий CDR1 VL,

содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8; и VH2, содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. В некоторых из этих активируемых ГБПК второй полипептид содержит MM2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, и VL2, содержащий CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19 и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

[0115] В других конкретных аспектах данного изобретения активируемый ГБПК содержит первый полипептид, содержащий MM1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72; VH1, содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:128, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:129, и CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:130; VL1, содержащий CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:131, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:132, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:133; и VH2, содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. В некоторых из этих активируемых ГБПК второй полипептид содержит MM2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13, и VL2, содержащий CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:18, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19 и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20.

[0116] Как описано выше, первый полипептид дополнительно содержит мономерный Fc-домен (Fc1). Fc-домены, известные в данной области техники, подходят для использования в активируемых ГБПК по данному изобретению и более подробно описаны ниже.

[0117] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, Fc1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на

по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:23. В некоторых аспектах Fc1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23. В некоторых аспектах Fc1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:24.

[0118] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи, расположенный между VH2 и Fc1.

[0119] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина, расположенную между VH2 и Fc1. В некоторых аспектах, когда присутствует домен CH1, шарнирная область иммуноглобулина расположена между доменом CH1 и доменом Fc1.

[0120] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый полипептид имеет структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца:

MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-шарнирная область-Fc1, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь.

[0121] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит один или более необязательных линкеров, которые описаны в данном документе ниже более подробно.

[0122] В некоторых аспектах данного изобретения активируемый ГБПК против EGFR и CD3 содержит первый полипептид, содержащий Fc1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 24. В некоторых аспектах данного изобретения активируемый ГБПК против EGFR и CD3 содержит первый полипептид, содержащий шарнирную область, имеющую последовательность Hinge-1 (SEQ ID NO:34) или Hinge-2 (SEQ ID NO:35).

[0123] В некоторых аспектах данного изобретения активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит второй полипептид, содержащий EGFR-направленный вариабельный домен легкой цепи (VL2), который содержит CDR1 VL, CDR2 VL, и CDR3 VL.

[0124] В некоторых аспектах в данном изобретении предложен активируемый ГБПК против EGFR и CD3, содержащий второй полипептид, содержащий EGFR-направленный вариабельный домен легкой цепи (VL2), содержащий: (i) CDR1, содержащую

аминокислотную последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO:18), (ii) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность YASESIS (SEQ ID NO:19), и (iii) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO:20).

[0125] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, второй полипептид содержит VL2, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO:22.

[0126] В некоторых аспектах данного изобретения VL2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:22.

[0127] В некоторых из описанных выше аспектов данного изобретения MM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

[0128] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, второй полипептид может содержать структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца: MM2-CM2-VL2, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь.

[0129] В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, описанного в данном документе, второй полипептид содержит один или более линкеров. В некоторых аспектах MM2 соединяется с CM2 через линкер.

[0130] В некоторых аспектах второй полипептид активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, дополнительно содержит линкер, содержащий от около 1 до около 20 аминокислот. Линкеры, подходящие для использования в контексте данного изобретения, обсуждаются более подробно ниже.

[0131] В некоторых аспектах второй полипептид дополнительно содержит константный домен легкой цепи (CL). Иллюстративные CL включают любые из известных в данной области техники. В некоторых аспектах второй полипептид содержит CL, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:25. В некоторых из этих аспектов второй полипептид имеет структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца: MM2-CM2-VL2-CL, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь.

[0132] В некоторых аспектах третий полипептид активируемого ГБПК, описанного в

данном документе, содержит мономерный Fc-домен (Fc2) и не содержит переменный домен иммуноглобулина.

[0133] В некоторых аспектах активируемый ГБПК против EGFR и CD3, описанный в данном документе, содержит третий полипептид, имеющий структурную организацию от амино-конца до карбокси-конца: шарнирная область-Fc2, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь. В некоторых аспектах третий полипептид содержит Fc2, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:28 (необязательно, с C-концевым лизином, т.е. SEQ ID NO:29). В одном аспекте третий полипептид содержит шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35, и Fc2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28 (необязательно, с C-концевым лизином, т.е. SEQ ID NO:29). В некоторых аспектах первый полипептид содержит шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34, и Fc1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23 (необязательно, с C-концевым лизином, т.е. SEQ ID NO:24).

[0134] Как указано выше, в некоторых аспектах третий полипептид может содержать линкер, например, между шарнирной областью и вторым Fc-доменом. Линкер может содержать любой из описанных в данном документе линкеров.

[0135] Активируемые ГБПК против EGFR и CD3 по данному изобретению активируются, когда расщепляемый фрагмент расщепляется протеазой, тем самым образуя активированный (т.е. немаскированный) гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (ГБПК) против EGFR и CD3, который способен связываться с EGFR и CD3. Для сравнения, активируемые ГБПК против EGFR и CD3 демонстрируют значительно меньшее связывание с EGFR и CD3 по сравнению с активированным гетеромультимерным биспецифическим полипептидом, поскольку активируемый ГБПК остается маскированным до тех пор, пока не будет активирован протеазами в окружении опухоли. Не желая вдаваться в теорию или механизм, типичные уровни активности протеазы в здоровых тканях, вероятно, снижаются из-за присутствия эндогенных ингибиторов и/или неблагоприятных условий pH протеазы, в то время как активность протеазы обычно регулируется в окружении опухоли за счет увеличения экспрессии протеаз, активации зимогена, снижения экспрессии ингибиторов или комбинации этих эффектов (см. Desnoyers et al., *Science Translational Medicine.org*, vol. 5, Issue 207 (October 2013), включенную в данный документ посредством ссылки).

[0136] Таким образом, эти активируемые ГБПК против EGFR и CD3 могут быть полезны при лечении субъекта, имеющего онкологическое заболевание, при котором

протеолитическая активность в микроокружении опухоли усиливается по сравнению с нормальной тканью и контролируется в нормальных тканях. Значительное снижение связывания активируемых ГБПК с EGFR и CD3 в нормальной ткани может позволить снизить побочные эффекты, связанные с взаимодействием ГБПК против EGFR и CD3 вне опухоли. В некоторых аспектах активируемый ГБПК против EGFR и CD3 содержит первый СМ и второй СМ (СМ1 и СМ2 соответственно).

[0137] В некоторых аспектах СМ содержит субстрат для протеазы, уровень экспрессии которой повышен в опухолевых клетках. В некоторых аспектах описанного в данном документе ГБПК СМ может содержать субстрат для двух или более протеаз (т.е. первой протеазы, второй протеазы, третьей протеазы и т.д.), активация которых повышается в опухолевых клетках. В литературе имеются сообщения о повышенных уровнях протеаз при ряде видов онкологических заболеваний, например, опухолях жидких тканей или солидных опухолях. См., например, La Rocca et al, (2004) British J. of Cancer 90(7): 1414-1421. Многочисленные исследования продемонстрировали корреляцию уровней aberrантных протеаз, например uPA, легумаина, МТ-SP1, матриксных металлопротеаз (ММР), в солидных опухолях. (См., например, Murthy R V, et al. "Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer," Clin Cancer Res. 11 (2005): 2293-2299; Nielsen B S, et al. "Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer," Lab Invest 81 (2001): 1485-1501; Look O R, et al. "In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin," J Histochem Cytochem. 51 (2003): 821-829). СМ может содержать субстрат для нескольких протеаз, например, субстрат для сериновой протеазы и второй другой протеазы, например, ММР. В некоторых аспектах СМ может содержать субстрат для более чем одной сериновой протеазы, например, матриптазы и/или uPA. В некоторых аспектах СМ может содержать субстрат для более чем одной ММР, например, ММР9 и ММР14.

[0138] В некоторых вариантах реализации данного изобретения каждый из СМ1 и СМ2 независимо содержит аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, представленной в Таблице 1 ниже.

Таблица 1. Иллюстративные Протеазы

ADAMS, ADAMTS, <i>например,</i> ADAM8 ADAM9 ADAM10	Цистеиновые протеиназы, <i>например,</i> Крузипаин Легумаин Отубаин-2	Сериновые протеазы, <i>например,</i> активированный протеин С Катепсин А Катепсин G
--	---	---

ADAM12		Химаза
ADAM15	KLK, <i>например,</i>	протеазы фактора свертывания крови (<i>например,</i> FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
ADAM17/TACE	KLK4	
ADAMDEC1	KLK5	
ADAMTS1	KLK6	
ADAMTS4	KLK7	
ADAMTS5	KLK8	
	KLK10	
	KLK11	
	KLK13	
	KLK14	
Аспартатные протеазы, <i>например,</i> BACE Реним		Эластаза
		Гранзим В
		Гуанидинобензоатаза
		HtrA1
		Эластаза нейтрофилов человека
		Лактоферрин
		Марапсин
		NS3/4A
		РАСЕ4
Аспарагиновые катепсины, <i>например,</i> Катепсин D Катепсин E	Металлопротеиназы, <i>например,</i> Меприн Неприлизин	Плазмин
	PSMA	PSA
	BMP-1	tPA
Каспазы, <i>например,</i> Каспаза-1		Тромбин
Каспаза-2		Триптаза
Каспаза-3	MMP, <i>например,</i>	uPA
Каспаза-4	MMP1	Трансмембранные сериновые протеазы типа II (TTSP), <i>например,</i> DESC1 DPP-4 FAP Хепсин Матриптаза-2 MT-SP1/Матриптаза TMPRSS2 TMPRSS3
Каспаза-5	MMP2	
Каспаза-6	MMP3	
Каспаза-7	MMP7	
Каспаза-8	MMP8	
Каспаза-9	MMP9	
Каспаза-10	MMP10	
Каспаза-14	MMP11	
	MMP12	
	MMP13	

Цистеиновые катепсины, <i>например,</i>	MMP14	TMPRSS4
Катепсин В	MMP15	
Катепсин С	MMP16	
Катепсин К	MMP17	
Катепсин L	MMP20	
Катепсин S	MMP23	
Катепсин V/L2	MMP24	
Катепсин X/Z/P	MMP26	
	MMP27	

[0139] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3 , описанного в данном документе, CM1 и/или CM2 включают от около трех до около 15 аминокислот. В некоторых аспектах CM1 и/или CM2 могут содержать два или более сайта расщепления. В некоторых аспектах два или более сайта расщепления на CM1 могут содержать субстрат для одной протеазы. В некоторых аспектах два или более сайта расщепления на CM2 могут содержать субстрат для двух или более протеаз. В некоторых аспектах первая протеаза и вторая протеаза представляют собой одну и ту же протеазу. В некоторых аспектах CM1 и CM2 содержат субстраты для одной и той же протеазы. В некоторых аспектах CM1 и CM2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах CM1 и CM2 содержат разные аминокислотные последовательности. В некоторых аспектах CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73. В некоторых аспектах CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых аспектах CM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых аспектах активируемый ГБПК против EGFR и CD3, описанный в данном документе, содержит CM1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, и CM2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых аспектах активируемые гетеромультимерные биспецифические полипептидные комплексы против EGFR и CD3, описанные в данном документе, содержат CM1, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73, и CM2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

[0140] Иллюстративные CM, которые подходят для использования в активируемых ГБПК против EGFR и CD3, описанных в данном документе, включают те, которые известны в данной области техники. Иллюстративные CM включают, но не

ограничиваются, те, которые описаны, например, в Таблице 2 и в международных публикациях №: WO 2009/025846, WO 2010/081173, WO 2015/013671, WO 2015/048329, WO 2015/116933, WO 2016/014974 и WO 2016/118629, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0141] В некоторых аспектах CM1 и/или CM2 содержат аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 2 ниже. В некоторых аспектах каждый из CM1 и CM2 независимо содержит аминокислотную последовательность, представленную в Таблице 2 ниже.

Таблица 2. Расщепляемые Фрагменты

CM SEQ ID NO.	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ CM
2	GLSGRSDDH
14	ISSGLLSGRSDQH
73	LSGRSDDH
74	ISSGLLSGRSDQH
75	LSGRSDNH
76	TSTSGRSANPRG
77	VHMPLGFLGP
78	AVGLLAPP
79	QNQALRMA
80	ISSGLLSS
81	ISSGLLSGRSDNH
82	LSGRSGNH
83	LSGRSDIH
84	LSGRSDQH
85	LSGRSDTH
86	LSGRSDYH
87	LSGRSDNP
88	LSGRSANP
89	LSGRSANI
90	LSGRSDNI
91	ISSGLLSGRSANPRG

92	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	AVGLLAPPSGRSANPRG
94	ISSGLLSGRSDDH
95	ISSGLLSGRSDIH
96	ISSGLLSGRSDTH
97	ISSGLLSGRSDYH
98	ISSGLLSGRSDNP
99	ISSGLLSGRSANP
100	ISSGLLSGRSANI
101	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
107	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	ISSGLLSGRSDNI
110	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	ISSGLLSGRSGNH
146	ALAHGLF
147	APRSALAHGLF
148	ISSGLLSGRSNI
149	LSGRSNI

[0142] В некоторых аспектах данного изобретения, когда активируемый ГБПК содержит (i) переменный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4), и CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и VL1, содержащий CDR1 VL, содержащую

аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8), CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2. В некоторых из этих активируемых ГБПК MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

[0143] В некоторых аспектах данного изобретения, когда активируемый ГБПК содержит (i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4), и CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и VL1, содержащий CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8), CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73. В некоторых из этих активируемых ГБПК MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1. В некоторых из этих активируемых ГБПК MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1, и CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73.

[0144] В конкретном аспекте данного изобретения активируемый ГБПК содержит:

(a) первый полипептид, содержащий первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1), первый вариабельный домен легкой цепи (VL1) и второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2), первый маскирующий фрагмент (MM1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый

Fc-домен (Fc1),

причем VH1 содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3),

(ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4),

(iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5),

причем VL1 содержит:

(i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6),

(ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и

(iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8);

причем VH2 содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO:15),

(ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность VIWSSGNTDYNTPFST (SEQ ID NO:16) и

(iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:17);

(b) второй полипептид, содержащий второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), второй маскирующий фрагмент (MM2) и второй расщепляемый фрагмент (CM2), причем VL2 содержит:

(i) CDR1 VL, содержащую последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO:18),

(ii) CDR2 VL, содержащую последовательность YASESIS (SEQ ID NO:19), и

(iii) CDR3 VL, содержащую последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO:20),

и

(c) третий полипептид, содержащий второй Fc-домен (Fc2),

причем Fc1 связывается с Fc2,

причем VH1 и VL1 вместе образуют направленный домен, который специфически связывает полипептид CD3,

причем VH2 и VL2 вместе образуют направленный домен, который специфически связывает EGFR,

причем третий полипептид не содержит вариабельный домен иммуноглобулина,

причем MM1 представляет собой пептид, который препятствует связыванию первого направленного домена с первой мишенью,

причем MM2 представляет собой пептид, который препятствует связыванию второго направленного домена со второй мишенью, и

причем каждый из CM1 и CM2 независимо содержит субстрат для протеазы, и причем третий полипептид не содержит вариабельный домен иммуноглобулина. В некоторых аспектах данного изобретения VH1 и VL1 расположены внутри scFv. В некоторых из этих аспектов MM1 содержит последовательность SEQ ID NO:1, CM1 содержит последовательность SEQ ID NO:73, MM2 содержит последовательность SEQ ID

NO:13, и CM2 содержит последовательность SEQ ID NO:14. В некоторых из этих аспектов второй полипептид дополнительно содержит константный домен легкой цепи (CL), и третий полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR).

[0145] В некоторых аспектах данного изобретения, когда активируемый ГБПК содержит (i) VH1, содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO: 128), CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:129) и CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130); и (ii) VL1, содержащий CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 131), CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 132), CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO:133), CM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73. В некоторых из этих активируемых ГБПК MM1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:72.

[0146] В некоторых из вышеописанных активируемых ГБПК первый полипептид дополнительно содержит VH2, содержащий CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:15, CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:16, CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:17. В некоторых из этих активируемых ГБПК второй полипептид содержит VL2, содержащий CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20. В некоторых из этих ГБПК третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28 (и не содержит переменный домен иммуноглобулина).

[0147] В конкретном аспекте данного изобретения активируемый ГБПК содержит:

(i) первый полипептид, содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1), первый переменный домен легкой цепи (VL1) и второй переменный домен тяжелой цепи (VH2), первый маскирующий фрагмент (MM1), первый расщепляемый фрагмент (CM1) и первый Fc-домен (Fc1),

причем VH1 содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность TYAMN (SEQ ID NO:128),

(ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:129),

(iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130);

причем VL1 содержит

(i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO:131),

(ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO:132), и

(iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность ALWYSNLWV (SEQ ID NO:133)

причем VH2 содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO:15),

(ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность VIWSGGNTDYNTPFTS (SEQ ID NO:16), и

(iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:17)

(b) второй полипептид, содержащий второй переменный домен легкой цепи (VL2), второй маскирующий фрагмент (MM2) и второй расщепляемый фрагмент (CM2), причем VL2 содержит:

(i) CDR1 VL, содержащую последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO:18),

(ii) CDR2 VL, содержащую последовательность YASESIS (SEQ ID NO:19), и

(iii) CDR3 VL, содержащую последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO:20),

и

(c) третий полипептид, содержащий второй Fc-домен (Fc2), причем Fc1 связывается с Fc2,

причем VH1 и VL1 вместе образуют направленный домен, который специфически связывает полипептид CD3,

причем VH2 и VL2 вместе образуют направленный домен, который специфически связывает EGFR,

причем третий полипептид не содержит переменный домен иммуноглобулина,

причем MM1 представляет собой пептид, который препятствует связыванию первого направленного домена с первой мишенью,

причем MM2 представляет собой пептид, который препятствует связыванию второго направленного домена со второй мишенью, и

причем каждый из CM1 и CM2 независимо содержит субстрат для протеазы, и причем третий полипептид не содержит вариабельный домен иммуноглобулина. В некоторых аспектах данного изобретения VH1 и VL1 расположены внутри scFv. В некоторых из этих аспектов MM1 содержит последовательность SEQ ID NO:72, CM1 содержит последовательность SEQ ID NO:73, MM2 содержит последовательность SEQ ID NO:13, и CM2 содержит последовательность SEQ ID NO:22. В некоторых из этих аспектов второй полипептид дополнительно содержит константный домен легкой цепи (CL), и третий полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR).

[0148] В некоторых аспектах активируемых ГБПК против EGFR и CD3 по данному изобретению первый полипептид содержит один или более линкеров между MM и CM. В некоторых аспектах MM1 соединяется с CM1 с помощью линкера. В некоторых аспектах первый полипептид содержит линкер между CM1 и VH2. В некоторых аспектах первый полипептид содержит линкер между VH2 и Fc1. В некоторых аспектах первый полипептид содержит по меньшей мере один линкер, который расположен между парой элементов, выбранных из группы, состоящей из MM1 и CM1; CM1 и scFv; scFv и VH2; и VH2 и Fc1. Линкеры, подходящие для применения в описанных в данном документе ГБПК против EGFR и CD3, как правило, представляют собой линкеры, которые обеспечивают гибкость модифицированных активируемых ГБПК против EGFR и CD3 для облегчения ингибирования связывания активируемого полипептида с мишенью. Такие линкеры, как правило, называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую длину, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, включая от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут иметь длину 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[0149] Примеры гибких линкеров включают глициновые полимеры (G)_n, глицин-сериновые полимеры (включая, например, (GS)_n, (GSGGS)_n и (GGGS)_n (SEQ ID NO:41 и SEQ ID NO:40 соответственно), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере одному), глицин-аланиновые полимеры, аланин-сериновые полимеры и другие гибкие линкеры, известные в данной области техники. Глициновые и глицин-сериновые полимеры относительно неструктурированы и поэтому могут служить нейтральным соединением между компонентами. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству phi-psi, чем даже аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem.

11173–142 (1992)). Обычному специалисту в данной области техники понятно, что полипептиды ГБПК могут содержать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры.

[0150] В некоторых аспектах активируемые ГБПК против EGFR и CD3 содержат одну или более линкерных последовательностей, расположенных в первом, втором и/или третьем полипептидах. Например, в первом полипептиде линкер расположен между MM1 и CM1, между варибельным доменом тяжелой цепи и доменом CH1, между доменом CH1 и шарнирной областью, если оба присутствуют, и/или между шарнирной областью, если присутствует, и первым Fc-доменом. Во втором полипептиде, который описан в другом месте данного документа, линкер может присутствовать, например, между MM2 и CM2, между CM2 и варибельным доменом легкой цепи и/или между варибельным доменом легкой цепи и CL. В третьем полипептиде, который описан в другом месте данного документа, линкер может присутствовать, например, между доменом CH1 и вторым Fc-доменом, между доменом CH1 и шарнирной областью и/или между шарнирной областью и вторым Fc-доменом.

[0151] В некоторых аспектах активируемых ГБПК против EGFR и CD3, описанных в данном документе, MM1 связан с CM1 через линкер L1. В некоторых аспектах MM2 связан с CM2 через линкер L2. В некоторых аспектах аминокислотные последовательности L1 и L2 являются одинаковыми. В некоторых аспектах линкер выбран из группы, состоящей из: (i) линкера на основе глицина-серина, выбранного из группы, состоящей из (GS) n , где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, (GGS) n , где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), (GGGS) n (SEQ ID NO:40), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), (GGGGS) n (SEQ ID NO:126), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), (GSGGS) n (SEQ ID NO:41), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10) GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:12), GGSG (SEQ ID NO:42), GGSGG (SEQ ID NO:43), GSGSG (SEQ ID NO:44), GSGGG (SEQ ID NO:45), GGGSG (SEQ ID NO:46), и GSSSG (SEQ ID NO:47), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO:48), GGGGSGS (SEQ ID NO:49), GGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID NO:50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGS (SEQ ID

NO:51), GGGGS (SEQ ID NO:52), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:53), GGGGS (SEQ ID NO:54), GGGSGGGGS (SEQ ID NO:55), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56), GSSGSGGSGG (SEQ ID NO:57), GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:58), GGGSSGGS (SEQ ID NO:127) и GS; и (ii) линкера, содержащего глицин и серин, и по меньшей мере один из лизина, треонина или пролина, выбранного из группы, состоящей из GSTSGSGKPGSSEGST (SEQ ID NO:59), SKYGPPCPPCPAPEFLG (SEQ ID NO:60), GGSLLDPKGGGS (SEQ ID NO:61), PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (SEQ ID NO:62), GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO:63), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:64), GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO:65), и GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:66).

[0152] В некоторых аспектах данного изобретения активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 может содержать компоненты в дополнение к описанным выше. Такие компоненты могут включать спейсер. Используемый в контексте данного документа термин «спейсер» относится к аминокислотному остатку или пептиду, встроенному в свободный конец первого, второго и/или третьего полипептида. Спейсеры, которые подходят для использования в практике реализации данного изобретения, включают любой отдельный аминокислотный остаток или любой пептид. Подходящие спейсеры включают любые из описанных, например, в международных публикациях №: WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[0153] В некоторых аспектах спейсер может содержать от около 1 аминокислоты до около 10 аминокислот (например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислот) или любое число аминокислот между данными значениями. В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, спейсер расположен на N-конце относительно MM1 и/или MM2. В некоторых аспектах спейсер имеет последовательность QGQSGS (SEQ ID NO:116). В некоторых аспектах спейсер имеет последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO:117). В некоторых аспектах спейсер имеет последовательность QGQSGS (SEQ ID NO:118). В некоторых аспектах спейсер имеет последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO:117).

[0154] В некоторых аспектах Fc-домены, используемые в качестве Fc1 и/или Fc2, представляют собой нативные Fc-домены (например, Fc-домен IgG1 человека или Fc-домен IgG4 человека). В некоторых аспектах данного изобретения Fc-домены, используемые в качестве Fc1 и/или Fc2, представляют собой мутированные формы нативной аминокислотной последовательности Fc. Мутации могут придавать желаемое полезное свойство активируемому гетеромультимерному биспецифическому полипептиду против EGFR и CD3 (и, соответственно, активированному ГБПК). Например, известно,

что определенные мутации в сайте связывания FcRn модулируют эффекторную функцию (см., например, Petkova et al., Intl. Immunol. 18:1759-1769, 2006; Deng et al., MAbs 4:101-109, 2012; and Olafson et al., Methods Mol. Biol. 907:537-556, 2012.). Целесообразно включение любых известных мутаций в Fc-домен, которые могут модулировать эффекторную функцию. Например, мутация N297A или N297G в аминокислотной последовательности Fc может быть использована для снижения эффекторных функций IgG (например, АЗКЦ и КЗЦ), что может снизить независимую от мишени токсичность (см., например, Lund et al., Mol. Immunol. 29:35-39, 1992). Fc-домены, подходящие для использования в контексте данного изобретения, включают любой Fc-домен, известный в данной области техники, включая, но не ограничиваясь, любой известный гетеродимерный Fc, такой как, например, с модификацией типа «выступ-во-впадину» и т.п.

[0155] В некоторых аспектах активируемый ГБПК против EGFR и CD3, описанный в данном документе, дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина. Подходящие шарнирные области включают любые известные шарнирные области. Например, шарнирная область любого из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) подходят для использования в контексте данного изобретения. Различные классы иммуноглобулинов имеют разные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации.

[0156] В некоторых аспектах шарнирные области первого полипептида Fc1 и третьего полипептида Fc2 содержат одну и ту же последовательность. В некоторых аспектах первый и второй Fc-домены (Fc1 и Fc2 соответственно) активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, представляют собой Fc-домены IgG1 или Fc-домены IgG4 (например, Fc-домен IgG1 человека или Fc-домен IgG4 человека) или их варианты. В некоторых аспектах Fc1 и/или Fc2 представляют собой модифицированные варианты нативного (например, человеческого) Fc-домена IgG1. В некоторых аспектах Fc1 и/или Fc2 представляют собой модифицированные варианты нативного (например, человеческого) Fc-домена IgG4.

[0157] В некоторых аспектах активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, Fc1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:23. В некоторых аспектах Fc1 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23 (необязательно с С-концевым лизином (т.е. SEQ ID NO:24)).

[0158] В некоторых аспектах третий полипептид дополнительно содержит мономерный Fc-домен (Fc2), который связывается с Fc1. В некоторых аспектах Fc2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 91%, на по меньшей мере 92%, на по меньшей мере 93%, на по меньшей мере 94%, на по меньшей мере 95%, на по меньшей мере 96%, на по меньшей мере 97%, на по меньшей мере 98% или на по меньшей мере 99% идентична последовательности SEQ ID NO:28. В некоторых аспектах Fc2 содержит последовательность SEQ ID NO:28 (необязательно с концевым лизином (т.е. SEQ ID NO:29)).

[0159] В некоторых аспектах третий полипептид содержит шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34 и 35.

[0160] Как описано в другом месте данного документа, формат или структура активируемого ГБПК против EGFR и CD3, описанного в данном документе, может включать любое количество необязательных дополнительных компонентов, включая линкеры и спейсеры. Исключительно в качестве примера, структуры, изложенные ниже, относятся к числу рассматриваемых аспектов. Однако аспекты, представленные ниже, не предназначены для ограничения раскрытия каким-либо образом.

[0161] В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит первый полипептид, имеющий структуру (I).

Структура первого полипептида (I):

(S1) – MM1 – (L1) – CM1 – L2 – VH1 – L3 – VL1 – (L4) – VH2 – (L5) – (CH11) – (L6) – (Hinge1) – (L7) – Fc1

где

- (S1) представляет собой необязательный спейсер;
- (L1), (L4), (L5), (L6) и (L7) каждый независимо представляет собой необязательный линкер,
- L2 и L3 представляют собой линкеры,
- (CH11) представляет собой необязательный домен CH1,
- (Hinge1) представляет собой необязательную шарнирную область,
- Fc1 представляет собой такой домен, как описано выше.

[0162] В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит второй полипептид, имеющий структуру (II).

Структура второго полипептида (II):

(S2) – (L8) - MM2 – (L9) – CM2 – (L10) – VL2 – (CL)

где

- (S2) представляет собой необязательный спейсер,
- (L8), (L9) и (L10) каждый независимо представляет собой необязательный линкер,
- MM2 представляет собой маскирующий фрагмент против EGFR, и
- VL2 представляет собой такой домен, как описано выше; и
- (CL) представляет собой необязательный константный домен легкой цепи.

[0163] В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит третий полипептид, имеющий структуру (III).

Структура третьего полипептида (III):

(S3) – (CH12) – (L11) – (Hinge2) – (L12) – Fc2

где

- (S3) представляет собой необязательный спейсер,
- (CH12) представляет собой необязательный домен CH1,
- (L11) и (L12) каждый независимо представляет собой необязательный линкер, и
- Fc2 представляет собой такой домен, как описано выше.

[0164] Линкеры, спейсеры, MM, CM, Fc-домены, домены CH1 (т.е. CH11 и CH12), шарнирные области и CL, которые подходят для использования в структурах (I), (II)) и (III), включают любые, известные в данной области техники или описанные в данном документе.

[0165] В некоторых аспектах данного изобретения активируемый ГБПК против EGFR и CD3 содержит первый, второй и третий полипептиды, причем (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30 (необязательно с С-концевым лизином и/или необязательно без спейсера (например, SEQ ID NO:120 (с концевым лизином и без спейсера)), (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31 (или SEQ ID NO:37 (без спейсера)), и (3) третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 (необязательно с С-концевым лизином (т.е. , SEQ ID NO:36) (и не содержит переменный домен иммуноглобулина). В некоторых аспектах данного изобретения активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит первый, второй и третий полипептид, причем: (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и (3) третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 (и не содержит переменный домен иммуноглобулина), как представлено в последовательности ниже.

[0166] В некоторых аспектах данного изобретения активируемый ГБПК против EGFR и CD3 содержит первый, второй и третий полипептиды, причем (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31, и (3) третий полипептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32. В некоторых аспектах данного изобретения активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит первый, второй и третий полипептиды, причем: (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и (3) третий полипептид состоит из или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32 и не содержит переменный домен иммуноглобулина, как представлено в последовательности ниже.

[0167] В некоторых аспектах данного изобретения активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 содержит первый, второй и третий полипептид, причем: (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:144, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:37, и (3) третий полипептид состоит или по существу состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO:32 и не содержит переменный домен иммуноглобулина, как представлено в последовательности ниже.

[0168] В первом полипептиде, представленном ниже, спейсерная последовательность заключена в скобки, маскирующая последовательность подчеркнута, линкеры выделены жирным шрифтом (линкер внутри scFv также выделен курсивом и подчеркнут) субстрат (т.е. расщепляемый фрагмент) выделен курсивом, и scFv (который связывает полипептид CD3) выделен курсивом и подчеркнут.

Первый Полипептид

[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSEVOLVESGG
GLVOPGGSLKLSCAAASGFTFNKYAMNWVROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFT
ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGG
GSGGGGSQTVVTOEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGOAPRGLIGGTKF
LAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQV
QLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIVSGGNTDYN
TPFTSRLSINKDNSKSKVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQY
GSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
KEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSLKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:30), необязательно с С-
концевым лизином и/или без спейсера (например, SEQ ID NO:137). В некоторых аспектах
первый полипептид имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:120 (без
спейсера, но с С-концевым лизином) или аминокислотную последовательность SEQ ID
NO:144 (без спейсера и без С-концевого лизина).

[0169] Во втором полипептиде, представленном ниже, спейсерная
последовательность заключена в скобки, маскирующая последовательность подчеркнута,
линкеры выделены жирным шрифтом, и субстрат (т.е. расщепляемый фрагмент) выделен
курсивом.

Второй Полипептид

[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSDQHGGGSQILLTQS*
PVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTD
FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31), необязательно без спейсера (SEQ
ID NO:37).

[0170] В третьем полипептиде, представленном ниже, шарнирная область выделена
жирным шрифтом и подчеркнута, а оставшаяся часть последовательности представляет
собой Fc2.

Третий Полипептид

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYD
TTPPVLDSDGSAFLYSLDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ
ID NO:32), необязательно с С-концевым лизином (SEQ ID NO:36).

Наборы

[0171] В данном документе предложены наборы, содержащие один или более
активируемых ГБПК против EGFR и CD3, описанных в данном документе, или
соответствующий ГБПК, причем наборы предназначены для диагностики или лечения. В
некоторых аспектах в данном документе предложена упаковка или набор, содержащий

один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами композиций, описанных в данном документе, такими как один или более активируемых ГБПК против EGFR и CD3, предложенных в данном документе, или их антиген-связывающий фрагмент, и, необязательно, инструкцию по применению. В некоторых аспектах наборы содержат композицию, описанную в данном документе, и любой диагностический, профилактический или терапевтический агент, например, описанный в данном документе.

Терапевтические Применения и Способы

[0172] В некоторых аспектах в данном документе представлены способы лечения заболеваний, например, онкологических заболеваний, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, активируемого ГБПК против EGFR и CD3 или соответствующего ГБПК, как описано в данном документе, или их фармацевтическую композицию, как описано в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе предложены способы ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, активируемого ГБПК против EGFR и CD3 или соответствующего ГБПК, как описано в данном документе, или их фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В некоторых аспектах данное изобретение относится к активируемому ГБПК против EGFR и CD3 или соответствующему ГБПК или фармацевтической композиции, предложенной в данном документе, для применения в качестве лекарственного средства. Обычно субъект представляет собой человека, но лечение также может быть применено к млекопитающим, отличным от человека, включая трансгенных млекопитающих.

[0173] Количество активируемых ГБПК или соответствующих ГБПК или их композиции, которое будет эффективным при лечении состояния, будет зависеть от природы заболевания. Точная доза, которую следует использовать в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести заболевания.

[0174] Неограничивающие примеры заболеваний включают: онкологические заболевания, ревматоидный артрит, болезнь Крона, СКВ, сердечно-сосудистые поражения, ишемию и т.д. Например, показания могут включать лейкозы, в том числе острый Т-клеточный лимфобластный лейкоз (Т-ОЛЛ), лимфобластные заболевания, включая множественную миелому, и солидные опухоли, включая рак легких, колоректальный рак, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы и рак молочной железы, включая рак молочной железы, негативный по триаде симптомов. Например, показания могут включать раковые заболевания костей или метастазы в кость, независимо от происхождения первичной опухоли; рак молочной железы, включая, но не ограничиваясь, например, ER/PR+-рак молочной железы, Her2+-рак молочной железы, рак

молочной железы, негативный по триаде симптомов; колоректальный рак, рак эндометрия; рак желудка; глиобластома; рак головы и шеи, такой как плоскоклеточный рак головы и шеи; рак пищевода; рак легких, такой как, но не ограничиваясь, например, немелкоклеточный рак легких; множественную миелому; рак яичника; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; саркому, такую как остеосаркома; рак почек, такой как, но не ограничиваясь, почечно-клеточная карцинома; и/или рак кожи, такой как, но не ограничиваясь, плоскоклеточный рак, базальноклеточную карциному и/или меланому.

Полинуклеотиды

[0175] В некоторых аспектах в данном документе предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую первый, второй и/или третий полипептид активируемого ГБПК против EGFR и CD3 по данному изобретению (соответственно называемые в данном документе «первым полинуклеотидом», «вторым полинуклеотидом» и «третьим полинуклеотидом»). Подходящие полинуклеотиды включают любые полинуклеотиды, которые кодируют любой из первого, второго и/или третьего полипептидов, описанных в данном документе, или их часть. Ниже представлен иллюстративный набор полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй и третий полипептид.

[0176] Полинуклеотиды по данному изобретению могут быть оптимизированы по последовательности для оптимального получения из организма-хозяина, выбранного для экспрессии, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептид против EGFR и CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент (например, тяжелую цепь, легкую цепь, домен VH или домен VL) для рекомбинантной экспрессии путем введения изменений кодонов (например, изменение кодона, кодирующего одну и ту же аминокислоту, вследствие вырождения генетического кода) и/или устранения ингибирующих областей в мРНК могут быть выполнены путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патенте США № 5,965,726; 6,174,666; 6,291,664; 6,414, 132; и 6,794,498, соответственно.

Нуклеиновые Кислоты

Полинуклеотид, кодирующий первый полипептид (SEQ ID NO:112)

CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACCCTCCATGCAC
ACСТААТАССGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGAT

CCGATGATCACGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTG
G TTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAAC
AAATACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTTCG
CAGAATCAGAAGCAAGTACAACA ACTATGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGG
ACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAAC
AACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGG
CAACAGCTACATCAGCTACTGGGCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTC
TAGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAG
TGGTCACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACCGTGACACTGACAT
GCGGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAG
AAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGG
AACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTC
TGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACA
GATGGGTGTTTCGGCGGAGGCCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGCCAG
GTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTGACGCCAAGCCAGAGCCTGTCTAT
CACCTGTACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGC ACTGGGTTCGACA
ATCTCCCGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCG
ACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCC
CAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGATAACCGCCATCTATTACTGC
GCTCGGGCCCTGACCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCTC
GTGACAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTTCCACTGGCTCCAGC
AGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTT
CCCGAGCCAGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACAC
ATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGT
GCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACAC
CTGTCTCCATGTCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCT
CCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGT
GGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCG
TGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCAGGAAACAGTACGGCAGCACCTAC
AGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGTGCAACAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTA
CAAGTGC AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCA
AGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAA
GAGATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC
GATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACA ACTACAAGACAA

CCCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGG
ACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCC
CTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAA

[0177] Концевой лизин может отсутствовать в очищенном белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене. В варианте этого иллюстративного полинуклеотида кодон, кодирующий С-концевой лизин, может отсутствовать (т.е. SEQ ID NO:139).

Полинуклеотид, кодирующий второй полипептид (SEQ ID NO:113)

CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCGATGAATAGAGA
ACAATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGCGGCTCTATCTTCCGGACTGCTGTC
CGGCAGATCCGACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTCCTG
TCATACTGAGTGTCTCCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGT
CTATTGGGACTAACATACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCCGCCTG
CTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAG
CGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTG
CGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACCTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACC
AAACTGGAACCTGAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTAT
CCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC
CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC
ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT
CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

Второй полипептид также кодируется полинуклеотидом, имеющим последовательность SEQ ID NO:115.

Полинуклеотид, кодирующий третий полипептид (SEQ ID NO:114)

GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACC
TTCCGTGTTCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC
TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCA
ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCTGCGAGGAA
CAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTA
TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACA
CTGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGT

CAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCG
AGAACAAC TACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGT
ACAGCGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGC
AGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCT
TCCTGGCAAA

[0178] В варианте этого иллюстративного полинуклеотида кодон, кодирующий С-концевой лизин, может отсутствовать (т.е. SEQ ID NO:141).

[0179] Дополнительный иллюстративный активируемый ГБПК по данному изобретению описан в Примере 1, и содержит первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:30 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:139 или 112 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене)); второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:113 или SEQ ID NO:115); и третий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене) или SEQ ID NO:141).

[0180] В другом иллюстративном активируемом ГБПК по данному изобретению, описанном в Примере 1, активируемый ГБПК содержит первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:38 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью, содержащей полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO:142 или 143 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене)); второй полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:31 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:113 или SEQ ID NO:115); и третий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене) или SEQ ID NO:141 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене)).

[0181] Полинуклеотид, кодирующий полипептид или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, или его домен, может быть получен из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в данной области техники (например, ПЦР и

другие способов молекулярного клонирования), а также может быть синтезирован с использованием способов, хорошо известных в данной области, и т.п. Полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептиды, можно клонировать в один или более векторов для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для создания химерных и гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

[0182] Полинуклеотиды, предложенные в данном документе, могут представлять собой РНК или ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, причем ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной. Если ДНК одноцепочечная, то ДНК может представлять собой кодирующую цепь или некодирующую (антисмысловую) цепь. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, лишенную еще одного эндогенного интрона. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой полинуклеотид неприродного происхождения. В некоторых аспектах полинуклеотид получен рекомбинантным путем. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются выделенными. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются по существу чистыми. В некоторых аспектах полинуклеотид очищают от природных компонентов.

[0183] В некоторых аспектах полинуклеотиды, описанные в данном документе, кодируют активируемые ГБПК против EGFR и CD3 или их антигенсвязывающий фрагмент и содержат тяжелую цепь (VH) и легкую цепь (VL) и CDR, предложенные в данном документе.

Векторы, Клетки-Хозяева и Способы Получения

[0184] В данном документе предложены один или более векторов, содержащих полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и/или третий полипептид по данному изобретению (соответствующий первому полинуклеотиду, второму полинуклеотиду и третьему полинуклеотиду, соответственно). В некоторых аспектах такие векторы можно использовать для рекомбинантного получения полипептидов ГБПК из клетки-хозяина, как более подробно описано ниже. В некоторых аспектах вектор содержит первый, второй и/или третий полинуклеотид, функционально связанный с одной или более промоторными последовательностями. В некоторых аспектах в данном изобретении предложено множество векторов, которые в совокупности содержат полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептиды (т.е. первый, второй и третий полинуклеотиды), причем множество включает по меньшей мере один вектор, который не содержит более двух или не более одного из первого, второго и третьего полинуклеотидов. В этих аспектах первая, вторая и третья полинуклеотидные последовательности во множестве

векторов обычно функционально связаны с одной или более промоторными последовательностями.

[0185] Также в данном документе предложены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие любые из описанных выше полинуклеотидов и/или векторов для рекомбинантной экспрессии полинуклеотидов, кодирующих полипептиды активируемого ГБПК против EGFR и CD3 по данному изобретению. Для экспрессии молекул антител, описанных в данном документе, могут использоваться различные векторные системы экспрессии в клетках-хозяевах (см., например, патент США № 5,807,715). Такие системы экспрессии в клетках-хозяевах представляют собой носители, с помощью которых могут быть получены и затем очищены требуемые кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые могут при трансформации или трансфекции соответствующими кодирующими нуклеотидными последовательностями экспрессировать антитело или его антиген-связывающий фрагмент, описанные в данном документе *in situ*. Иллюстративные клетки-хозяева, которые подходят для использования в качестве рекомбинантного экспрессирующего хозяина для описанных выше полинуклеотидов, включают клеточные системы млекопитающих (например, COS (например, COS1 или COS), CHO, ВНК, MDCK, НЕК 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, НЕК-293Т, HepG2, SP210, R1.1, В-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, клетки BMT10 и т.п.). Векторы, используемые при конструировании рекомбинантной клетки-хозяина млекопитающего, могут содержать промотор, полученный из генома клетки млекопитающего (например, промотор металлотioneина) или из вируса млекопитающих (например, поздний промотор аденовируса; промотор 7.5К вируса осповакцины). В некоторых аспектах рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку NS0.

[0186] В некоторых аспектах рекомбинантная экспрессия полипептида, описанного в данном документе, например, первого, второго и/или третьего полипептида, включает конструирование вектора экспрессии, содержащего полинуклеотид, который кодирует активируемые ГБПК против EGFR и CD3. Вектор(ы), содержащий(и) полинуклеотиды, кодирующие ГБПК, можно легко получить с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники, можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих один или более полинуклеотидов, кодирующих описанные в данном документе полипептиды, например, первый, второй и/или третий полипептид, а также соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*,

технологии синтеза, и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также предложены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, функционально связанную с промотором. Такие векторы могут, например, содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область полипептида, описанного в данном документе, например, первого, второго и/или третьего полипептида (см., например, международные публикации № WO 86/05807 и WO 89/01036; и патент США № 5,122,464), и переменные домены полипептида можно клонировать в такой вектор для экспрессии всей VH, всей VL или обеих полных VH и VL.

[0187] Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) обычными способами, а полученные клетки затем можно культивировать стандартными способами для получения ГБПК, описанного в данном документе (например, CDR, VH1, VH2, VL1 и VL2 активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3, предложенного в данном документе). Таким образом, в данном документе предложены клетки-хозяева, содержащие полинуклеотид, кодирующий ГБПК, описанный в данном документе, функционально связанный с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий описанный в данном документе ГБПК, или его домен. В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит три разных вектора: первый вектор, содержащий первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, описанный в данном документе, второй вектор, содержащий второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, описанный в данном документе, и третий вектор, содержащий третий полинуклеотид, кодирующий третий полипептид, описанный в данном документе.

[0188] В некоторых аспектах в данном документе предложена популяция векторов, которые в совокупности содержат полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептид, причем каждый вектор содержит только один или два полинуклеотида, кодирующих первый, второй или третий полипептиды. В некоторых аспектах в данном документе предложен один вектор, который содержит полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептиды (т.е. первый, второй и третий полинуклеотиды соответственно).

[0189] В некоторых аспектах в данном изобретении предложены способы получения активируемого ГБПК, включающие: (а) культивирование клетки-хозяина, содержащей один или более полинуклеотидов, кодирующих полипептиды по данному изобретению (например, первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и/или третий полинуклеотид, а также вектор(ы), содержащий вышеупомянутые полинуклеотиды) в жидкой

культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования активируемого ГБПК; и (b) выделение активируемого ГБПК.

[0190] В конкретном аспекте в данном документе предложены способы получения активируемого ГБПК против EGFR и CD3, включающие экспрессию такого его полипептида в клетке-хозяине. Более конкретно, в данном документе предложен способ получения активируемого ГБПК, включающий: (a) культивирование клетки-хозяина, содержащей один или более полинуклеотидов, кодирующих полипептиды по данному изобретению, в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для получения ГБПК; и (b) выделение активируемого ГБПК.

[0191] В другом аспекте способ дополнительно включает очистку биологического продукта (бесклеточного продукта экспрессии) активируемого ГБПК или другой технологической композиции, включающую подвергание водной композиции, содержащей активируемый ГБПК, типовому процессу, например, такому как, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография на керамическом гидроксипатите и т.п. В некоторых аспектах типовой процесс представляет собой хроматографию на керамическом гидроксипатите.

Композиции

[0192] В некоторых аспектах активируемые ГБПК по данному изобретению или соответствующий ГБПК можно использовать в фармацевтической композиции, полезной для любого из терапевтических применений, описанных в данном документе. В некоторых аспектах фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или более активируемых ГБПК вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. В другом аспекте фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или более активируемых ГБПК, фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солубилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант. Приемлемые материалы для составов являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции можно получать в виде жидких, замороженных и лиофилизированных композиций.

[0193] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция может содержать материалы для составов для модифицирования, поддержания или сохранения, например, уровня pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, адсорбции или проницаемости композиции. Подходящие материалы для составов включают, но не ограничиваются, аминокислоты; противомикробные препараты; антиоксиданты; буферы;

наполнители; хелатирующие агенты; комплексообразующие вещества; наполнители; углеводы, такие как моносахариды или дисахариды; белки; красители, ароматизаторы и разбавители; эмульгаторы; гидрофильные полимеры; полипептиды низкой молекулярной массы; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты; растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты; суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты; агенты, повышающие стабильность; агенты, повышающие тоничность; носители; и/или фармацевтические адъюванты. Дополнительные подробности и варианты подходящих агентов, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, представлены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Lloyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); и Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000).

[0194] Компоненты фармацевтической композиции выбираются в зависимости, например, от предполагаемого пути введения, формата доставки и желаемой дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Lloyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013). Композиции выбирают так, чтобы влиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* описанных антигенсвязывающих белков. Основной носитель или наполнитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным по своей природе. Например, подходящий носитель или наполнитель могут представлять собой воду для инъекций или физиологический солевой раствор. В некоторых аспектах композиции антигенсвязывающих белков могут быть приготовлены для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень чистоты, с необязательными составляющими агентами в форме лиофилизированного осадка или водного раствора. Кроме того, в некоторых аспектах антигенсвязывающий белок может быть приготовлен в виде лиофилизата с использованием соответствующих эксципиентов.

[0195] В некоторых составах концентрация активируемого ГБПК составляет по меньшей мере 2 мг/мл, 5 мг/мл, 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл, 100 мг/мл, 110 мг/мл, 120 мг/мл, 130 мг/мл, 140 мг/мл или 150 (мг/мл). В других составах активируемый ГБПК находится в концентрации 10-20 мг/мл, 20-40 мг/мл, 40-60 мг/мл, 60-80 мг/мл или 80-100 мг/мл.

[0196] Некоторые композиции включают буфер или агент, регулирующий уровень pH. Типичные буферы включают, но не ограничиваются: соли органических кислот (такие как соли лимонной кислоты, уксусной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой

кислоты, углекислоты, винной кислоты, янтарной кислоты или фталевой кислоты); Трис; фосфатные буферы; и, в некоторых случаях, аминокислоту, как описано ниже. В некоторых аспектах буферы используются для поддержания композиции при физиологическом уровне рН или при немного более низком уровне рН, обычно в диапазоне уровня рН от около 5 до около 8. Некоторые композиции имеют уровень рН от около 5-6, 6-7 до 7-8. В других аспектах уровень рН составляет около 5,5-6,5, 6,5-7,5 или 7,5-8,5.

[0197] Свободные аминокислоты или белки используются в некоторых композициях в качестве объемообразующих агентов, стабилизаторов и/или антиоксидантов. Например, для стабилизации белков в составе можно применять лизин, пролин, серин и аланин. Глицин применяют при лиофилизации, чтобы обеспечить правильную структуру и свойства осадка. Аргинин можно применять для ингибирования агрегации белка, как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин применяют в качестве антиоксиданта. В некоторых аспектах состав содержит глутамин и аспарагин. Аминокислота включается в некоторые составы из-за ее буферной способности. Такие аминокислоты включают, например, аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и тому подобное. Некоторые составы также содержат белковый эксципиент, такой как сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HSA) и рекомбинантный альбумин человека (rHA)), желатин, казеин и тому подобное.

[0198] Некоторые композиции содержат полиол. Полиолы включают сахара (например, маннит, сахарозу, трегалозу и сорбит) и многоатомные спирты, такие как, например, глицерин и пропиленгликоль, а также полиэтиленгликоль (ПЭГ) и родственные вещества. Полиолы являются космотропными. Они являются полезными стабилизирующими агентами как в жидких, так и в лиофилизированных составах для защиты белков от процессов физической и химической деградации. Полиолы также применяют для корректировки тоничности составов.

[0199] Некоторые композиции в качестве стабилизатора содержат маннитол. Обычно его используют с лиопротектором, например сахарозой. Сорбитол и сахарозу применяют для корректировки тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стрессов при замораживании-размораживании во время транспортировки или приготовления нерасфасованного продукта во время процесса производства. ПЭГ применяют для стабилизации белков и в качестве криопротектора, и в связи с этим его можно применять в контексте данного изобретения.

[0200] Сахара, включая моносахариды, ди-, три-, тетра- и олигосахариды; производные сахаров, такие как альдитолы, альдоновые кислоты, этерифицированные сахара и т.п.; и полисахариды или полимеры сахаров могут быть включены в некоторые составы. Например, подходящие углеводные эксципиенты включают моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и тому подобное; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т.п.; полисахариды, такие как раффиноза, мелезитоза, мальтодекстрины, декстраны, крахмалы и т.п.; и альдиты, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит, сорбит (глюцит), миоинозитол и тому подобное.

[0201] В некоторые составы могут быть включены поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества обычно используются для предотвращения, минимизации или уменьшения адсорбции белка на поверхности и последующей агрегации на границах раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость, а также для контроля конформационной стабильности белка. Подходящие поверхностно-активные вещества включают полисорбат 20, полисорбат 80, другие эфиры жирных кислот - эфиры сорбитана, поверхностно-активные вещества Triton, лехитин, тилоксапал и полоксамер 188.

[0202] В некоторых аспектах в фармацевтическую композицию включен один или более антиоксидантов. Антиоксиданты можно применять для предотвращения окислительной деградации белков. В этом отношении подходящими антиоксидантами являются восстанавливающие агенты, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие агенты. Как правило, антиоксиданты являются водорастворимыми и сохраняют свою активность на протяжении срока годности продукта. ЭДТА представляет собой другой полезный антиоксидант.

[0203] Некоторые составы содержат ионы металлов, которые являются кофакторами белка и необходимы для образования координационных комплексов белка. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Например, ионы магния (10-120 мМ) можно применять для подавления изомеризации аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты.

[0204] В некоторые составы также может быть включен агент, повышающий тоничность. Примеры таких агентов включают галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит и сорбит.

[0205] В некоторые составы могут быть включены один или более консервантов. Консерванты необходимы при разработке многодозовых парентеральных составов, которые предполагают более одного извлечения из одного и того же контейнера. Их

основной функцией является ингибирование роста микроорганизмов и гарантия стерильности продукта на протяжении срока годности или срока применения лекарственного продукта. Подходящие консерванты включают фенол, m-крезол, p-крезол, o-крезол, хлоркрезол, бензиловый спирт, нитрит фенилртути, феноксиэтанол, фениловый спирт, формальдегид, хлорбутанол, хлорид магния (например, гексагидрат), алкилпарабен (метил, этил, пропил, бутил и т.п.), хлорид бензалкония, хлорид бензетония, дегидроацетат натрия, тимеросал, бензойную кислота, салициловую кислоту, хлоргексидин или их смеси в водном разбавителе.

[0206] Фармацевтическую композицию составляют так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примеры способов введения включают внутривенное (в/в), внутрикожное, ингаляционное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение.

[0207] Компоненты состава, подходящие для парентерального введения (например, внутривенного, подкожного, внутриглазного, внутрибрюшинного, внутримышечного), включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные агенты, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

[0208] Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический раствор, бактериостатическую воду, Кремофор EL™ (BASF, Парсиппани, штат Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (ФСБ). Носитель должен быть стабилен в условиях производства и защищен от микроорганизмов. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. д.) и их подходящие смеси.

[0209] Дополнительные рекомендации по соответствующим составам в зависимости от формы доставки представлены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Loyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013).

[0210] Фармацевтические составы могут быть стерильными. Стерилизацию можно проводить путем фильтрации через стерильные фильтровальные мембраны. Если композиция является лиофилизированной, стерилизацию с применением этого способа можно проводить до или после лиофилизации и восстановления. Как продемонстрировано

в Примерах 7 и 8, активируемые ГБПК, описанные в данном документе, оказываются относительно устойчивыми к агрегации даже при относительно высоких концентрациях. Таким образом, в другом аспекте в данном документе предложены композиции, содержащие любой из активируемых ГБПК, описанных в данном документе, и воду, причем активируемый ГБПК присутствует в концентрации по меньшей мере 1 мг/мл, и при этом композиция содержит по меньшей мере около 95% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого ГБПК. Используемый в контексте данного документа термин «мономерный активируемый ГБПК» относится к активируемому ГБПК в неагрегированной форме. В некоторых из этих аспектов композиция содержит по меньшей мере около 2 мг/мл и по меньшей мере около 95% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого ГБПК или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого ГБПК. В некоторых аспектах композиция содержит по меньшей мере около 3 мг/мл и по меньшей мере около 95% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого ГБПК. В некоторых аспектах композиция содержит по меньшей мере около 4 мг/мл и по меньшей мере около 95% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого ГБПК, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого ГБПК или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого ГБПК. Процент мономерного активируемого ГБПК можно легко определить, например, с помощью эксклюзионной (SE)-ВЭЖХ, как проиллюстрировано в Примере 7, в котором процент мономерного активируемого ГБПК определяется как процентная площадь пика, соответствующего мономерному активируемому ГБПК, от общей площади пиков.

ПРИМЕРЫ

[0211] Примеры в этом разделе примеров представлены лишь в качестве иллюстрации, а не ограничения.

Пример 1: Конструирование и Экспрессия Активируемых Гетеромультимерные Биспецифических Полипептидов Против EGFR и CD3

[0212] В этом примере были получены два иллюстративных активируемых ГБПК против EGFR и CD3, Комплекс-57 и Комплекс-67, имеющие структуру, представленную на **Фиг. 1**. Как представлено на **Фиг. 1**, каждый из активируемых ГБПК против EGFR и CD3 был сконструирован в виде трех полипептидов, как описано ниже:

(a) первый полипептид, содержащий маскирующий CD3 фрагмент (MM1) **100**, первый расщепляемый фрагмент (CM1) **101**, scFv против CD3 **102** (включая последовательности VH1 и VL1, соединенные посредством линкера), переменный домен тяжелой цепи против EGFR (VH2) (вверху) и домен CH1 (внизу), вместе обозначенные как **103**, который связан с помощью шарнирной области **109** с первым Fc-доменом (Fc1) **104**; и

(b) второй полипептид, содержащий маскирующий EGFR фрагмент (MM2) **105**, второй расщепляемый фрагмент (CM2) **106**, а также переменный домен легкой цепи против EGFR (VL2) (вверху) и константный домен легкой цепи (CL) (внизу), вместе обозначенные как **107**; и

(c) третий полипептид, содержащий шарнирную область **110** и второй Fc-домен (Fc2) **108**. Как представлено на **Фиг. 1**, первый и второй Fc-домены связываются друг с другом, а переменные домены тяжелой и легкой цепи против EGFR образуют EGFR-направленный домен, который специфически связывается с EGFR. Комплекс-57 и Комплекс-67 содержали один и тот же домен, направленный против EGFR, но содержали разные scFv против CD3. Компоненты Комплекса-67 перечислены в Таблицах 4А-4С, а компоненты Комплекса-57 перечислены в Таблицах 5А-5С.

Таблица 4А. Компоненты Первого Полипептида Комплекса-67

Название	Первый Полипептид				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1 ^Δ
Первый Полипептид	ML15	0011	i2C	C225v5	SEQ ID NO:23
SEQ ID NO:30* ⁺⁺	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:21	

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO:112 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене) или SEQ ID NO:139.

⁺⁺Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:33.

^ΔFc1 расположен на C-конце последовательности CH1 (SEQ ID NO:26)-шарнирная

область (SEQ ID NO:34).

Таблица 4В. Компоненты Второго Полипептида Комплекса-67

Название	Второй Полипептид			
	MM2	CM2	VL2	Константная область легкой цепи (CL)
Второй Полипептид	CF41	2008	C225v5	CL
SEQ ID NO:31 ^{*,++}	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:25

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO: 113 или, альтернативно, SEQ ID NO: 115.

⁺⁺Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

Таблица 4С. Компоненты Третьего Полипептида Комплекса-67

Название	Третий Полипептид
	Fc2
Третий Полипептид	SEQ ID NO:28
SEQ ID NO:32 ^{*,++}	

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенной белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене) или SEQ ID NO:141.

⁺⁺Содержит шарнирную область (SEQ ID NO:35), расположенную на N-конце Fc2.

Таблица 5А. Первый Полипептид Комплекса-57

Название	Первый Полипептид				
	MM1	CM1	scFv	VH2	Fc1 ^Δ
Первый Полипептид	H20GG	0011	v16	C225v5	
SEQ ID NO:38 ^{*,++}	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:122	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:23

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID

NO:143 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене) или SEQ ID NO:142.

⁺⁺Содержит N-концевой спейсер (SEQ ID NO:117).

^ΔFc1 расположен на C-конце последовательности CH1 (SEQ ID NO:26)-шарнирная область (SEQ ID NO:34).

Таблица 5В. Второй Полипептид Комплекса-57

Название	Второй Полипептид			
	MM2	CM2	VL2	Константная область легкой цепи (CL)
Второй Полипептид	CF41	2008	C225v5	CL
SEQ ID NO:31 ^{*,++}	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:25

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO: 113 или, альтернативно, SEQ ID NO: 115.

⁺⁺Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

Таблица 5С. Компоненты Третьего Полипептида Комплекса-57

Название	Третий Полипептид
	Fc2
Третий Полипептид	
SEQ ID NO:32 ^{*,++}	SEQ ID NO:28

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от того, присутствует он или отсутствует в гене) или SEQ ID NO:141.

⁺⁺Содержит шарнирную область (SEQ ID NO:35), расположенную на N-конце Fc2.

Конструирование контрольного активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида против EGFR и CD3

[0213] Контрольную активируемую биспецифическую конструкцию, обозначенную в данном документе как «С1106», получали, как описано в международной заявке на

патент № WO 2019/075405, которая включена в данный документ посредством ссылки. С1106 представляет собой активируемую двуплечевую двухвалентную биспецифическую конструкцию, состоящую из четырех полипептидов, соответствующих двум идентичным тяжелым цепям (два первых полипептида) и идентичным легким цепям (два вторых полипептида), причем каждая тяжелая и легкая цепи образуют плечо биспецифической конструкции. С1106 является «двухвалентной» в том смысле, что она имеет по два домена связывания каждого типа (т.е. два EGFR-связывающих домена и два CD3-связывающих домена). Аминокислотная последовательность легкой цепи идентична аминокислотной последовательности второго полипептида Комплекса-67 и Комплекса-57. Тяжелая цепь С1106 и первый полипептид Комплекса-67 имеют идентичные спейсер, расщепляемые фрагменты, VH против EGFR, компоненты расщепляемого фрагмента. Тяжелая цепь С1106 и первый полипептид Комплекса-57 имеют идентичный спейсер, MM/MM1 против CD3, расщепляемый фрагмент и VL/VH против CD3 (и идентичный scFv против CD3) и VH против EGFR. Для С1106 все четыре направленных домена (два CD3-связывающих домена и два EGFR-связывающих домена) были замаскированы. Компоненты С1106 представлены в Таблицах 6А-6В.

Таблица 6А. С1106 Компоненты Тяжелой Цепи

Название	Тяжелая Цепь				
	Маскирующий фрагмент против CD3	Расщепляемый Фрагмент:	scFv против CD3	Вариабельный Тяжелой Цепи Домен против EGFR	Fc ^Δ
С1106	H20GG	0011	v16	C225v5	
SEQ ID NO:123 ^{*,++}	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:122	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:124

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO:125 (по-видимому, белок теряет концевой лизин во время экспрессии/очистки).

++ Содержит N-концевой спейсер (SEQ ID NO:116).

^Δ Fc-домен расположен на C-конце последовательности CH1 (SEQ ID NO:26)-шарнирная область (SEQ ID NO:34).

Таблица 6В. Компоненты Легкой Цепи С1106

Название			Легкая цепь	
	MM против EGFR (MM2)	CM2	VL2 против EGFR	Константная Область Легкой Цепи
LC C1106	CF41	2008	C225v5	CL
SEQ ID NO:31 ^{*,++}	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:22	SEQ ID NO:25

*Соответствующей полинуклеотидной последовательностью является SEQ ID NO: 113 или, альтернативно, SEQ ID NO: 115.

++Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

Пример 2. Связывание Активируемого Гетеромультимерного Биспецифического Полипептида Против EGFR и CD3 с EGFR⁺ клеток HT-29 и CD3ε⁺ клеток Jurkat

[0214] Чтобы оценить, могут ли описанные маскирующие пептиды против EGFR и CD3 ингибировать связывание активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида с EGFR и CD3, проводили анализ связывания на основе проточной цитометрии.

[0215] Клетки HT-29-luc2 (Perkin Elmer, Inc., Уолтем, Массачусетс (формально Caliper Life Sciences, Inc.) и Jurkat (клон E6-1, ATCC, TIB-152) культивировали в среде RPMI1640+глутамак (Life Technologies, каталог 72400-047), дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (HI-FBS, Life Technologies, каталог 10438-026). Как указано, «активированные» (обозначенные в данном документе как «акт.») молекулы получали в виде маскированных ГБПК и протеолитически расщепляли с образованием активированных форм. Активируемые ГБПК были получены, но не подвергались протеолитическому расщеплению перед экспериментами. Были протестированы следующие полипептидные комплексы: акт.-С1106 (двухвалентная биспецифическая конструкция), акт.-Комплекс-57 (ГБПК) и акт.-Комплекс-67 (ГБПК) и активируемый (маскированный) ГБПК Комплекс-57, (маскированный) ГБПК Комплекс-67 и двухвалентная, двухвалентная биспецифическая конструкция с двойной маскировкой, С1106. Как отмечено в Примере 1, в С1106 и Комплексе-57 использовалась одна комбинация CD3-связующего домена (scFv против CD3 v16) и маскирующего фрагмента (MM H20GG), а в Комплексе 67 использовалась другая комбинация CD3-связующего домена (scFv против CD3 I2C) и маскирующего

фрагмента (ML15).

[0216] Клетки HT29-luc2 отделяли с помощью Versene™ (Life Technologies, каталог 15040066), промывали, помещали в 96-луночные планшеты с плотностью около 150000 клеток на лунку и ресуспендировали в 50 мкл активированного или активируемого (маскированного) ГБПК. Клетки Jurkat подсчитывали и высевали, как описано для клеток HT29-luc2. Титрование активированного (немаскированного) или активируемого (маскированного) ГБПК начинали с концентраций, указанных на Фиг. 2А и 2В, с последующими 3-кратными серийными разведениями в буфере для красителей FACS + 2% FBS (BD Pharmingen, каталог 554656). Клетки инкубировали при 4°C при встряхивании в течение около 1 часа, собирали и промывали 2x200 мкл буфера для красителей FACS. Клетки ресуспендировали в 50 мкл конъюгированного с Alexa Fluor 488 Fc против IgG человека (10 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch) и инкубировали при 4°C при встряхивании в течение около 1 часа. Клетки собирали, промывали и ресуспендировали в конечном объеме 200 мкл буфера для красителей FACS, содержащего 2,5 мкг/мл 7AAD (BD Biosciences, каталог 559925). Клетки, окрашенные только вторичными антителами, использовали в качестве отрицательного контроля. Данные собирали с помощью проточного цитометра Attune NxT, а среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) жизнеспособных клеток рассчитывали с использованием FlowJo® V10 (Treestar). Данные MFI с вычтенным фоном были отображены в виде графика в GraphPad Prism с использованием анализа аппроксимации кривой.

[0217] Как представлено на Фиг. 2А-2В, оба активируемых ГБПК, Комплекс-57 и Комплекс-67, а также контрольный СИ106 продемонстрировали снижение связывания с обоими мишенями -- EGFR и CD3, относительно активированного (немаскированного) Комплекса-57, активированного Комплекса-67 и активированного СИ106. Уменьшение связывания представлено сдвигом вправо кривых связывания. Эффективность маскировки EGFR в этом эксперименте по связыванию клеток составила 105 для Комплекса-57, 338 для Комплекса-67 и 594 для СИ106.

Пример 3. Биологическая активность активируемых и активированных ГБПК

[0218] Биологическую активность активируемых (маскированных) и активированных (немаскированных) ГБПК анализировали с использованием анализов цитотоксичности. РВМС человека были приобретены у Stemcell Technologies (Ванкувер, Канада) и культивированы совместно с линией раковых клеток HT29-luc2, экспрессирующей EGFR (Perkin Elmer, Inc., Уолтем, Массачусетс (формально Caliper Life Sciences, Inc.)) при соотношении Е (CD3+) :Т 5:1 в RPMI-1640+глутамакс с добавлением 5% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки (Sigma, каталог Н3667). Было

протестировано титрование акт.-С1106, акт.-Комплекса-57 и акт.-Комплекса-67, а также активируемых (маскированных) С1106, Комплекса-57 и Комплекса-67. Через 48 часов оценивали цитотоксичность с использованием системы анализа люциферазы ONE-GloTM (Promega, Мэдисон, Висконсин, каталог Е6130). Люминесценцию измеряли на Infinite® M200 Pro (Tecan Trading AG, Швейцария). Процент цитотоксичности рассчитывали и наносили на график в GraphPad PRISM с анализом аппроксимации кривой. Эффективность активированных молекул сравнивали путем расчета EC50. Эффективность маскировки рассчитывали как соотношение интактного и активированного EC50 для каждой молекулы.

[0219] Как представлено на Фиг. 3А и 3В, активируемые (маскированные) ГБПК имеют сдвинутую кривую доза-ответ относительно активированного (немаскированного) биспецифического антитела. В этом анализе данные на Фиг. 3А демонстрируют эффективность маскировки 29,650 для С1106 и эффективность маскировки 1,034 для Комплекса-57. Данные на Фиг. 3В демонстрируют эффективность маскировки 26,537 для С1106 и эффективность маскировки 7,141 для Комплекса-67. Комплекс-57 обычно демонстрировал снижение активности в 10-42 раза по сравнению с Комплексом-67 на основании многочисленных экспериментов с использованием этого анализа.

Пример 4. ГБПК-индуцированная регрессия сформировавшихся опухолей HT29 у мышей

[0220] В этом примере активируемый (маскированный) ГБПК Комплекс-67 и контрольный С1106 анализировали на способность индуцировать регрессию или снижать рост прижившихся ксенотрансплантатных опухолей HT29 у мышей NSG с привитыми РВМС человека.

[0221] Линию клеток рака толстой кишки человека HT29-luc2 (Perkin Elmer, Inc., Уолтем, Массачусетс)) культивировали в соответствии с установленными процедурами. Очищенные замороженные РВМС человека были получены от Hemacare, Inc. (Ван Найс, Калифорния). Мыши NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) были получены от The Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн).

[0222] В день 0 каждой мыши инокулировали подкожно в правый бок 2×10^6 клеток HT29-luc2 в 100 мкл RPMI + Глутамакс, бессывороточной среды. Ранее замороженные РВМС от одного донора вводили (внутрибрюшинно) на 3-й день при соотношении CD3+ Т-клеток к опухолевым клеткам 1:1. Когда объем опухоли достигал 150-200 мм³ (приблизительно на 12-й день), мышей случайным образом распределяли по группам лечения и вводили внутривенно дозы согласно Таблице 7. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю. Уровни доз Комплекса-67 были скорректированы с учетом

различий в молекулярной массе между СИ106 и Комплексом-67.

Таблица 7. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата HT29-luc2.

Группа	Количество	Лечение	Доза (мг/кг)
1	8	Носитель	Н/Д
2	8	СИ106 Двухвалентная двуплечевая биспецифическая конструкция с двойной маскировкой	1,0
3	8	Комплекс-67 Активируемый (маскированный) ГБПК	0,2
4	8	Комплекс-67 Активируемый (маскированный) ГБПК	0,6
5	8	Комплекс-67 Активируемый (маскированный) ГБПК	1,8

[0223] Как представлено на Фиг. 4, на которой изображен график зависимости объема опухоли от дней после начальной лечебной дозы (день 0), существует дозозависимый эффект Комплекса-67 на рост ксенотрансплантатных опухолей HT29-luc2. Комплекс-67 продемонстрировал более мощную противоопухолевую активность, чем контрольный СИ106, в эквивалентной дозе (1 мг/кг СИ106 и 0,6 мг/кг Комплекса-67); $p = 0,0099$ RMANOVA с использованием критерия Дьюнетта).

Пример 5. Регрессия Опухолей НСТ116 у Мышей После Лечения Активируемыми ГБПК

[0224] Активированный (немаскированный) ГБПК акт.-Комплекс-67 и активируемый (маскированный) ГБПК акт.-Комплекс-67 анализировали на способность индуцировать регрессию или снижать рост прижившихся ксенотрансплантатных опухолей НСТ116 у мышей NSG с привитыми Т-клетками человека. Линию клеток рака толстой кишки человека НСТ116 (ATCC) культивировали в среде RPMI + глутамакс + 10% FBS в соответствии с установленными процедурами. Моделирование опухоли выполняли, как описано в Примере 4. Мышам вводили дозы согласно Таблице 8.

Таблица 8. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата НСТ116.

Группа	Количество	Лечение	Доза (мг/кг)
1	8	Носитель	Н/Д
2	8	Комплекс-67 (Активированный, немаскированный)	0,3
3	8	Комплекс-67 (Активированный, немаскированный)	1,0
4	8	Комплекс-67 (Активируемый, маскированный)	1,0
5	8	Комплекс-67 (Активируемый, маскированный)	3,0

Пример 6: Оценка Процентного Содержания Мономера после Очистки с Помощью Хроматографии на Керамическом Гидроксиапатите (СНТ)

[0225] Контрольный СИ106 с двойным маскировкой и активируемый (маскированный) ГБПК Комплекс-67 очищали с использованием хроматографической колонки с керамическим гидроксипатитом для сравнения степени димеризации при высоких концентрациях во время очистки. Это оценивали путем анализа процентного содержания мономера на каждом этапе процесса очистки.

[0226] Образцы загружали в СНТ Туре I, колонку с шариками 40 мкм (Biogad, кат. номер: 157-0040 и #157-0041), загруженную 20 г/л смолы. Колонку промывали уравнивающим буфером: 10 мМ NaPO₄, 100 мМ гистидиновый буфер, уровень pH 6,5, затем элюировали фракциями по 2 мл с помощью 10 мМ NaPO₄, 100 мМ гистидин, 200 мМ лизин-HCl-буфер с уровнем pH 6,5 для СИ106 и 10 мМ NaPO₄, 100 мМ Гистидин, 100 мМ буфер лизин-HCl с уровнем pH 6,5 для Комплекса-67. СИ106 собирали фракциями по 2 мл, а затем пять фракций объединяли для образования элюата. Считывание пиков начинали около 25 mAU и прекращали около 300 mAU для СИ106. Комплекс-67 собирали в одну пробирку, считывание пиков начинали при 100 mAU и заканчивали при 500 mAU. Затем последовал этап обработки буфером для смывки с 500 мМ NaPO₄ при уровне pH 7,0. Концентрацию белка для каждой фракции определяли количественно по УФ-поглощению при длине волны 280 нм. Процент мономера в каждой фракции определяли с

помощью SE-ВЭЖХ (эксклюзионной хроматографии в аналитическом масштабе) на основании общей площади пика.

[0227] На этапе связывания в хроматографии белок сначала связывается с верхней частью колонки и перемещается вниз по колонке только по мере заполнения верхних участков. Это приводит к тому, что молекулы оказываются в высокой концентрации на колонке. Мультимерные формы С1106 и Комплекс-67 связываются с колонкой с более сильной аффинностью, чем мономерные формы, и поэтому требуют более сильного буфера для полного удаления из колонки. Таким образом, когда колонку элюируют более слабым буфером, а затем смывают более сильным буфером, элюаты имеют более низкий процент димера (более высокий процент мономера), по сравнению со смывами. Как представлено в Таблице 10, анализ Комплекса-67 (активируемого ГБК) привел к увеличению процентного содержания мономера на 7,6% в элюате, оставив высокомолекулярный материал на колонке до этапа смывки, что привело к 77% извлечению в элюате. Это можно сравнить с анализом С1106, который привел к снижению процента мономера на 5,4% в элюате до 65,0%, даже несмотря на то, что больше димерного материала (только 30,6% мономера) оставалось на колонке до смывки, что привело к 81% извлечению в элюате.

Таблица 9. Результаты СНТ-хроматографии

Молекула	% мономера при загрузке	% мономера в элюате	% Извлечения в элюате	% мономера в смыве	% Извлечения в смыве
Комплекс-67	90,9	98,5	77	Нет данных	Нет данных
Контроль С1106	70,4	65,0	81	30,6	9

[0228] Эти результаты позволяют предположить, что Комплекс-67 не подвергается дополнительной димеризации при высокой концентрации на колонке, что приводит к удалению почти всех высокомолекулярных частиц с 98,5% мономера в элюате по сравнению с 65% для С1106. Для С1106 в пуле элюата содержится больше высокомолекулярных частиц, чем в исходной загрузке. Улучшенное поведение Комплекса-67 позволяет очищать высокомономерный Комплекс-67 с помощью СНТ-хроматографии типа 1. Однако С1106 не мог быть очищен этим или любым оцененным способом связывающей/элюирующей хроматографии из-за димеризации, которая

происходит, когда СИ06 подвергается воздействию высоких концентраций на колонке.

Пример 7: Оценка Димеризации, Зависящей от Концентрации, посредством Концентрирования в Центрифужном Концентраторе

[0229] Очищенные с помощью белка А и SEC препараты Комплекса-67, Комплекса-57 и контроля СИ06 с двойной маскировкой сравнивали по процентному содержанию мономера после центрифугирования и инкубирования в течение ночи при самой высокой концентрации.

[0230] Комплекс-67, Комплекс-57 и СИ06 очищали с помощью белка А и SEC и затем составляли в буфере с низким уровнем рН (10 мМ ацетат, 100 мМ лизин, уровень рН 6). Образцы разбавляли в соотношении 1:15 в ФСБ (753-45-01) и концентрировали с использованием белковых концентраторов Pierce™ PES 10K MWCO 0,5 мл (Thermo Fisher, ка. № 88513) путем центрифугирования со скоростью 14000 об./мин в течение 2 минут при каждом концентрировании. Образцы с самой высокой концентрацией хранили в течение ночи и оценивали процентное содержание мономера. Полученные концентрации и процентные количества мономеров представлены в Таблице 10 и на Фиг. 8.

Таблица 10. Процент мономерного активируемого ГБПК по сравнению с Общей Концентрацией Белка

Комплекс-67		Комплекс-57		СИ06 в ФСБ	
Конц. мг/мл	% мономера	Конц. мг/мл	% мономера	Конц. мг/мл	% мономера
1,0	99,1	1,0	98,6	1,1	94,4
3,2	99,0	2,4	98,4	3,58	93,0
5,4	98,9	3,6	98,3	5,67	90,9
6,5	99,0	4,0	98,2	7,27	88,6
в течении ночи	98,9	в течении ночи	97,9		

[0231] На Фиг. 6 и в Таблице 10 продемонстрировано, что в Комплексе-67 сохраняется высокий процент мономера (98%–99%) и очень низкая агрегация в растворе по мере увеличения концентрации.% Это по сравнению с СИ06, который демонстрирует заметную димеризацию, зависящую от концентрации, по мере увеличения концентрации. Комплекс-57 продемонстрировал очень незначительную димеризацию, зависящую от концентрации, сохраняя стабильное процентное содержание мономера по мере

увеличения концентрации. Комплекс-67 также сохранял процентное содержание мономеров во время инкубации в течение ночи при самой высокой концентрации, демонстрируя стабильность процентного содержания мономеров при более высокой концентрации.

Пример 8: Безопасность и Эффективность Активируемой Конструкции TCB против EGFR и CD3 CI107

[0232] В этом исследовании безопасность и эффективность CI107, конструкции TCB против EGFR и CD3, имеющей тот же структурный формат, что и контрольный CI106 (описанный выше), оценивали в доклинических моделях для оценки терапевтического потенциала лечения опухолей, экспрессирующих EGFR. CI107 получали, как описано в международной заявке на патент № WO 2019/075405, которая включена в данный документ посредством ссылки. Конструкция CI107 TCB альтернативно упоминается в этом примере как «биспецифическое антитело, взаимодействующее с Т-клетками» или «TCB».

Способы

Исследования на животных

[0233] Все исследования на животных проводились в соответствии с правилами институционального комитета по уходу и использованию животных, регулирующими деятельность учреждения, в котором проводилось каждое исследование. Исследования ксенотрансплантата на мышах проводились компанией CytomX Therapeutics, Inc (CytomX), а исследования на яванских макаках проводились компанией Altasciences (Эверетт, Вашингтон). Все исследования на животных проводились в соответствии с правилами, установленными Законом Министерства сельского хозяйства США о благополучии животных и Руководством по уходу и использованию лабораторных животных.

Материалы

[0234] Все TCB и другие конструкции, описанные в этом исследовании, включая CI107, CI128, CI020, CI011, CI040, CI048 и CI104, были созданы CytomX Therapeutics, Inc. (см. WO 2016/014974 и WO 2019/075405). CI107, CI128, CI020, CI011, CI040 и CI104 имеет тот же структурный формат, что и CI106. CI048 соответствует активированному CI011. Активированные TCB были получены путем обработки *in vitro* активатором плазминогена урокиназного типа (uPA) с последующей очисткой SEC (Desnoyers 2013). Клетки HT29-Luc2 были получены от Caliper Life Sciences (Хопкинтон, Массачусетс), а клетки HCT116 и Jurkat были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

Мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) получали в виде криоконсервированных флаконов с клетками от отдельных доноров от HemaCare Corporation (Нортридж, Калифорния), AllCells (Аламеда, Калифорния) или STEMCELL Technologies (Сиэтл, Вашингтон). Мыши NOD.Cg-Prkcdscid Il2rg tm1Wjl/SzJ (NSG) были получены от Jackson Laboratories (Сакраменто, Калифорния).

Анализ связывания на основе клеток

[0235] Клетки HT29 и Jurkat поддерживали в полной среде. Клетки HT29 были собраны с использованием буфера для диссоциации клеток Versene™. Клетки центрифугировали при 250 x g в течение 5–10 минут и ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 2% FBS (BD Pharmingen). Клетки высевали по 150000 на лунку в 96-луночные планшеты с V-образным дном и обрабатывали Комплексом-07 или активированным протеазой С1104 *in vitro* в различных концентрациях, полученных путем 3-кратных серийных разведений в буфере FACS, начиная с 1,5 мкМ С1107 как для клеток HT29, так и клеток Jurkat, 0,05 мкМ активированного С1104 для клеток HT29 и 0,5 мкМ активированного С1104 для клеток Jurkat. Клетки инкубировали в течение 1 часа при 4°C, дважды промывали буфером FACS и ресуспендировали в 10 мкг/мл вторичного антитела Alexa Fluor 647 против Fc человека. Затем клетки инкубировали, защищая от света, в течение 30-60 минут при 4°C, дважды промывали буфером FACS, ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 7-AAD, и анализировали на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec). Данные средней интенсивности флуоресценции корректировали с учетом фонового сигнала вторичных антител, отображали на графике в Graphpad Prism, и рассчитывали значения EC50.

Анализ Цитотоксичности

[0236] НСТ116-Luc2 или HT29-Luc2 высевали в 96-луночный белый плоскодонный планшет, обработанный тканевой культурой (Costar №3917), по 10000 клеток/лунку в RPMI + 5% сыворотки человека. PBMC человека были свежеразморожены и дважды промыты RPMI + 5% сыворотки человека, и 100000 PBMC были добавлены в RPMI + 5% сыворотки человека в лунки, содержащие НСТ116-Luc2 или HT29-Luc2. Затем в лунки добавляли активированный протеазой ТСВ или С1107 в различных концентрациях, полученных путем 3-кратных серийных разведений. Контрольные лунки содержали необработанные клетки-мишени + эффекторные клетки, только клетки-мишени, только эффекторные клетки или только среду. Планшеты затем инкубировали в течение приблизительно 48 часов при 37°C и 5% CO₂. Жизнеспособность клеток измеряли с использованием системы анализа люциферазы ONE-Glo (Promega, №E6120) и планшета-ридера Tecan. Процент цитотоксичности рассчитывали следующим образом: (1-

(экспериментальная RLU/среднюю контрольную RLU))*100.

Активация Т-клеток *in vitro* и анализ цитокинов

[0237] Активацию Т-клеток измеряли путем индукции экспрессии CD69 в PBMC, совместно культивированных с клетками HT29-Luc2 или HCT116-Luc2. Клетки HT29-Luc2 или HCT116-Luc2 высевали по 10000 клеток/лунку в неадгезивный планшет с U-образным дном. PBMC человека были свежеразморожены и дважды промыты сывороткой, содержащей RPMI, и 100000 PBMC/лунку добавляли в планшеты, содержащие опухолевые клетки. Дубликаты планшетов, содержащих только PBMC, засеивали для контроля компенсации проточной цитометрии. Трехкратные серийные разведения СИ107, активированного СИ107 или СИ128 готовили в среде и добавляли к высеянными клеткам. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 16 часов. Для подготовки к анализу проточной цитометрии планшеты центрифугировали при 250 x g в течение 10-15 минут. Супернатант удаляли для анализа цитокинов, в каждую лунку добавляли блок Fc (Human TruStain FcX, BioLegend) и планшеты инкубировали в течение 10 минут. В лунки добавляли коктейли антител, содержащие антитело против CD45-FITC (BioLegend), антитело против CD3-Pacific blue (BioLegend), антитело против CD8a-APC (BioLegend) и антитело против CD69-PE-Cy7 (BioLegend) или соответствующие компенсационные контроли, и планшеты инкубировали при встряхивании при 4°C в защищенном от света месте в течение 30-60 минут. Затем планшеты промывали буфером FACS и ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 7-AAD. Флуоресценцию измеряли с использованием проточного цитометра Attune и собирали 15000 событий, представляющих PBMC.

[0238] Для анализа цитокинов использовали планшетные анализы Meso Scale Discovery U-PLEX (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Массачусетс). Планшеты U-PLEX готовили в соответствии с протоколом производителя для оценки уровней MCP-1, TNF- α , IL-6, IL-2 и IFN- γ . Образцы супернатанта, собранные из HT29-Luc2 или HCT116-Luc2, совместно культивированных с PBMC и обработанных маскированным (активируемым) СИ107, активированным (также называемым в данном документе «акт.-») СИ107 или СИ128, разбавляли, добавляли в планшет и обрабатывается в соответствии с инструкциями производителя.

Исследования эффективности *in vivo*

[0239] В экспериментах *in vivo* влияние TCB на рост опухоли измеряли на мышах, несущих опухоли HT29-Luc2 или HCT116, которым привили Т-клетки человека, полученные в результате внутрибрюшинной (в/б) инъекции PBMC человека. Два миллиона клеток HT29-Luc2 или HCT116 были подкожно инъецированы со 100 мкл

бессывороточного RPMI в бок самкам мышей NSG в день 0. Замороженные PBMC от одного донора были свежеразморожены и вводились посредством в/б инъекции в День 3 со 100-200 мкл RPMI + Глутамакс, бессывороточной среды. PBMC ранее были охарактеризованы по процентному содержанию CD3⁺ Т-клеток, а количество PBMC, которые будут использоваться для введения *in vivo*, было основано на соотношении CD3⁺ Т-клеток к опухолевым клеткам 1:1. Измерения опухоли приблизительно на День 12 использовали для рандомизации мышей перед внутривенным (в/в) введением ТСВ, контрольного препарата или носителя. Животным вводили тестируемые образцы еженедельно в течение 3 недель, а объемы опухолей и массу тела регистрировали дважды в неделю. Активированный ТСВ С1104 использовали для исследований *in vivo*. Конструкция С1104 отличается от С1107 только расщепляемым линкером, используемым для присоединения CD3-маскирующего фрагмента к scFv. После активации протеазы *in vitro* для полного удаления маскирующих фрагментов активированный С1104 становится идентичным активированному С1107 и может использоваться для оценки активности активированного С1107, а последующие исследования цитотоксичности *in vitro* подтвердили, что активность активированного С1104 такая же, как и у активированного С1107.

Исследования безопасности на приматах, не относящихся к человеку

[0240] Самцы яванских макак получали медленную внутривенную болюсную инъекцию тестируемых образцов в День 1 или один раз в Дни 1 и 15, в зависимости от тестируемого продукта. После введения тестируемого препарата клинические наблюдения проводились два раза в день. Образцы крови собирали в различные моменты времени после введения дозы для анализа высвобождения цитокинов, биохимических показателей сыворотки, гематологических и токсикокинетических показателей. Анализ цитокинов проводился на образцах сыворотки с использованием набора Life Technologies Monkey Magnetic 29-Plex Panel Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для токсикокинетического анализа образцы обрабатывали до получения плазмы и хранили при температуре от -60 до -86°C перед отправкой на анализ в АП Bioscience (Индианаполис, Индиана) или CytomX. Концентрации тестируемых продуктов в плазме измеряли с помощью ИФА с использованием иммобилизованного антиидиотипического антитела и иммобилизованного антитела против IgG (Fc) человека. Токсикокинетический анализ проводился компанией Northwest PK Solutions с использованием некомпартментного анализа с использованием Phoenix WinNonlin v6.4 (Чертара, Принстон, Нью-Джерси).

Результаты

[0241] СИ107 был разработан как (активируемая) с двойной маскировкой двуручечная двухвалентная биспецифическая молекула, содержащая домены против EGFR и CD3. СИ107 был создан с использованием антитела, полученного из цетуксимаба, с происходящим из SP34 scFv против CD3ε, слитым с N-концом тяжелой цепи. СИ107 содержит Fc-домен IgG1 человека с мутациями, которые подавляют функцию Fc. Для создания СИ107 специфический маскирующий пептид для компонента антитела против EGFR был слит с N-концом легкой цепи с использованием расщепляемого протеазой субстратного линкера, фланкированного гибкими пептидными линкерами, богатыми Gly-Ser, как описано ранее (Desnoyers 2013). Маскирующий пептид, специфичный для компонента против CD3, аналогичным образом добавляли к scFv с использованием расщепляемого протеазой субстратного линкера. СИ107 нарушал эффекторную функцию Fc, сводя к минимуму перекрестное связывание с клетками, экспрессирующими FcγR. Конструкция предназначена для максимизации связывания с мишенью и активности в богатом протеазами микроокружении опухоли при минимизации связывания и активности в нормальных тканях. Все сравниваемые ТСВ, использованные в этом примере, содержат EGFR- и CD3-связывающие домены, маскирующие фрагменты и линкерные пептиды с различной степенью расщепляемости. СИ101 и СИ104 представляют собой версии СИ104 и СИ107 первого поколения. Молекулы СИ104 и СИ107 содержат оптимизированный scFv CD3, расщепляемые линкеры нового поколения и дополнительные мутации, подавляющие Fc. СИ104 и СИ107 имеют одинаковые маскирующие фрагменты и домены связывания EGFR и CD3, но различаются линкером протеазы CD3; однако после активации протеазы активированный ТСВ остается тем же. СИ128 использовали в качестве направленного контроля, в котором связывающийся с EGFR фрагмент заменен нерелевантным антителом (антителом против RSV).

Маскирование ухудшает связывание EGFR на поверхности клетки.

[0242] Чтобы оценить, ухудшает ли маскирование EGFR-связывающего домена связывание с EGFR, экспрессирующимся на поверхности клетки, измеряли связывание СИ107 и сравниваемых активированных конструкций ТСВ (т.е. акт.-ТСВ) с клетками HT29 и HCT116, экспрессирующими EGFR.

[0243] Клетки-мишени инкубировали с возрастающими концентрациями СИ107 или сравниваемыми активированными конструкциями, и связывание оценивали с помощью проточной цитометрии. Как представлено на Фиг. 7А и 7В, присутствие EGFR-маскирующего фрагмента в СИ107 существенно ослабляло связывание с EGFR, экспрессируемым на поверхности клеток, по сравнению с активированным ТСВ СИ107. Активированные конструкции ТСВ связывались с клетками HT29 с расчетной Kd 0,17 нМ,

тогда как Kd для связывания СИ107 составляла 91,28 нМ, что представляет собой более чем 500-кратное снижение связывания по сравнению с активированным ТСВ. Аналогичные результаты были получены с использованием клеток НСТ116. Также оценивалось связывание СИ128, ненаправленного контрольного ТСВ, которое содержит тот же модуль против CD3, что и СИ107, но не имеет нацеливания на EGFR. Этот контроль не связывался с клетками НТ29 или НСТ116 (см. Фиг. 7А и 7В).

Маскировка ухудшает связывание CD3 на поверхности лимфоцитов.

[0244] Чтобы определить, ухудшает ли маскировка связывающего домена против CD3 СИ107 с CD3 на поверхности лимфоцитов, измеряли связывание СИ107 и активированного СИ107 (т.е. активированного ТСВ) с клетками Jurkat. Как представлено на Фиг 7С, активированное ТСВ связано с клетками Jurkat с Kd 0,62 нМ. Однако связывание СИ107 не было обнаружено, и Kd не удалось рассчитать. Активированный контрольный СИ128 связывал клетки Jurkat с такой же степенью аффинности, как и активированное ТСВ.

[0245] В совокупности эти данные демонстрируют, что двойная маскировка доменов связывания против EGFR и CD3 в СИ107 ослабляет связывание с клетками, экспрессирующими EGFR или CD3.

Маскировка ослабляет цитотоксичность и активацию Т-клеток в совместной культуре РВМС.

[0246] Чтобы выяснить, может ли нацеливание на EGFR с помощью СИ107 привести к эффектам против опухолевых клеток, были проведены анализы цитотоксичности *in vitro*. Клетки НТ29 или НСТ116, экспрессирующие люциферазу, культивировали совместно с РВМС человека и инкубировали с увеличивающимися концентрациями СИ107, активированным ТСВ или ненаправленным контрольным СИ128. Через 48 часов культивирования жизнеспособность клеток НСТ116-Luc2 или НТ29-Luc2 измеряли с помощью анализа люциферазы. Как представлено на Фиг. 8А, обработка контрольным СИ128 приводила к минимальной цитотоксичности для клеток НСТ116-Luc2, совместно культивируемых с РВМС, демонстрируя, что для цитотоксической активности необходимо участие как EGFR, так и CD3. Напротив, как маскированный СИ107, так и активированный СИ107 (т.е. акт.-ТСВ) оказывали цитотоксическое действие на клетки НСТ116-Luc2. Однако активированное ТСВ приводило к цитотоксичности при гораздо более низких концентрациях по сравнению с маскированной формой: значения EC50 составляли 0,44 пМ и 7297 пМ соответственно. Аналогичные результаты наблюдались в клетках НТ29-Luc2 со значениями EC50 0,25 пМ для активированного ТСВ по сравнению с 3678 пМ для СИ107 (Фиг. 8В). Таким образом, двойная маскировка доменов против

EGFR и CD3 в СИ107 привела к около 15000-кратному снижению цитотоксической активности, опосредованной РВМС, при отсутствии активации протеазы.

Воздействие СИ107 приводит к индукции экспрессии CD69, маркера активации Т-клеток.

[0247] Чтобы определить, приводит ли СИ107 к активации Т-клеток, уровни CD69 в РВМС, совместно культивированных с клетками НСТ116-Luc2 или НТ29-Luc2, измеряли после обработки маскированным СИ107, активированным СИ107 (т.е. акт.-ТСВ) и контрольным СИ128. CD69 действует как маркер активации Т-клеток; после взаимодействия TCR/CD3 экспрессия CD69 быстро индуцируется на поверхности Т-лимфоцитов и действует как костимулирующая молекула для активации и пролиферации Т-клеток. РВМС человека, совместно культивированные с клетками НСТ116-Luc2 или НТ29-Luc2, обрабатывали возрастающими концентрациями СИ107, активированного ТСВ (т.е. активированного СИ107) или контрольного СИ128 в течение 16 часов, и уровни экспрессии CD69 измеряли с помощью проточной цитометрии. Как представлено на Фиг. 8С, СИ107 приводил к индукции экспрессии CD69 на CD8⁺ Т-клетках, совместно культивированных с клетками НСТ116-Luc2, с EC50 14178 пМ. Напротив, обработка активированным СИ107 приводила к индукции CD69 с EC50 7,65 пМ, что отражает приблизительно 18000-кратный сдвиг кривой активации Т-клеток по сравнению с СИ107. Активация Т-клеток не наблюдалась при использовании контрольного СИ128, не нацеленного на EGFR, что указывает на то, что участия только CD3 недостаточно для активации Т-клеток. Аналогично, обработка РВМС от одного донора, совместно культивированных с клетками НТ29-Luc2, привела к индукции CD69 со значениями EC50 65971 пМ для маскированного СИ107 по сравнению с 8,75 пМ для активированного ТСВ, что отражает приблизительно 7500-кратную разницу в индукционной способности CD69 (Фиг. 8D).

Воздействие СИ107 приводит к высвобождению цитокинов.

[0248] Для дальнейшей оценки активации Т-клеток в РВМС, совместно культивированных с раковыми клетками, экспрессирующими EGFR, после воздействия ТСВ, оценивали высвобождение цитокинов после воздействия СИ107, активированного ТСВ (т.е. активированного СИ107) или контрольного СИ128. Уровни IFN- γ , IL-2, IL6, MCP-1 и TNF- α измерялись через 16 часов после обработки возрастающими концентрациями ТСВ. Как представлено на Фиг. 9А-9Е, воздействие СИ107 в концентрациях в диапазоне 104 пМ приводила к высвобождению каждого из измеренных цитокинов. Напротив, активированное ТСВ приводило к высвобождению цитокинов при воздействии концентрациями в диапазоне 1-100 пМ. Эти результаты в целом соответствовали

различным донорным клеткам РВМС и линиям раковых клеток (НСТ116-Luc2 по сравнению с НТ29-Luc2).

[0249] В совокупности эти данные демонстрируют, что двойная маскировка доменов связывания EGFR и CD3 в СИ107 ослабляет активацию Т-клеток при отсутствии активации протеазы.

Чувствительность ТСВ к расщеплению протеазой коррелирует с противоопухолевой эффективностью in vivo и внутриопухолевыми Т-клетками.

[0250] Противоопухолевую эффективность ТСВ оценивали *in vivo*. Мышам с ослабленным иммунитетом, несущих опухоли НТ29-Luc2 и которым были привиты РВМС человека, вводили раз в неделю в течение 3 недель носитель (ФСБ) или 0,3 мг/кг ТСВ, содержащими линкеры с различной чувствительностью к протеазам (СИ101, СИ040), нерасщепляемый линкер (СИ020), или немаскированный биспецифический терапевтический препарат СИ048. Ожидается, что СИ020 будет обладать минимальной противоопухолевой активностью из-за нерасщепляемого линкера, в то время как немаскированный СИ048 будет иметь максимальную эффективность. СИ101 и СИ040, которые содержат EGFR- и CD3-маскирующие фрагменты, имеют разную чувствительность к протеазам из-за разных линкерных пептидов; чувствительность к протеазам у СИ040 выше, чем у СИ101.

[0251] Как представлено на Фиг. 10А, лечение немаскированным ТСВ СИ048 приводило к регрессии опухоли в течение одной недели после начала лечения. Аналогично, лечение маскированными СИ101 и СИ040 также приводило к регрессии или стабилизации опухоли; регрессия, наблюдаемая для СИ040, коррелирует с большей расщепляемостью линкеров в этой молекуле по сравнению с СИ101. Напротив, воздействие СИ020, который содержит нерасщепляемые линкеры, не влияла на рост опухоли, что указывает на то, что расщепляемость протеазой необходима для противоопухолевой активности ТСВ *in vivo*.

[0252] Чтобы определить, коррелирует ли противоопухолевая эффективность, опосредованная тестируемыми ТСВ, с присутствием Т-клеток в опухолях, опухоли собирали через неделю после того, как животные получили дозу 1 мг/кг маскированного ТСВ или активированного ТСВ, и проводили иммуногистохимическое исследование для CD3. Как представлено на Фиг. 10В, минимальное количество Т-клеток наблюдалось в опухолевой ткани после обработки носителем или нерасщепляемым СИ020. Напротив, повышенное количество Т-клеток наблюдалось при воздействии ТСВ СИ040 или активированным протеазой *in vitro* ТСВ СИ048. Опять же, ТСВ с большей чувствительностью к протеазе (СИ040) привел к увеличению количества Т-клеток в

опухоли.

[0253] В совокупности эти данные позволяют предположить, что ТСВ могут приводить к образованию внутриопухолевых Т-клеток и противоопухолевой эффективности *in vivo*, которая коррелирует с чувствительностью к протеазному расщеплению маскирующих фрагментов EGFR и CD3-связывающего домена.

Лечение СИ107 вызывает дозозависимую регрессию сформировавшихся ксенотрансплантатных опухолей.

[0254] Оценивали влияние СИ107 на рост опухоли *in vivo*. Мышам NSG подкожно имплантировали клетки HT29 с последующей в/б инъекцией РВМС, и РВМС давали прижиться в течение приблизительно 11 дней. Затем животным вводили носитель, 0,5 мг/кг СИ107 или 1,5 мг/кг СИ107 один раз в неделю в течение 3 недель. Как представлено на Фиг. 11А, лечение СИ107 в дозе 0,5 мг/кг приводило к стазу опухоли, а СИ107 в дозе 1,5 мг/кг приводило к регрессии опухоли, начинающейся приблизительно через неделю после начала лечения.

[0255] Эффективность СИ107 *in vivo* также оценивали в опухолях НСТ116. После приживления опухоли и РВМС животным вводили носитель, 0,3 мг/кг СИ107, 1 мг/кг СИ107 или 0,3 мг/кг активированного ТСВ. Как представлено на Фиг. 11В, доза 0,3 мг/кг СИ107 задерживала рост опухоли НСТ116, тогда как 1 мг/кг СИ107 и 0,3 мг активированного ТСВ приводили к сходным уровням регрессии и стаза опухоли на протяжении всего периода лечения.

[0256] Эти данные демонстрируют, что СИ107 индуцирует дозозависимое ингибирование роста опухоли и регрессию в ксенотрансплантатных опухолях HT29 и НСТ116 и что противоопухолевая активность в 3 раза более высокой дозы СИ107 аналогична активности активированного ТСВ.

Маскированный СИ107 обеспечивает повышенную безопасность по сравнению с активированным СИ107 у яванских макаков.

[0257] Доклиническую переносимость СИ107 оценивали в исследованиях на яванских макаках. Животные получали однократное введение 0,06 мг/кг или 0,18 мг/кг активированного СИ107 (т.е. акт.-ТСВ) и 0,6 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4,0 мг/кг или 6,0 мг/кг СИ107, за животными следили для клинических наблюдений. У животных, получавших активированное ТСВ в дозе 0,18 мг/кг, наблюдались серьезные клинические эффекты, включая рвоту, отсутствие аппетита, бледность, сгорбленную позу и худобу, причем побочные эффекты отмечались уже через 2 часа и до 10 дней после введения дозы. У животных, получавших активированное ТСВ в дозе 0,06 мг/кг, наблюдались умеренные и временные клинические эффекты, включая рвоту и сгорбленную позу в первый день

после введения дозы; учитывая быстрое купирование этих эффектов, 0,06 мг/кг была определена как максимально переносимая доза (MTD) для активированного ТСВ. Напротив, у животных, получавших СИ107 в дозе 2,0 мг/кг, наблюдались только временные и легкие клинические эффекты (рвота на День 2), а у животных, получавших СИ107 в дозе 0,6 мг/кг, не наблюдалось никаких нежелательных явлений. У животных, получавших 4,0 мг/кг СИ107, наблюдались умеренные клинические эффекты (включая рвоту через 4, 8 и 24 часа после введения дозы и отсутствие аппетита на День 2). Животное, получившее 6,0 мг/кг СИ107, было найдено мертвым в День 2. Клинические признаки, отмеченные до смерти, включали сгорбленную позу, бледность, рвоту и жидкий кал после введения дозы. Таким образом, MTD для СИ107 считали 4,0 мг/кг. В целом, маскированный СИ107 достиг более чем 60-кратного улучшения переносимости по сравнению с активированным ТСВ.

[0258] Уровни цитокинов также исследовали после воздействия активированным СИ107 или маскированным СИ107. Как представлено на Фиг. 12, уровни IL-6 (12A) и IFN- γ (12B) были повышены у животных, получавших активированное ТСВ, через 8 часов после введения дозы. Напротив, минимальные изменения IL-6 или IFN- γ наблюдались после введения 0,6 мг/кг или 2,0 мг/кг СИ107; повышенные уровни этих цитокинов наблюдались только после получения СИ107 в дозе 4,0 мг/кг. В соответствии с клиническими наблюдениями, СИ107 сдвигает дозозависимую реакцию высвобождения цитокинов более чем в 60 раз.

[0259] Анализ химического состава сыворотки также продемонстрировал различия между активированным ТСВ и СИ107. Как представлено на Фиг. 12C, воздействие активированным ТСВ приводило к дозозависимому повышению уровня аспаратаминотрансферазы (АСТ), маркера гепатоцеллюлярного повреждения, через 48 часов после введения дозы. Напротив, никаких изменений в АСТ не наблюдалось после воздействия СИ107 ни на одном из переносимых уровней дозы, что свидетельствует об улучшенной переносимости этого маскированного ТСВ.

[0260] Чтобы определить, влияет ли маскировка доменов связывания с EGFR и CD3 на фармакокинетику, после введения дозы измеряли концентрации активированного ТСВ (т.е. активированного СИ107) и маскированного СИ107. Как представлено на Фиг. 12D, активированное ТСВ быстро выводится из кровообращения в течение 24 часов после введения дозы. Напротив, СИ107 сохранялся в плазме до 7 дней после приема, что позволяет предположить, что маскирование может увеличить воздействие по сравнению с активированным ТСВ. AUC(0-7) после однократного введения активированного ТСВ в дозе 0,06 мг/кг составляла 0,04 дня*нМ (n=1), тогда как AUC(0-7) после введения СИ107 в

дозе 2 мг/кг составляла 331,7 дня*нМ (в среднем n=3), демонстрируя более чем 8000-кратное увеличение переносимого воздействия.

[0261] Это демонстрирует, что улучшения переносимости и фармакокинетики, наблюдаемые при использовании маскированного C1107, согласуются с ожидаемым ослаблением связывания с EGFR и CD3 в окружении нормальных тканей.

Таблица 11. Таблица последовательностей

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	MM1 – Комплекс-67	VSTTCWWDPPCTPNT
2	CM1	GLSGRSDDH
3	CDR1 VH Комплекс-67	KYAMN
4	CDR2 VH Комплекс-67	RIRSKYNNYATYYADSVKD
5	CDR3 VH Комплекс-67	HGNFGNSYISYWAY
6	CDR1 VL Комплекс-67	GSSTGAVTSGNYPN
7	CDR2 VL Комплекс-67	GTKFLAP
8	CDR3 VL Комплекс-67	VLWYSNRWV
9	VH1 Комплекс-67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS
10	VL1 Комплекс-67	QTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSN RWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
11	scFv Комплекс-67	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRH GNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAV TSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR WVFGGGTKLTVL
12	Линкер	GSSGGSGGSG
13	MM2 Комплекс-67 Комплекс-57	LSCEGWAMNREQCRA
14	CM2	ISSGLLSGRSDQH
15	CDR1 VH2 Комплекс-67 Комплекс-57	NYGVH
16	CDR2 VH2 Комплекс-67 Комплекс-57	VIWSSGNTDYNTPFST
17	CDR3 VH2 Комплекс-67 Комплекс-57	ALTYDYEFAY
18	CDR1 VL2 Комплекс-67 Комплекс-57	RASQSIGTNIH
19	CDR2 VL2 Комплекс-67 Комплекс-57	YASESIS
20	CDR3 VL2 Комплекс-67 Комплекс-57	QQNNNWPTT

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
21	Домен VH2 Комплекс-67 Комплекс-57 С1106 (Контроль)	QVQLKQSGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVH WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTRSLSI NKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYID YEFAYWGQGLTVTVSA
22	Домен VL2 Комплекс-67 Комплекс-57 С1106 (Контроль)	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQ QRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTL NSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAG TKLELK
23	Fc1 Комплекс-67 Комплекс-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	Fc1 с концевым лизином	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	Домен CL Комплекс-67 Комплекс-57 С1106 (Контроль)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS TLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
26	CH1-IgG1 человека-Комплекс-67 Комплекс-57	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVK
27	Холостой опыт	

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
28	Fc2 без C-концевого лизина Комплекс-67 Комплекс-57	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDG SFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	Fc2 с C-концевым лизином	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGS TYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDG SFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	Первый Полипептид Комплекс-67	[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGL <u>SGRSDDHGGGSEVOLVESGGGLVOPGGSLKLSCAAS</u> <u>GFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY</u> <u>YADSVKDRFTISRDDSKNTAYLOMNNLKTEDTAVYYC</u> <u>VRHGNFGNSYISYWAYWGOGTLVTVSSGGGGSGGGG</u> <u>SGGGGSOTVVTQEPSTVSPGGTIVLTCGSSTGAVTS</u> <u>GNYPNWVQOKPGOAPRGLIGGTFKFLAPGTPARFSGS</u> <u>LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG</u> <u>TKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVS</u> GFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLVGVIWSSGNTD YNTPFTRSLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIY YCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		TISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPG
31	Второй Полипептид Комплекс-67 Комплекс-57 С1106 (контроль)	[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA GGGSSGGS /SS GLLSGRSDQH GGGS QILLTQSPVILSVSPGERVSFSC RASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPS RFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWP TTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
32	Третий Полипептид Комплекс-67 Комплекс-57	DKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPCSEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYD TTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
33	Спейсер	QGQSGS
34	Шарнир-1 Комплекс-67 Комплекс-57 С1106 (контроль)	EPKSCDKTHTCPPC

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
35	Шарнир-2 Комплекс-67 Комплекс-57	DKTHTCPPC
36	Третий Полипептид с концевым лизином Комплекс-67 Комплекс-57	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPCSEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYD TTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFCSSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	2-й полипептид без спейсера Комплекс-67; Комплекс-57	LSCEGWAMNREQCRAAGGGSSGSSISSGLLSGRSD QHGGGSQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGT NIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSG TDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTK LELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSITLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
38	Комплекс-57 1-й Полипептид без концевого лизина.	<u>QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGGGGLS</u> <u>GRSDDHGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSS</u> TGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPG VPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALW YSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNW VRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHN FGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLKQ SGPGLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSLRSINKDNSKS QVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWG QGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS G VHTFPAVLQSSG L Y SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSR K EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVL K SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
39	Линкер	GGGS
40	Линкер	(GGGS) _n
41	Линкер	(GSGGS) _n
42	Линкер	GGSG
43	Линкер	GGSGG
44	Линкер	GSGSG
45	Линкер	GSGGG
46	Линкер	GGGSG
47	Линкер	GSSSG
48	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGS
49	Линкер	GGGSGS
50	Линкер	GGGSGGGGSGGGGS
51	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGS
52	Линкер	GGGS
53	Линкер	GGGSGGGGS
54	Линкер	GGGS
55	Линкер	GGGSGGGGS
56	Линкер	GGGSGGGGSGGGGS
57	Линкер	GSSGGSGGSGG

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
58	Линкер	GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	Линкер	GSTSGSGKPGSSEGST
60	Линкер	SKYGPPCPPCPAPEFLG
61	Линкер	GGSLDPKGGGGS
62	Линкер	PKSCDKTHTCPPAPPELLG
63	Линкер	GKSSGSGSESKS
64	Линкер	GSTSGSGKSSEGKG
65	Линкер	GSTSGSGKSSEGGSGSTKG
66	Линкер	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
67	MM1	MMYCGGNEVLCGPRV
68	MM1	GYRWGCEWNCGGITT
69	MM1	MMYCGGNEIFCEPRG
70	MM1	GYGWGCEWNCGGSSP
71	MM1	MMYCGGNEIFCGPRG
72	MM1	GYLWGCEWNCGGITT
73	CM1 Комплекс-67 Комплекс-57 C1106	LSGRSDDH
74	CM	ISSGLLSGRSDQH
75	CM	LSGRSDNH
76	CM	TSTSGRSANPRG
77	CM	VHMPLGFLGP
78	CM	AVGLLAPP
79	CM	QNQALRMA
80	CM	ISSGLLSS
81	CM	ISSGLLSGRSDNH
82	CM	LSGRSGNH
83	CM	LSGRSDIH

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
84	CM	LSGRSDQH
85	CM	LSGRSDTH
86	CM	LSGRSDYH
87	CM	LSGRSDNP
88	CM	LSGRSANP
89	CM	LSGRSANI
90	CM	LSGRSDNI
91	CM	ISSGLLSGRSANPRG
92	CM	AVGLLAPPTSGRSANPRG
93	CM	AVGLLAPPSGRSANPRG
94	CM	ISSGLLSGRSDDH
95	CM	ISSGLLSGRSDIH
96	CM	ISSGLLSGRSDTH
97	CM	ISSGLLSGRSDYH
98	CM	ISSGLLSGRSDNP
99	CM	ISSGLLSGRSANP
100	CM	ISSGLLSGRSANI
101	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
102	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
103	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
104	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
105	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
106	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
107	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANP
108	CM	AVGLLAPPGGLSGRSANI
109	CM	ISSGLLSGRSDNI
110	CM	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
111	CM	ISSGLLSGRSGNH

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
112	Полинуклеотид Кодирующий Первый Полипептид Комплекс- 67	CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTT GGTGGGACCCTCCATGCACACCTAATACCGGCA GCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGAGGACTGT CTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGAGGATCTG AGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGG TTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCAT GAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCT TGAATGGGTTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAA CAACTATGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAA GGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAA GAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGTGCG GCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTA CTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCAC AGTTTCTAGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGG TGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAGTGGT CACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGC GGAACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACA GGCGCCGTGACCAGCGGCAACTACCCTAATTGG GTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGA CTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGA ACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGA GGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAG CCTGAGGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTG TGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCCGGCGGAGGC ACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGC CAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTC GTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGT ACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGACCAATTACGGC GTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAAGGGA CTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGC

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		AACACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGA CTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAG GTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAG GATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGA CCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACA GGGAACCCTCGTGACAGTGTCTGCTGCTAGCAC AAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGC AGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCA GTGACCGTGTCCCTGGAATAGCGGAGCACTGACA TCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGT CTAGCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGAC AGTGCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCT GCGATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGC TCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTG TTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC AGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACAAT GCCAAGACCAAGCCTTGCAGAGGAACAGTACGGC AGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCT CCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC CAGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCT CCAAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCT TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGA CAGCCCAGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCT GTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCCTGTACA

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC AGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGTCT CTGAGCCCCGGCAAA
113	Полинуклеотид Кодирующий Второй Полипептид Комплекс-57 Комплекс-67 С1106	CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAA GGTTGGGCGATGAATAGAGAACAATGTCGAGCC GGAGGTGGCTCGAGCGGGCTCTATCTCTTCC GGACTGCTGTCCGGCAGATCCGACCAGCACGGC GGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTCCT GTCATACTGAGTGTCTCCCCGGCGAGAGAGTC TCTTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGTCTATTGGGA CTAACATACTGGTACCAGCAACGCACCAACG GAAGCCCGCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCG AAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCG GCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCA TTAACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGATT ATTATTGCCAGCAGAACAACA ACTGGCCGACCA CCTTTGGCGCGGGCACCAACTGGA ACTGAAAC GTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAG ACTACGAGAAACACA AAGTCTACGCCTGCGAAG TCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAA

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		AGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
114	Полинуклеотид Кодированный Третий Полипептид Комплекс-57 Комплекс-67	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTC CAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGT TCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAG CAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG TGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGC CAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCA GCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGC TGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTC CTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCTC CAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGAC AGCCCGAGAACAACACTACGACACCACACCTCCAG TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAG CGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCT GAGCCTGTCTCCTGGCAA

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
115	Легкая Цепь/Второй Полипептид Комплекс-57 Комплекс-67 С1106	CAAGGACAATCTGGACAGGGCCTGAGCTGTGAA GGCTGGGCCATGAATAGAGAGCAGTGCAGAGCT GGCGGCGGATCTTCTGGCGGCTCTATCTCTTCTG GACTGCTGAGCGGCAGAAGCGATCAACACGGCG GAGGCTCTCAGATCCTGCTGACACAGAGCCCCG TGATCCTGTCTGTGTCTCCTGGCGAGAGAGTGT CTCAGCTGTAGAGCCAGCCAGTCCATCGGCAC CAACATCCACTGGTATCAGCAGCGGACCAACGG CAGCCCCAGACTGCTGATTAAGTACGCCAGCGA GAGCATCAGCGGCATCCCCAGCAGATTTTCTGG CAGCGGCTCTGGCACCGACTTCACCCTGAGCAT CAACAGCGTGGAAGCGAGGATATCGCCGACTA CTA CTGCCAGCAGAACAACA ACTGGCCCACCAC CTTTGGAGCCGGCACCAAGCTGGA ACTGAAGAG AACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTT CATCTTCCCA CCTTCCGACGAGCAGCTGAAAAGCGGCACAGCC TCTGTCGTGTGCCTGCTGAACA ACTTCTACCCCA GAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAATAGCCAAGAGTCTGTG ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGC CTGAGCAGCACCCCTGACACTGAGCAAGGCCGAC TACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTG ACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAG AGCTTCAACCGGGGCGAGTGT
116	спейсер	QGQSGS
117	спейсер	QGQSGQG
118	спейсер	QGQSGS
119	спейсер	QGQSGQG
120	Первый полипептид без спейсера и с концевым лизином Комплекс-67	<u>VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDDH</u> <u>GGGSEVOLVE SGGLVOPGGSLKLSCAASGFTFNKY</u> <u>AMNWRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKD</u> <u>RFTISRDDSKNTAYLOMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG</u>

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		<p><u>NSYISYWAYWGOGLTVTVSSGGGGSGGGGS</u> <u>GGGS</u> <u>QTVVTOEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNW</u> <u>VOOKPGOAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKA</u> <u>ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL</u> GGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLT NYGVHWVVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPF TSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARA LTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSAFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK</p>
121	Холостой опыт	
122	scFv против CD3 V16 Комплекс-57 CII06	<p>QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILG NKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA YLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYVSWFAY WGQGLTVTVSS</p>
123	CII06 — Тяжелая Цепь CRF41- 2008C225v5Fcmt4- h20GG-0011-v16sc-H-N	<p>QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGGGGLS GRSDDHGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPG VPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCALW YSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEV</p>

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		QLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNW VRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLKQ SGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTRSLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWG QGTLTVTSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPASI EK TISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
124	Fc CI106	PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASI EK TISKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
125	Тяжелая Цепь С1106 - CRF41- 2008C225v5Fcmt4h20GG -0011v16sc-H-N	CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTT GCGAGTGGAATTGCGGAGGGATCACTACAGGCT CGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGA GCGGCCGTTCCGATGATCATGGCGGCGGTTCTC AAAGTGTAGTAACTCAAGAACCAAGCTTCTCCG TCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTACCTGCCG AAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACCAGTAACTA TGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGC TCCGCGCGGATTGATAGGAGGCACGAATAAACG GGCACCCGGTGTCCCGGACAGATTCAGCGGAAG CATACTCGGTAATAAGGCAGCTCTTACTATCACT GGGGCCCAAGCTGATGATGAAAGTGATTATTAT TGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGGGTGTTG GGGGTGGCACGAAACTTACTGTCTTGGGCGGCG GCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGA GGCTCAGAAGTCCAAGTGGTCGAATCCGGGGGA GGGCTCGTACAGCCGGGTGGGTCCCTCAAATC TCTTGTGCGCCTCAGGGTTTACCTTCAGTACAT ACGCGATGAATTGGGTCCGGCAGGCCAGTGGGA AAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATCCGATCAA AATACAACAACACTACGCTACTTATTACGCTGATTC CGTGAAGGACAGATTCACAATATCCC GCGACGA TAGCAAGAATACGGCATATCTTCAGATGAATTC TCTTAAACTGAGGATACCGCTGTGTATTACTGC ACAAGACATGGTAATTTTGGAAACTCATATGTCT CTGGTTCGCTTATTGGGGACAGGGCACGTTGGT TACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGATCCCAGGT GCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTGCA GCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGT GAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCA TTGGGTGCGCCAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGA ATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGGCAACAC

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		CGATTATAACACCCCGTTTACCAGCCGCCTGAGC ATTAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTT TTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATAACC GCGATTTATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATT ATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCA CCCTGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGG GCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAA GAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACCAGAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCAAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATC CCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCC TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTC CCTGTCTCCGGGТААА
126	Линкер	(GGGGS) _n
127	Линкер	GGGSSGGS
128	CDR1 VH1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	TYAMN
129	CDR2 VH1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	RIRSKYNNYATYYADSVKD
130	CDR3 VH1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	HG NFGNSYVSWFAY
131	CDR1 VL1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	RSSTGAVTTSNYAN
132	CDR2 VL1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	GTNKRAP
133	CDR3 VL1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	ALWYSNLWV
134	Домен VH1 Комплекс-57 СП106 (контроль)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAM NWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRH GNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
135	Домен VL1 Комплекс-57 С1106 (контроль)	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILG NKAALTITGAQADDES DY CALWYSN LWVFGGGTKLTVL
136	Первый Полипептид с концевым лизином Комплекс-57	QGQSGSGYLWGCEWNCGGITGSSGGSGGGGGLS GRSDDHGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSS TGA VTTSNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPG VPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDES DY CALW YSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEV QLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFSTYAMNW VRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR HGN FGNSYVSWFAYWGQGLVTVSSGGGGSQVQLKQ SGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP GKGLEWLGVWISGGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKS QVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWG QGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKV DK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPV LKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
137	Первый Полипептид без концевого лизина Комплекс-67	<p>[<u>QGQSGS</u>]<u>VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGL</u> <u>SGRSDDHGGGSEVOLVESGGGLVOPGGSLKLSCAAS</u> <u>GFTFNKYAMNWVROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATY</u> <u>YADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYC</u> <u>VRHGNFGNSYISYWAYWGOGTLVTVSSGGGGSGGGG</u> <u>SGGGGSQTVVTOEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTS</u> <u>GNYPNWVQOKPGOAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS</u> <u>LLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGG</u> <u>TKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVS</u> GFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTD YNTPFTRSLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIY YCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>
138	Холостой опыт	
139	Полинуклеотид, кодирующий 1-й полипептид без концевого лизина Комплекс-67	<p>CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTT GGTGGGACCCTCCATGCACACCTAATACCGGCA GCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGAGGACTGT CTGGCAGATCCGATGATCACGGCGGAGGATCTG AGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGG TTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGC CGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCAT GAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCT TGAATGGGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAA</p>

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		СААСТАТGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAA GGACAGATTCAACATCAGCCGGGACGACAGCAA GAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAACCTGAA AACCGAGGACACCGCCGTGТАCTACTGTGTGCG GCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTA CTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCAC AGTTTCTAGTGGCGGAGGGCGGATCTGGCGGCGG TGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAGTGGT CACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGC GGAACCGTGACACTGACATGCGGATCTTCTACA GGCGCCGTGACCAGCGGCAACTACCCTAATTGG GTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGA CTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGA ACACCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGA GGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGCGTGCAG CCTGAGGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTG TGGTACAGCAACAGATGGGTGTTCCGGCGGAGGC ACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGC CAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTC GTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGT ACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGACCAATTACGGC GTGCACTGGGTTCGACAATCTCCCGGCAAGGGA CTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGC AACACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGA CTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAG GTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAG GATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGA CCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACA GGGAACCCTCGTGACAGTGTCTGCTGCTAGCAC AAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGC AGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCA

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		<p>GTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACA TCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGT CTAGCGGCCTGTA CTCTGTCCAGCGTTGTGAC AGTGCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA CATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCT GCGATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGC TCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTG TTCCCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATC AGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG GATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTC AATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAGTGCACAAT GCCAAGACCAAGCCTTGCGAGGAACAGTACGGC AGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTG CTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCT CCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGC CAGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCT CCAAGCCGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGT GTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCT TCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGA CAGCCCGAGAACA ACTACAAGACAACCCCTCCT GTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACA GCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGC AGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCC TGTCT CTGAGCCCCGGC</p>
140	<p>3-й Полипептид без С- концевого лизина Комплекс-67 Комплекс-57</p>	<p><u>DKTHTCPPC</u>PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPCSEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYD</p>

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		TTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
141	Полинуклеотид, кодирующий 3-й полипептид, без кодона, кодирующего С- концевой лизин Комплекс-67 Комплекс-57	GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTC CAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTT TCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAG CAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGA TGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC CAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCA GCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGC TGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTC STATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCC AGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCTC CAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGAC AGCCCGAGAACAACACTACGACACCACACTCCAG TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAG CGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA GGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCT GAGCCTGTCTCCTGGC

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
142	Полинуклеотид, кодирующий 1-й полипептид (без кодона для С-концевого лизина) Комплекс-57	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGC TGCAGGTGGAATTGTGGCGGCATCACAACAGGC TCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTGGTGGACTG TCTGGCAGATCCGATGATCATGGCGGCGGATCC CAGACCGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTCC GTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACATGC AGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAAC TACGCCAATTGGGTGCAGCAGACCCCTGGACAG GCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAA AGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGATTCAGCGGC TCTATCCTGGGCAACAAGGCCGCACTGACAATC ACAGGCGCCAGGCCGATGACGAGAGCGATTAC TATTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTTT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGCG GAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCG GTGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCG GAGGACTTGTTTCAGCCAGGCGGCTCTCTGAAGC TGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTACCTTTAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGG CAAAGGCCTGGAATGGGTCCGACGGATCAGAAG CAAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGA CAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGA CGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAA CAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTA CTGCACCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGCTA TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACA CTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCGGAGGTTCTC AGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGACTGG TGCAGCCTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTAC CGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCAATTACGGCGTG CACTGGGTTCGACAATCCCCAGGCAAGGGACTC GAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAAC

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		ACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTG TCCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTG TTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGAT ACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCT ACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGG GAACCCTCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAA AGGGCCCTAGCGTTTTCCACTGGCTCCCAGCAG CAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTG ACCGTGTCCCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCT GGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTA GCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGT GCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCG ATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC AGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTC CCTCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC AGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCC AAGACCAAGCCTTGCAGGAACAGTACGGCAGC ACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAG TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCT ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTC CCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC GATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAG CCCGAGAACAACACTACAAGACAAC CCCTCCTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTC

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		CTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCAGA TGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAG AAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC
143	Полинуклеотид, кодирующий 1 ^{-й} полипептид (с кодоном для С-концевого лизина) Комплекс-57	CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGC TGCGAGTGGAATTGTGGCGGCATCACAACAGGC TCTAGCGGCGGAAGCGGAGGATCTGGTGGACTG TCTGGCAGATCCGATGATCATGGCGGCGGATCC CAGACCGTGGTCACACAAGAGCCTAGCTTCTCC GTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTGACATGC AGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAAC TACGCCAATTGGGTGCAGCAGACCCCTGGACAG GCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAA AGAGCCCCTGGCGTCCCAGATAGATTCAGCGGC TCTATCCTGGGCAACAAGGCCGCACTGACAATC ACAGGCGCCAGGCCGATGACGAGAGCGATTAC TATTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGTGGGTTT TCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGCG GAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCG GTGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCG GAGGACTTGTTTCAGCCAGGCGGCTCTCTGAAGC TGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTCACSTTAGCAC CTACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCTCTGG CAAAGGCCTGGAATGGGTCCGACGGATCAGAAG CAAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCGA CAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGA CGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAA CAGCCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTA

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		CTGCACCAGACACGGCAACTTCGGCAACAGСТА TGTGTCTTGGTTTGCCTACTGGGGCCAGGGCACA CTGGTACAGTTAGTTCTGGCGGCGGAGGTTCTC AGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGACTGG TGCAGCCTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTAC CGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCAATTACGGCGTG CACTGGGTTCGACAATCCCCAGGCAAGGGACTC GAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAAC ACCGACTACAACACCCCATTCACCAGCAGACTG TCCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAGGTG TTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGAT ACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCT ACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGG GAACCCTCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAA AGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAG CAAGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCCAGTG ACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCT GGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTA GCGGCCTGTACTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGT GCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCG ATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC AGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTC CCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC AGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGAT GTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAAT TGGTACGTGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCC AAGACCAAGCCTTGCAGGAACAGTACGGCAGC ACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAGAGTACAAG

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		<p>TGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCT ATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCA GCCTAGAGAACCCCAGGTGTACACACTGCCTCC AAGCCGGAAAGAGATGACCAAGAATCAGGTGTC CCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC GATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAG CCCGAGAACAАCTACAAGACAACCCCTCCTGTG CTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCA AGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAG GGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGTCCCTG TCTCTGAGCCCCGGCAAА</p>
144	1-й полипептид без спейсера и без концевого лизина Комплекс-67	<p>VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDDH GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSАASGFTFN KYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNНYATYY ADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNНLKTEDTAVY YCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQTVVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGS STGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAP GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLKQSGPGL VQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWSSGNTDYNTPFTRSLSINKDNSKSQVFFK MNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGL VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR KEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN</p>

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
		NYKTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
145	1-й Полипептид без спейсера и без концевой лизина Комплекс-57	GYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGLSGRSDDH GGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTT SNYANWVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFS GSILGNKAALTITGAQADDESYYCALWYSNLWV FGGGTKLTVLGGGGSGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMNWVRQASGK GLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS KNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVS WFAYWGGQTLVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQ PSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKLEWL GVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMN SLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTV SAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPG
146	CM	ALAHGLF
147	CM	APRSALAHGLF
148	CM	ISSGLLSGRSNI
149	CM	LSGRSNI

* * *

[0262] Объем раскрытия не ограничивается аспектами, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации данного изобретения в дополнение к

описанным станут очевидными специалистам в данной области техники из приведенного выше описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[0263] Все источники (например, публикации или патенты или заявки на патент), цитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный источник (например, публикация или патент или заявка на патент) был специально и индивидуально указан для включения в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

[0264] Некоторые аспекты находятся в пределах следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс против EGFR и CD3 (ГБПК), содержащий:

(a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), причем VH1 и VL1 вместе образуют домен, направленный на кластер дифференциации Т-клеток (CD3), который специфически связывает полипептид CD3, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1), (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1), (iv) второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1);

(b) второй полипептид, содержащий (i) второй переменный домен легкой цепи (VL2), причем VH2 и VL2 вместе образуют EGFR-направленный домен, который специфически связывает EGFR, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2) и (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2); и

(c) третий полипептид, который (i) содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и (ii) не содержит переменный домен иммуноглобулина.

2. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 1, в котором полипептид CD3 представляет собой эpsilon-цепь CD3.

3. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 1, в котором VH1 содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3),

(ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4), и

(iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и причем VL1 содержит:

(i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6),

(ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и

(iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8).

4. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 3, в котором scFv содержит VH1, который имеет аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:9, и/или VL1, который имеет

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:10.

5. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 4, в котором scFv содержит VH1, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и VL1, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10.

6. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-5, в котором VH2 содержит:

(i) CDR1 VH, содержащую аминокислотную последовательность NYGVH (SEQ ID NO:15),

(ii) CDR2 VH, содержащую аминокислотную последовательность VIWSSGNTDYNTPFST (SEQ ID NO:16), и

(iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность ALTYDYEFAY (SEQ ID NO:17).

7. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-6, в котором VL2 содержит:

(i) CDR1 VL, содержащую последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO:18),

(ii) CDR2 VL, содержащую последовательность YASESIS (SEQ ID NO:19), и

(iii) CDR3 VL, содержащую последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO:20).

8. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 6, в котором VH2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:21.

9. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 6, в котором VH2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:21.

10. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-9, в котором Fc1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:23.

11. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 10, в котором Fc1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:23.

12. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-11, в котором первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи между VH2 и Fc1.

13. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-12, в котором первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина между VH2 и Fc1.

14. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-13, в котором первый полипептид содержит структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца: MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-шарнирная область-Fc1, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

15. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-14, в котором первый полипептид содержит один или более линкеров.

16. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 15, в котором линкер содержит от около 1 до около 20 аминокислот.

17. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-16, в котором VL2 содержит:

(i) CDR1 VL, содержащую аминокислотную последовательность RASQSIGTNIH (SEQ ID NO:18),

(ii) CDR2 VL, содержащую аминокислотную последовательность YASESIS (SEQ ID NO:19), и

(iii) CDR3 VL, содержащую аминокислотную последовательность QQNNNWPTT (SEQ ID NO:20).

18. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 17, в котором VL2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:22.

19. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 18, в котором VL2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:22.

20. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-19, в котором второй полипептид содержит структурную организацию от amino-конца до карбокси-конца: MM2-CM2-VL2, где каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

21. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-20, в котором второй полипептид содержит один или более линкеров.

22. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 21, в котором линкер содержит от около 1 до около 20 аминокислот.

23. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-22, в котором Fc2 связывается с Fc1.

24. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-23, в котором Fc2 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична последовательности SEQ ID NO:28.

25. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 24, в котором Fc2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:28.

26. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-25, в котором по меньшей мере один из первого полипептида и третьего полипептида дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина.

27. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 26, в котором каждый из первого полипептида и третьего полипептида содержит шарнирную область иммуноглобулина.

28. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 27, в котором шарнирная область иммуноглобулина первого полипептида и шарнирная область иммуноглобулина третьего полипептида содержат одинаковую аминокислотную последовательность.

29. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 27, в котором шарнирная область иммуноглобулина первого полипептида и шарнирная область иммуноглобулина третьего полипептида содержат разные аминокислотные последовательности.

30. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-29, в котором третий полипептид содержит шарнирную область иммуноглобулина в структурной организации от amino-конца до карбокси-конца: шарнирная область-Fc2.

31. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-29, в котором первый, второй и/или третий полипептид содержат один или более линкеров.

32. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-31, в котором MM1 связан с CM1 посредством линкера L1.

33. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-32, в котором MM2 связан с CM2 посредством линкера L2.

34. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-31, в котором аминокислотные последовательности L1 и L2 являются одинаковыми.

35. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-31, в котором аминокислотные последовательности L1 и L2 являются разными.

36. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-35, в котором каждый из CM1 и CM2 содержит субстрат для протеазы, которая присутствует в микроокружении опухоли у субъекта, имеющего онкологическое заболевание.

37. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп.

1-36, в котором каждый СМ1 и СМ2 содержит субстрат для одной и той же протеазы.

38. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-36, в котором СМ1 и СМ2 содержат субстраты для различных протеаз.

39. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 32-38, в котором каждый из СМ1 и СМ2 независимо содержит субстрат для протеазы, выбранной из группы протеаз, представленных в Таблице 2.

40. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-39, в котором по меньшей мере один из СМ1 и СМ2 содержит субстрат для сериновой протеазы или матриксной металлопептидазы (ММР).

41. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-40, в котором СМ1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 и/или СМ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

42. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 41, в котором СМ1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

43. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из п. 41 или 42, в котором СМ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

44. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-40, в котором СМ1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73 и/или СМ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:14.

45. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 44, в котором СМ1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:73.

46. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из п. 44 или 45, в котором СМ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

47. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-46, в котором ММ1 и/или ММ2 содержат от около 5 до около 40 аминокислот.

48. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-46, в котором ММ1 выбран из группы, состоящей из : SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:68, SEQ ID NO:69, SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 или SEQ ID NO:72.

49. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-48, в котором ММ2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13.

50. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-49, в котором ММ1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:1.

51. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп.

15-50, в котором по меньшей мере один из одного или более линкеров выбран из группы, состоящей из:

(i) линкера на основе глицина-серина, выбранного из группы, состоящей из $(GS)_n$, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1, $(GGS)_n$, где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:40), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:126), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:41), где n представляет собой целое число, составляющее по меньшей мере 1 (например, целое число от около 1 до около 20 или от около 1 до около 10), $GSSGSGGSG$ (SEQ ID NO:12), $GGSG$ (SEQ ID NO:42), $GGSGG$ (SEQ ID NO:43), $GSGSG$ (SEQ ID NO:44), $GSGGG$ (SEQ ID NO:45), $GGGSG$ (SEQ ID NO: 46) и $GSSSG$ (SEQ ID NO:47), $GGGSGGGGSGGGGSGS$ (SEQ ID NO:48), $GGGSGGS$ (SEQ ID NO:49), $GGGSGGGGSGGGGS$ (SEQ ID NO:50), $GGGSGGGGSGGGGSGGGGS$ (SEQ ID NO:51), $GGGGS$ (SEQ ID NO:52), $GGGSGGGGS$ (SEQ ID NO:53), $GGGS$ (SEQ ID NO:54), $GGGSGGGS$ (SEQ ID NO:55), $GGGSGGGSGGGGS$ (SEQ ID NO:56), $GSSGSGGSGG$ (SEQ ID NO:57), $GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS$ (SEQ ID NO:58), $GGGSSGGS$ (SEQ ID NO:127) и GS ; и

(ii) линкера, содержащего глицин и серин, и по меньшей мере один из лизина, треонина или пролина, выбранного из группы, состоящей из $GSTSGSGKPGSSEGST$ (SEQ ID NO:59), $SKYGPPCPPCPAPEFLG$ (SEQ ID NO:60), $GGSLDPKGGGGS$ (SEQ ID NO:61), $PKSCDKTHTCPPPELLG$ (SEQ ID NO:62), $GKSSGSGSESKS$ (SEQ ID NO:63), $GSTSGSGKSSEGGK$ (SEQ ID NO:64), $GSTSGSGKSSEGGSGSTKG$ (SEQ ID NO:65) и $GSTSGSGKPGSGEGSTKG$ (SEQ ID NO:66).

52. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-51, в котором: (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и (3) третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

53. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-51, в котором: (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и (3) третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

54. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-51, в котором: (1) первый полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 144, (2) второй полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, и (3) третий полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:32.

55. Фармацевтическая композиция, содержащая указанный активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-54 и фармацевтически приемлемый носитель.

56. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п. 55.

57. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидные последовательности, которые кодируют первый полипептид, второй полипептид и третий полипептид указанного активируемого биспецифического полипептида по любому из пп. 1-54.

58. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 57.

59. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 58.

60. Способ получения активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса (ГБПК), включающий:

(a) культивирование клетки-хозяина по п. 59 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования ГБПК; и

(b) выделение ГБПК.

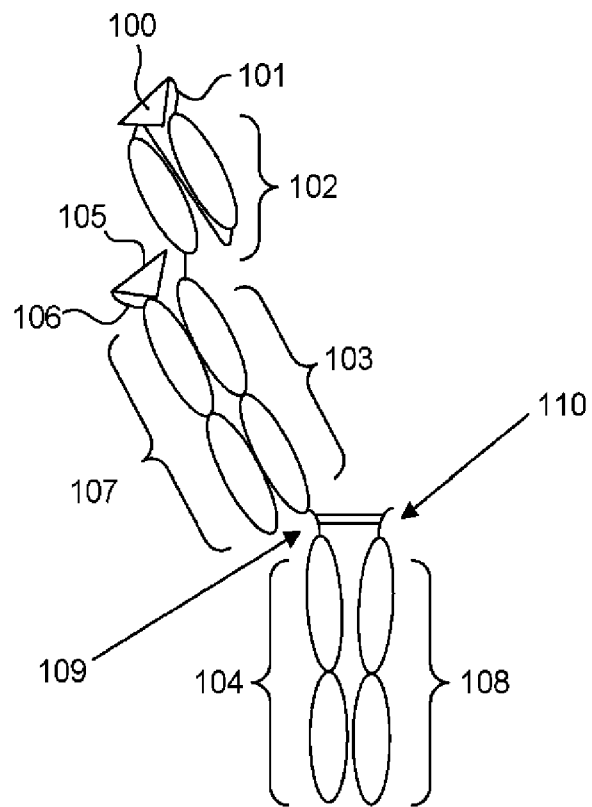
61. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества указанного активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-54 или фармацевтической композиции по п. 55.

62. Способ по п. 61, в котором субъект представляет собой человека.

63. Способ по п. 61 или 62, в котором заболевание представляет собой онкологическое заболевание.

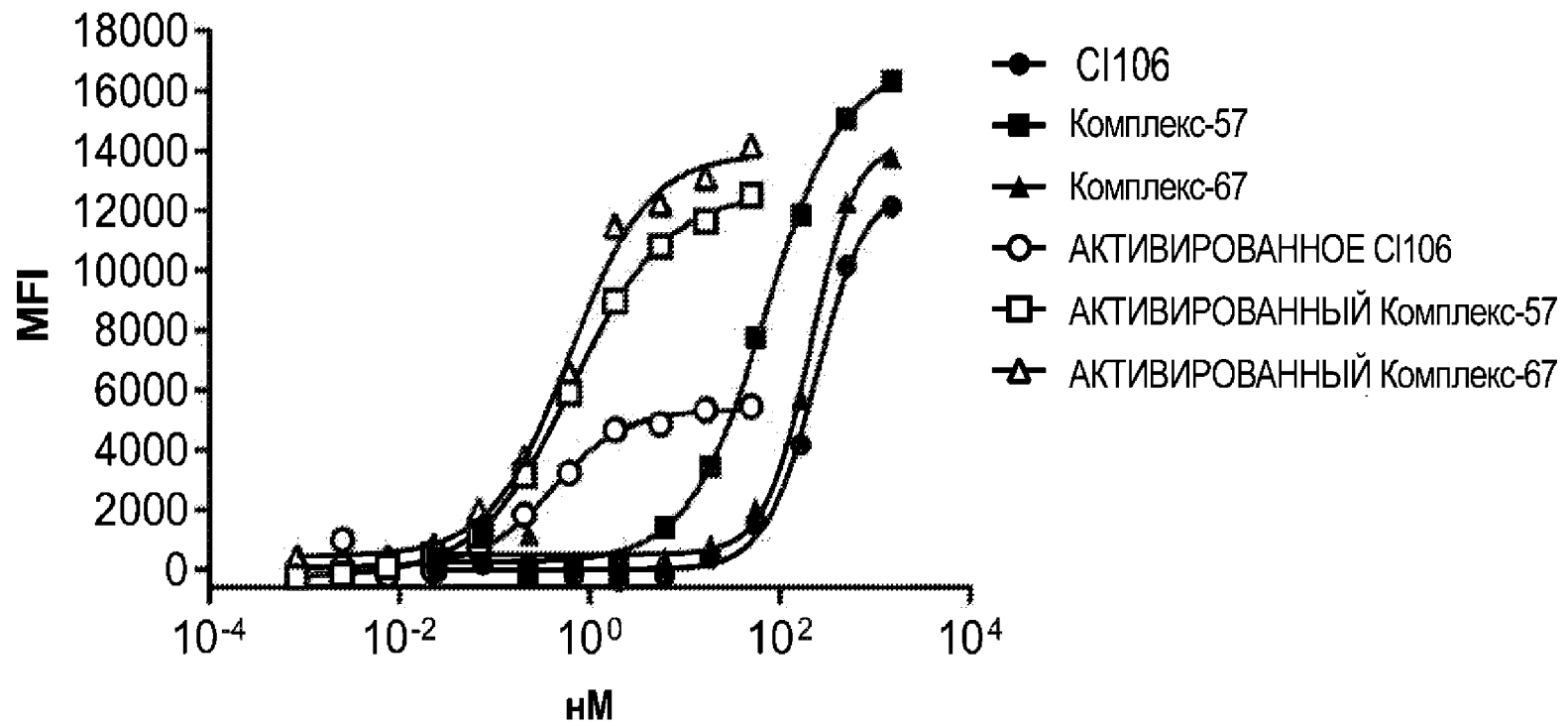
64. Активируемый биспецифический полипептид по любому из пп. 1-54 или фармацевтическая композиция по п. 55 для применения с целью ингибирования роста опухоли у субъекта, нуждающегося в этом.

65. Применение активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-54 или фармацевтической композиции по п. 55 при производстве лекарственного средства для лечения онкологического заболевания.



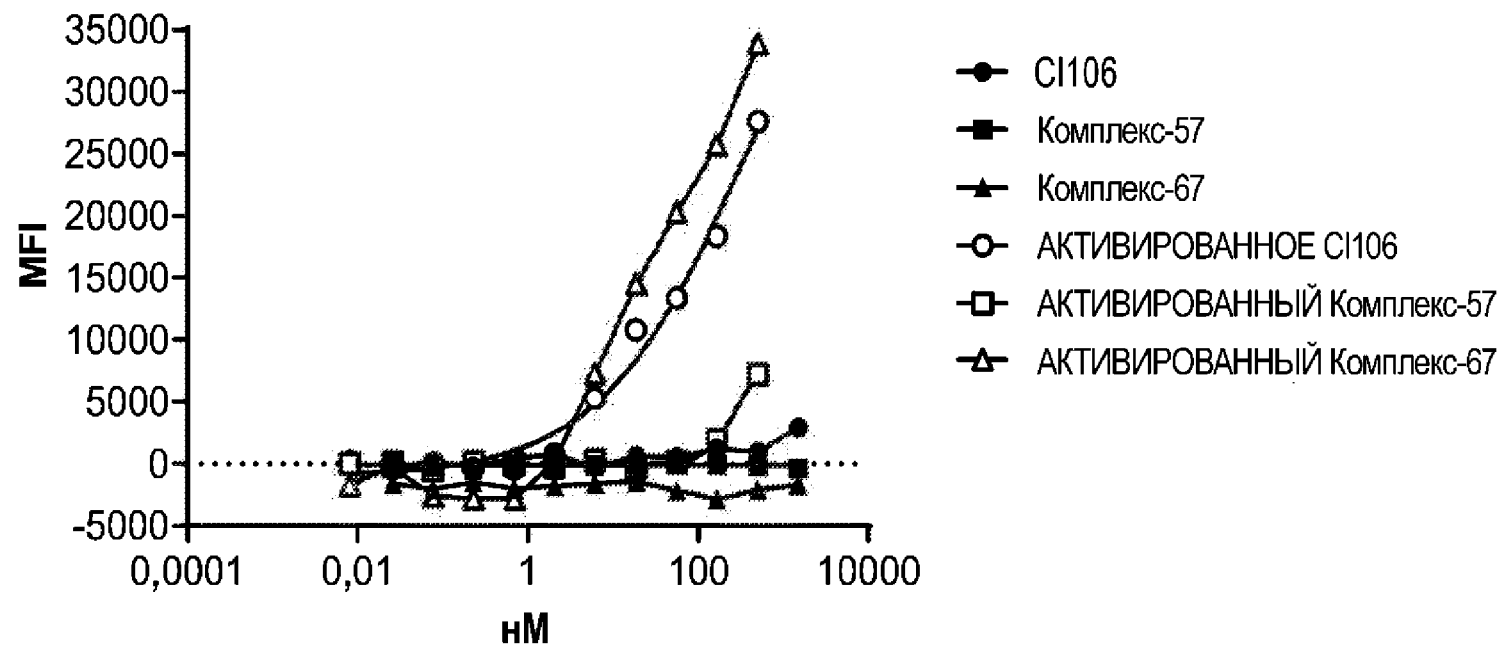
Фиг. 1

Связывание на HT29 (EGFR)



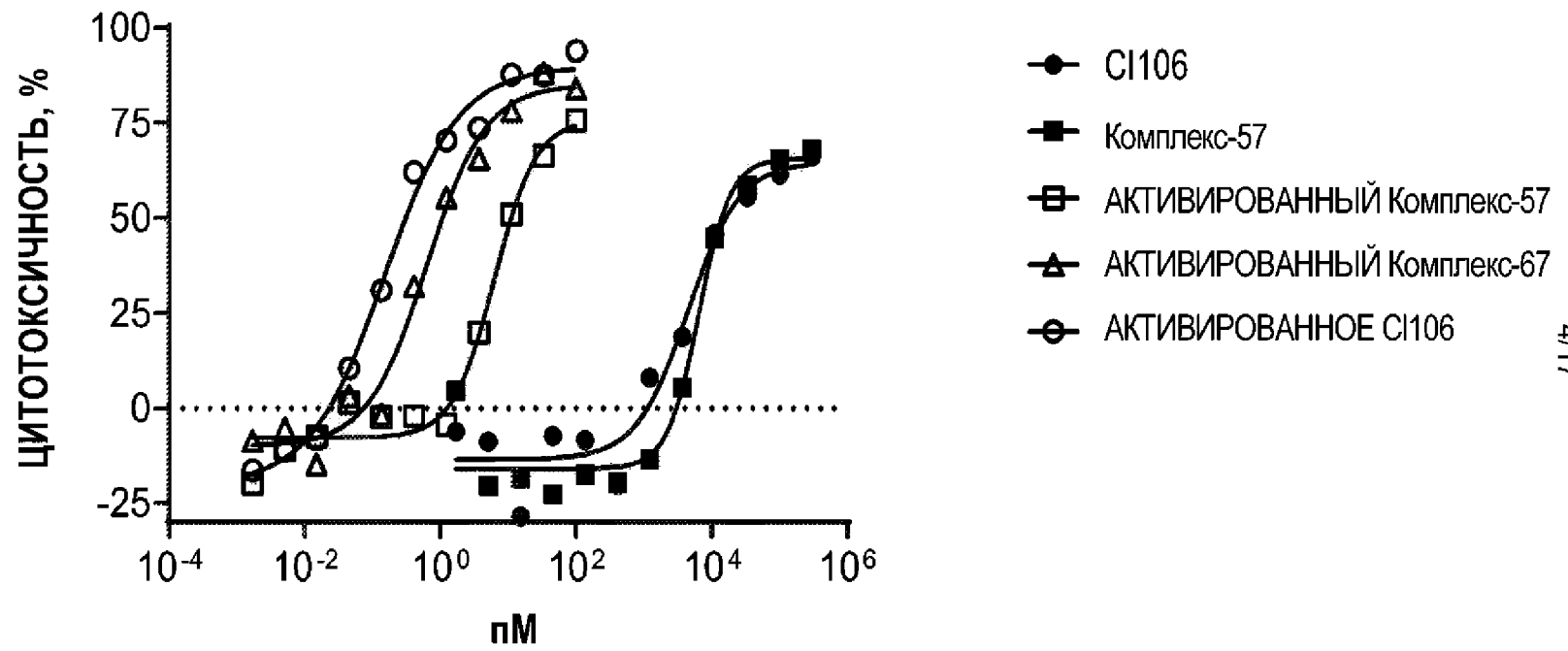
Фиг. 2А

Связывание на Jurkat (CD3)



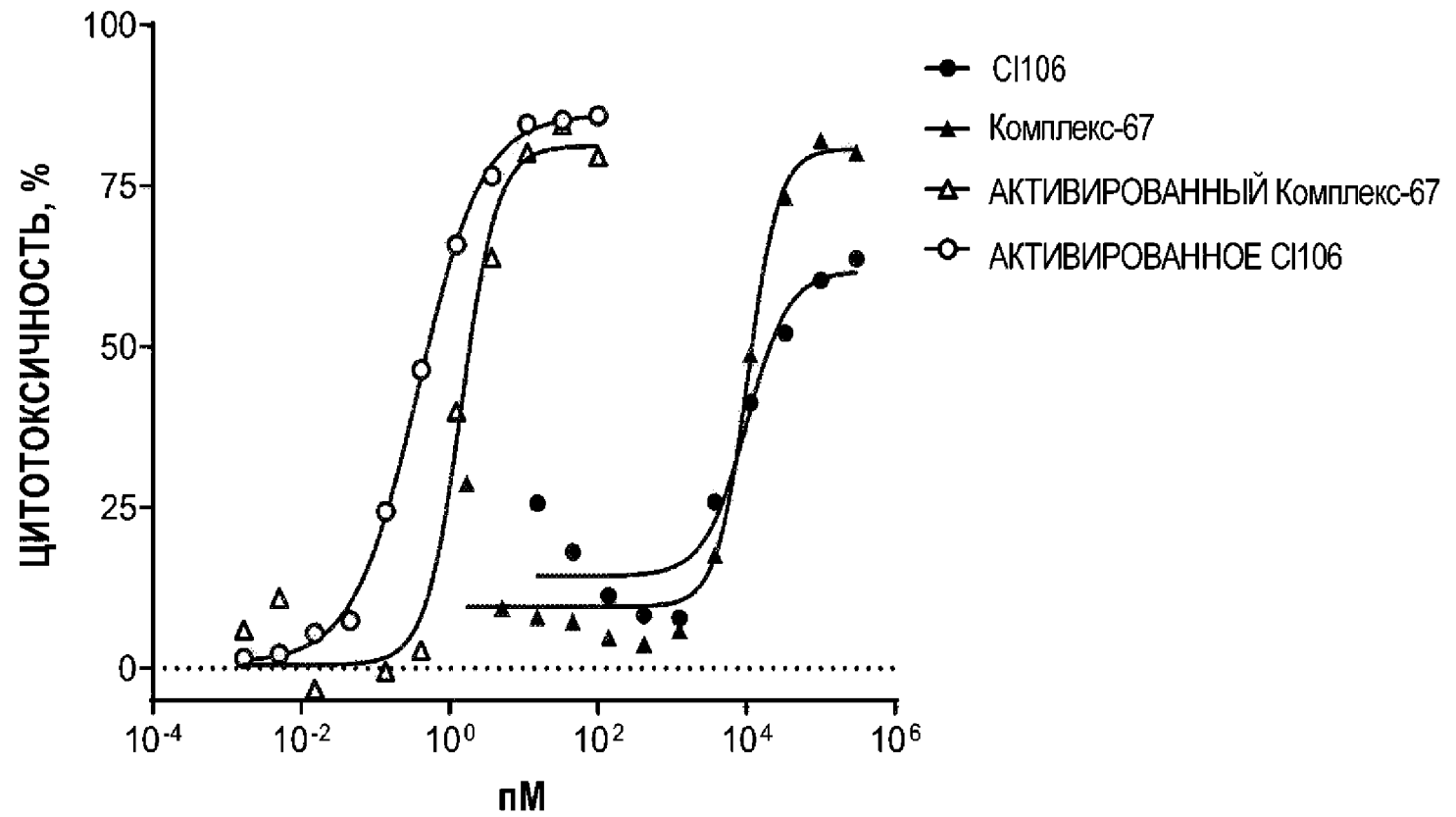
Фиг. 2В

Цитотоксичность к HT29



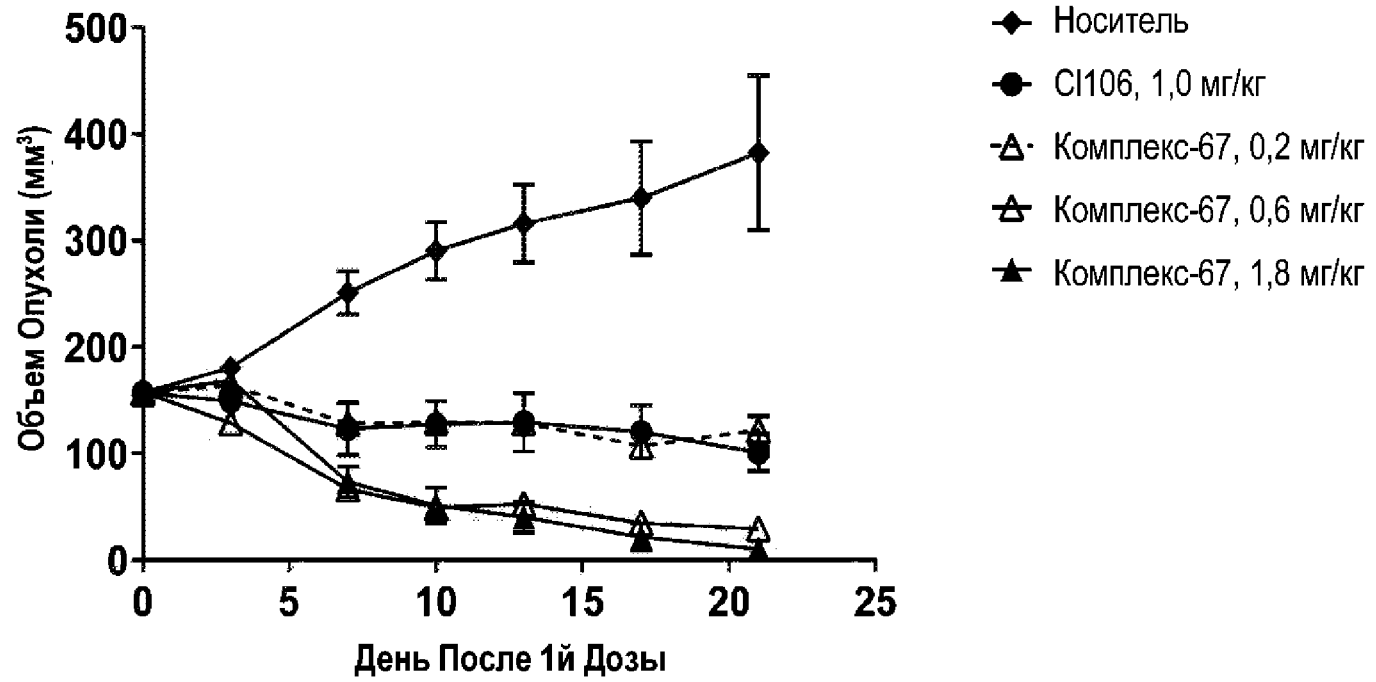
Фиг. 3А

Цитотоксичность к HT29



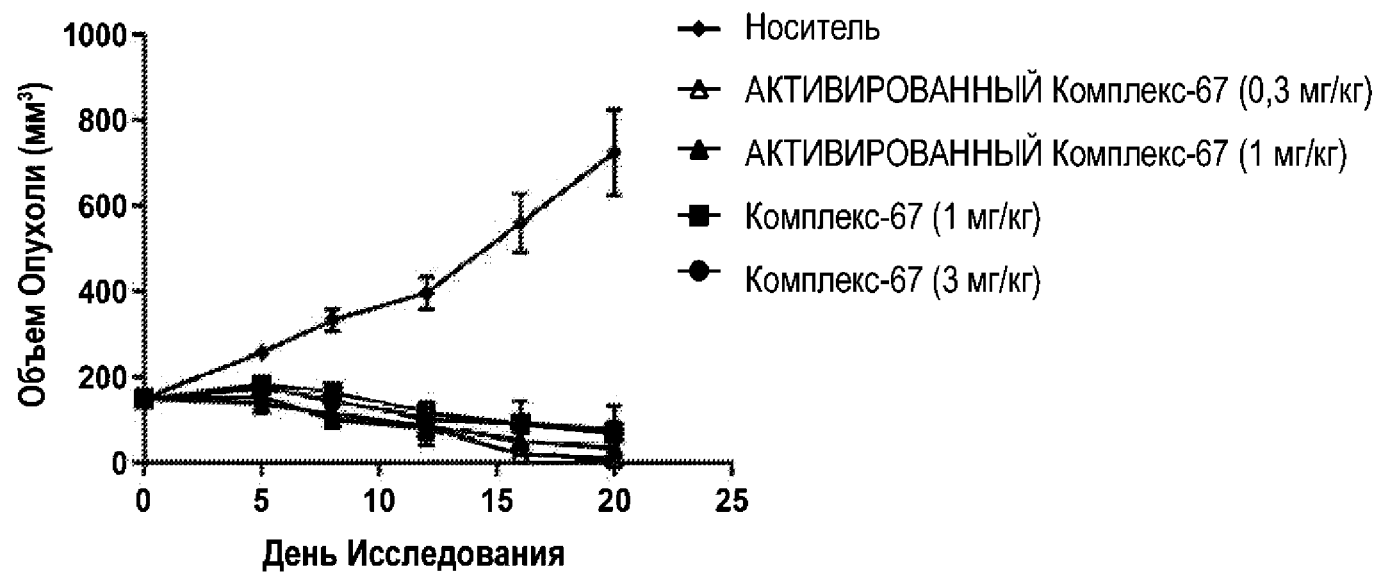
Фиг. 3В

Изменение Опухоли НТ29

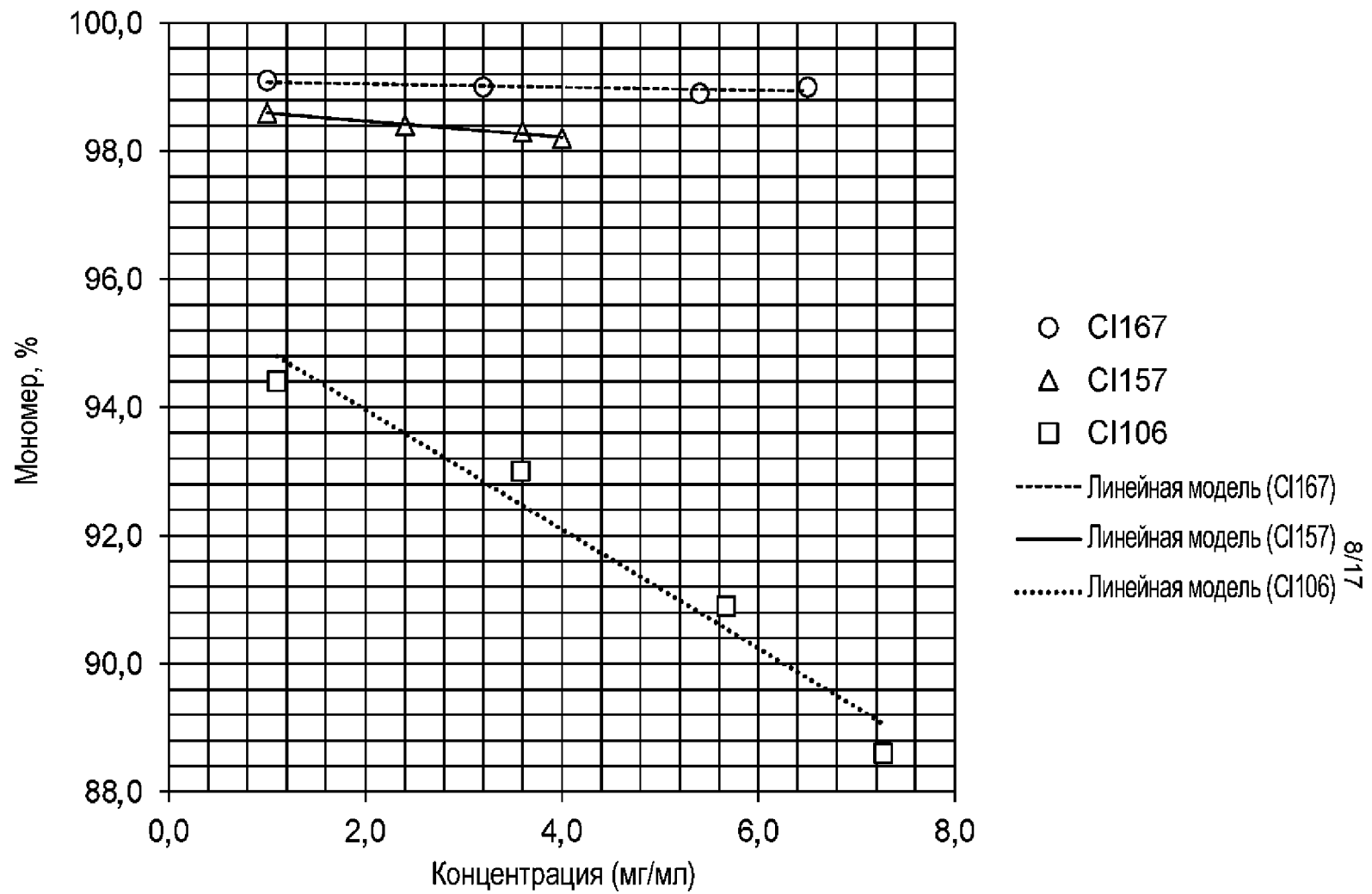


Фиг. 4

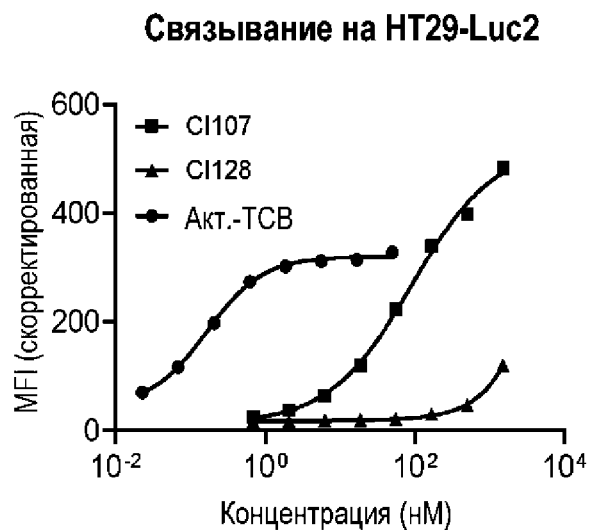
Изменение Опухоли НСТ116



Фиг. 5

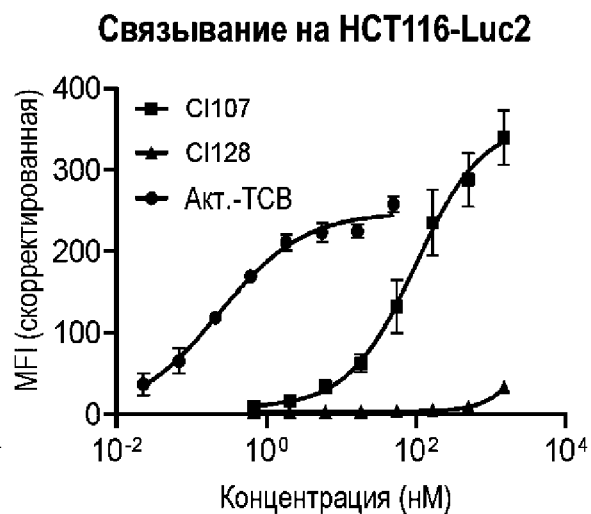


Фиг. 6



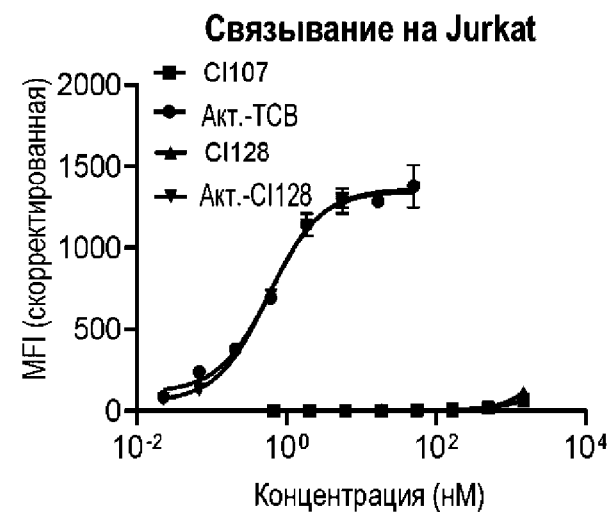
Образец	Kd (нМ)
CI107	91,28
Акт.-ТСВ	0,17
CI128	нет данных

Фиг. 7А



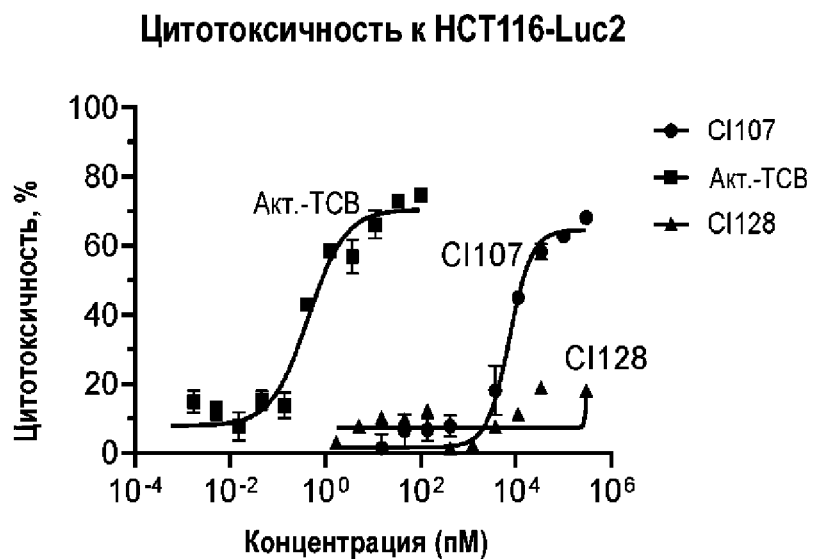
Образец	Kd (нМ)
CI107	98,19
Акт.-ТСВ	0,23
CI128	нет данных

Фиг. 7В



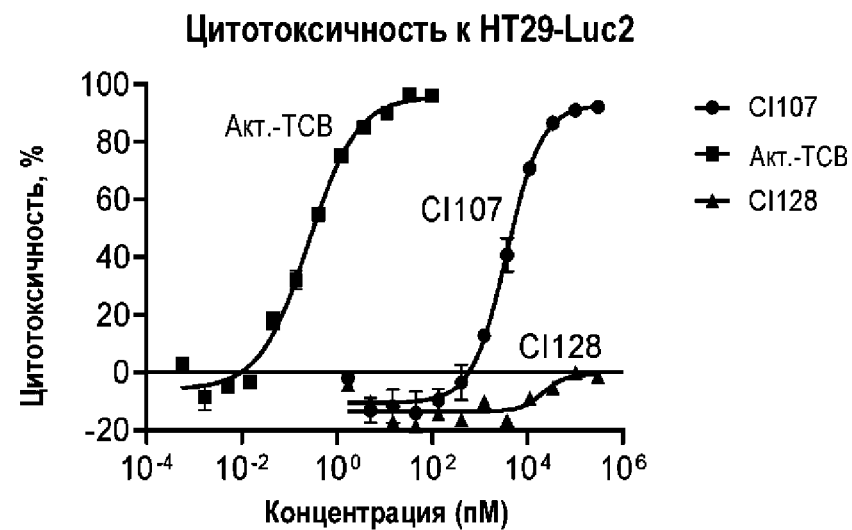
Образец	Kd (нМ)
CI107	нет данных
Акт.-ТСВ	0,62
CI128	нет данных
Акт.-CI128	0,57

Фиг. 7С



Образец	EC50 (нМ)
CI107	7297
Акт.-TCB	0,44

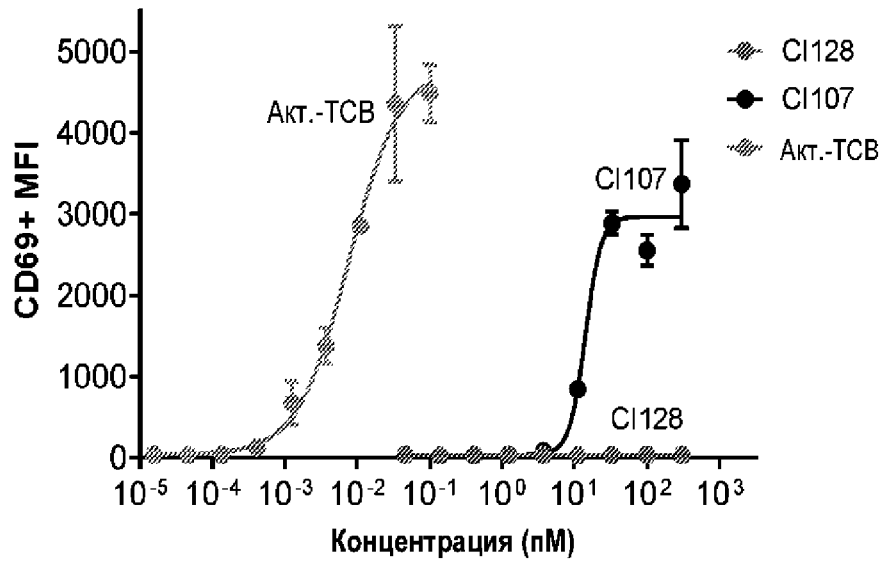
Фиг. 8А



Образец	EC50 (нМ)
CI107	3678
Акт.-TCB	0,23

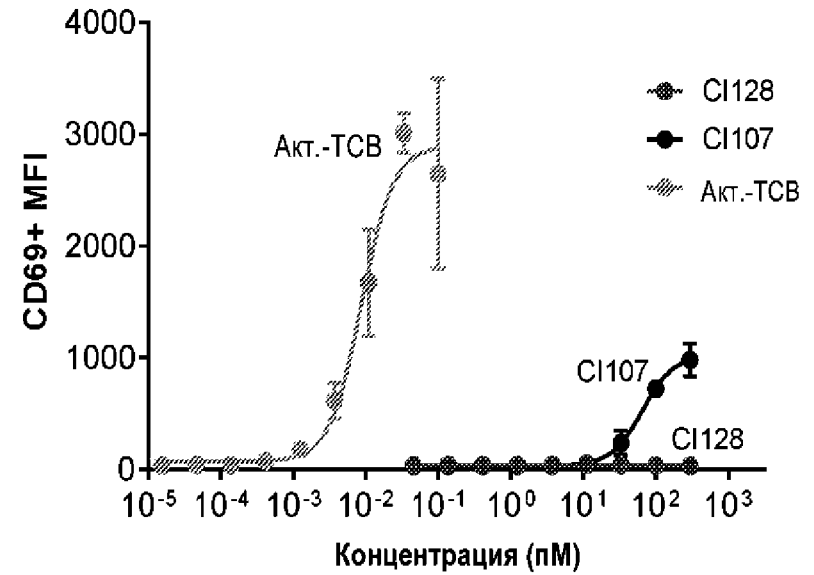
Фиг. 8В

Активация Т-клеток НСТ116-Luc2

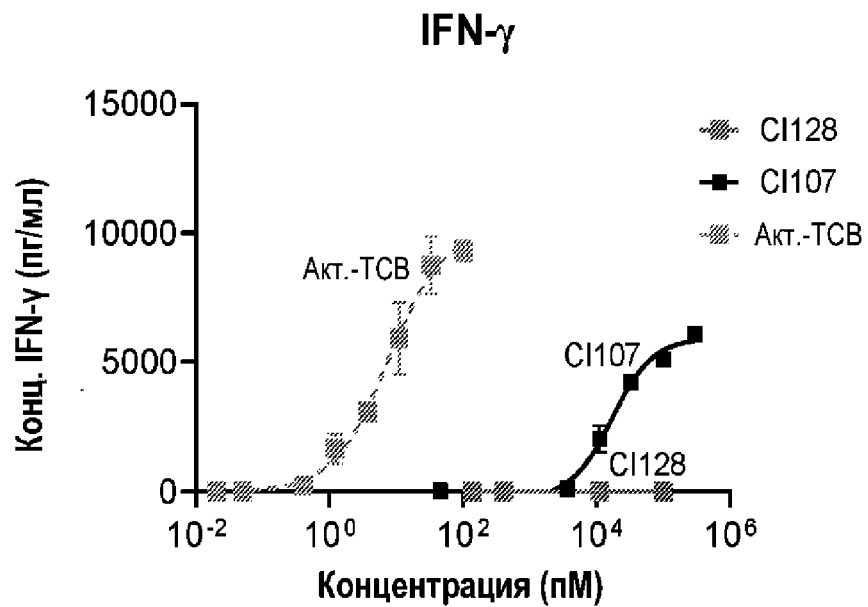


Фиг. 8С

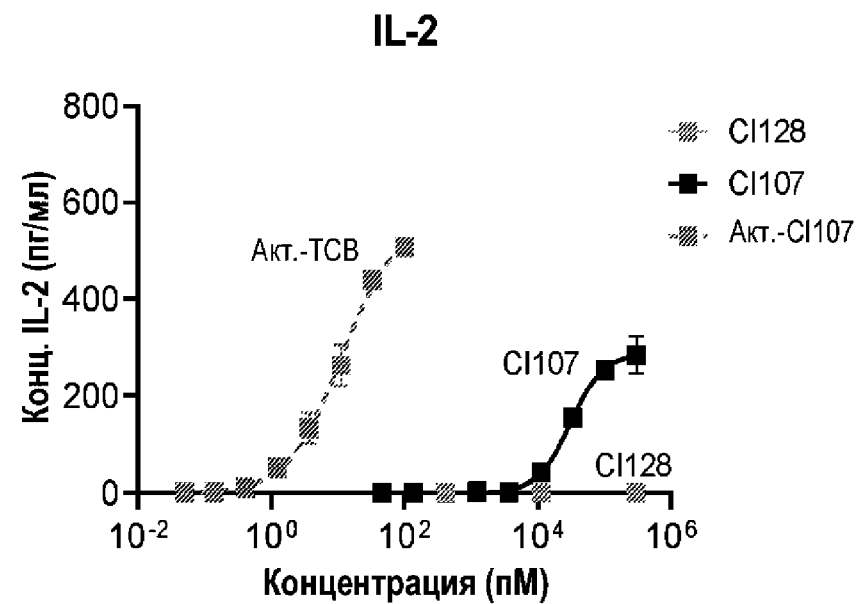
Активация Т-клеток НТ29-Luc2



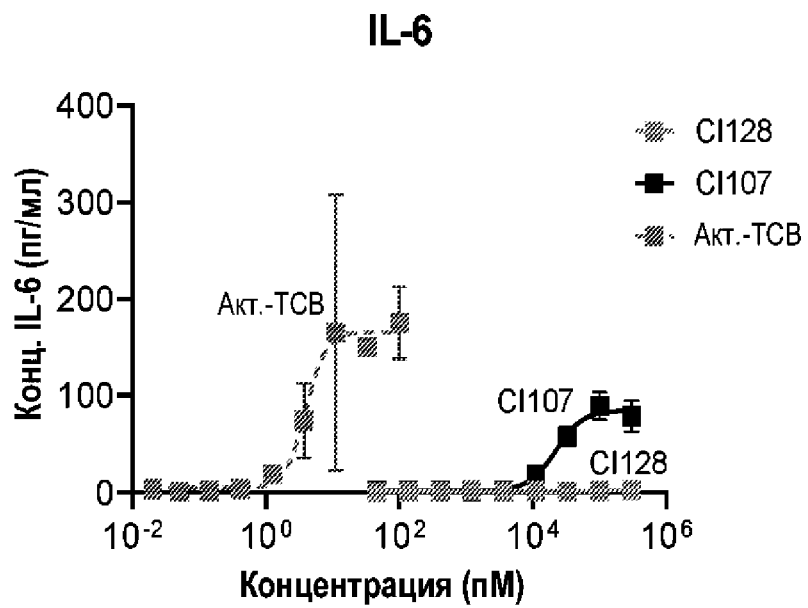
Фиг. 8D



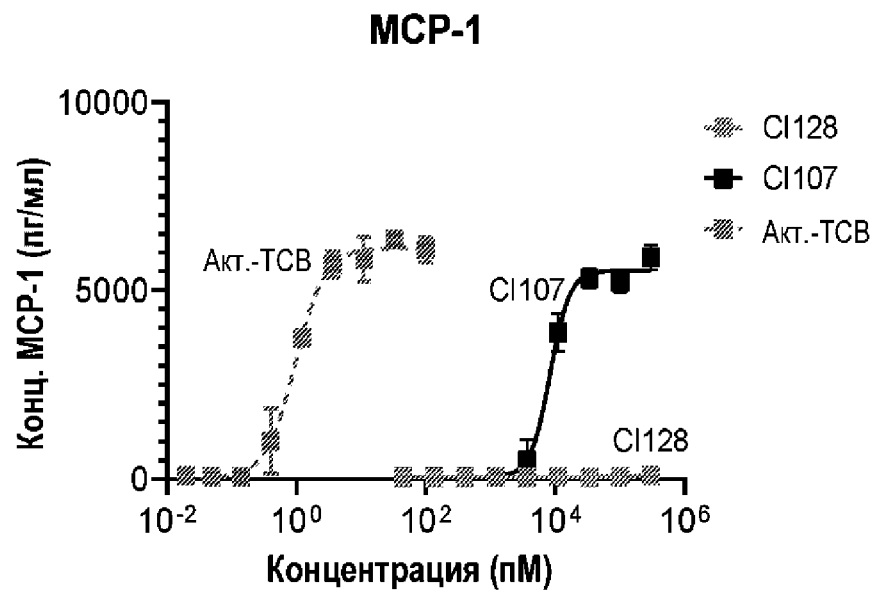
Фиг. 9А



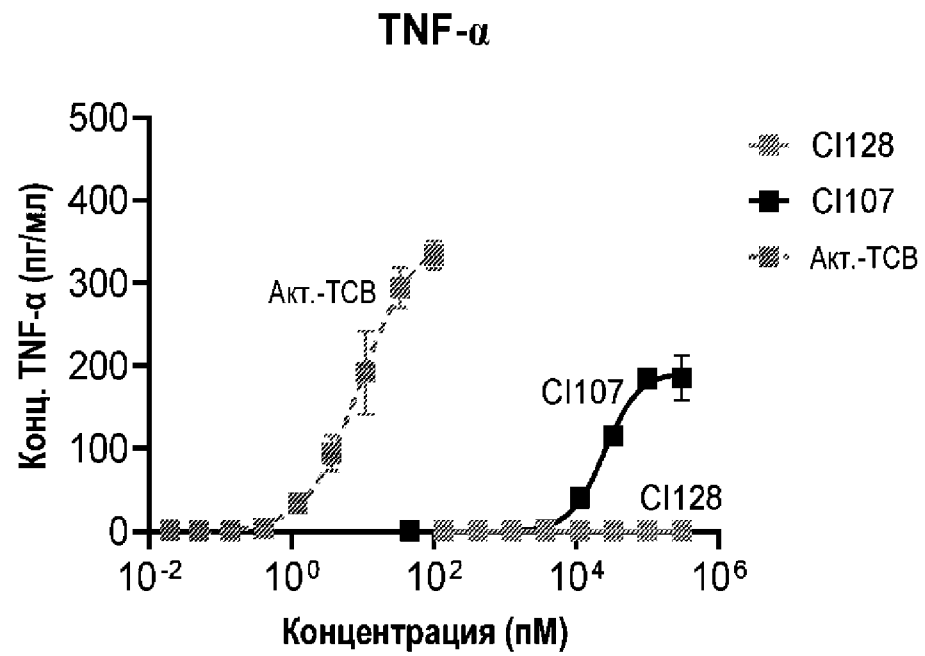
Фиг. 9В



Фиг. 9C



Фиг. 9D

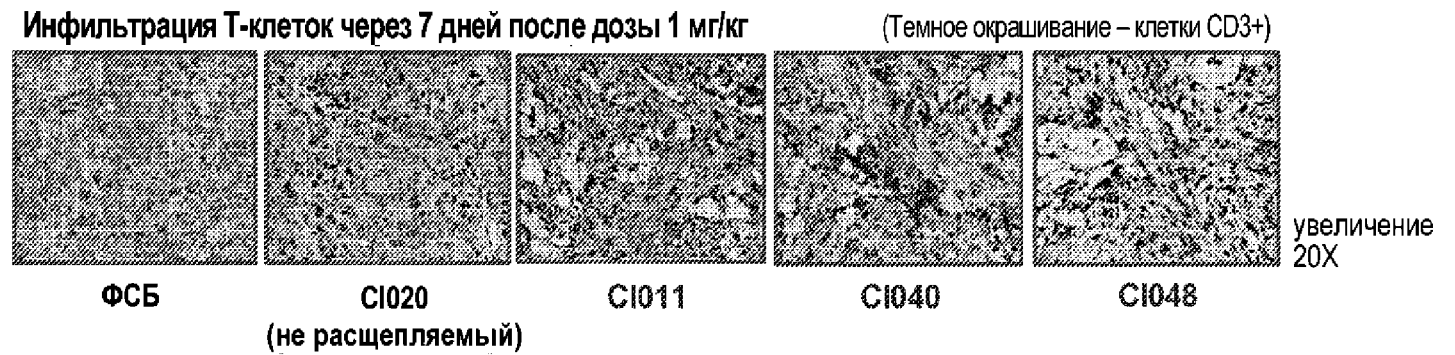


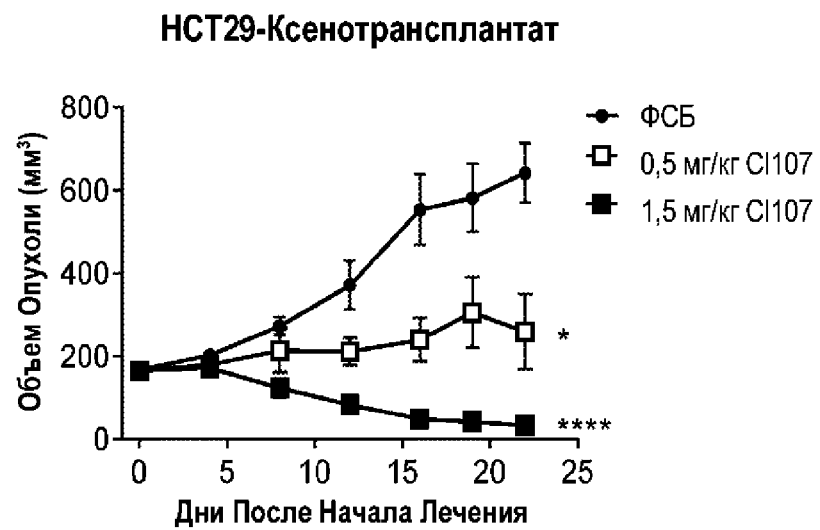
Фиг. 9Е

Фиг. 10А

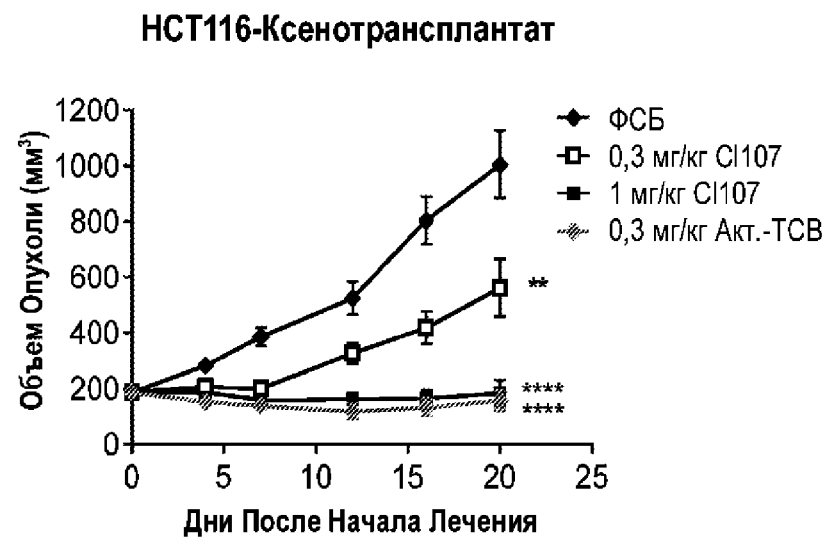


Фиг. 10В

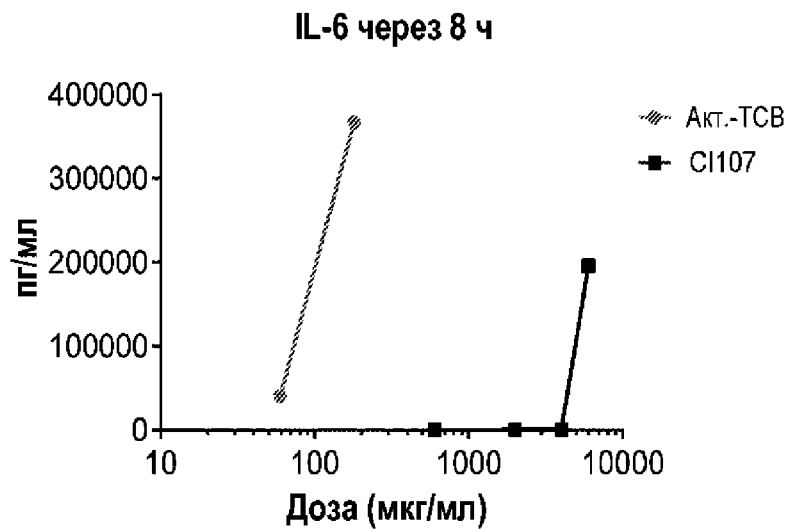




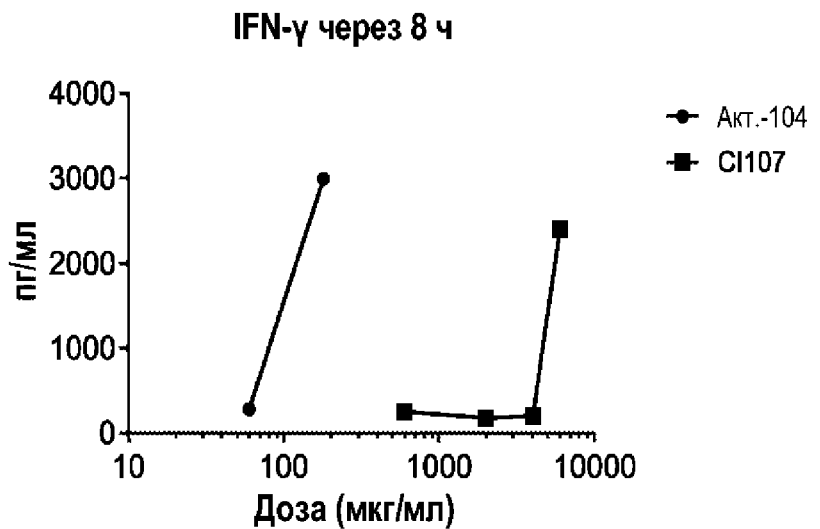
Фиг. 11А



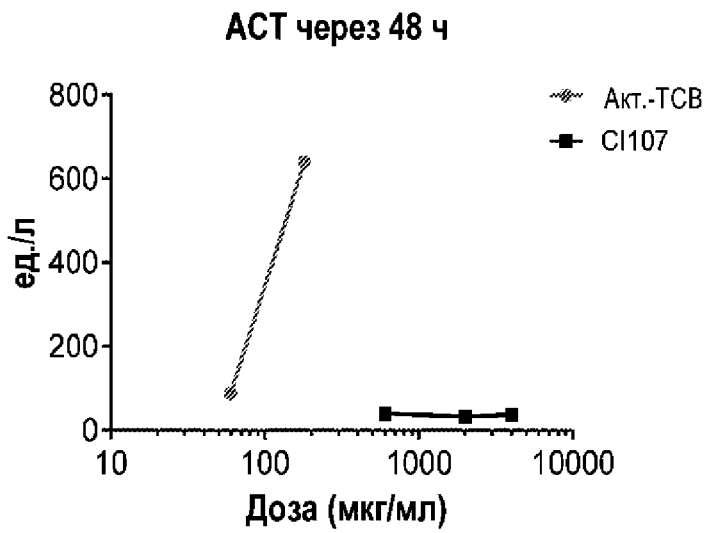
Фиг. 11В



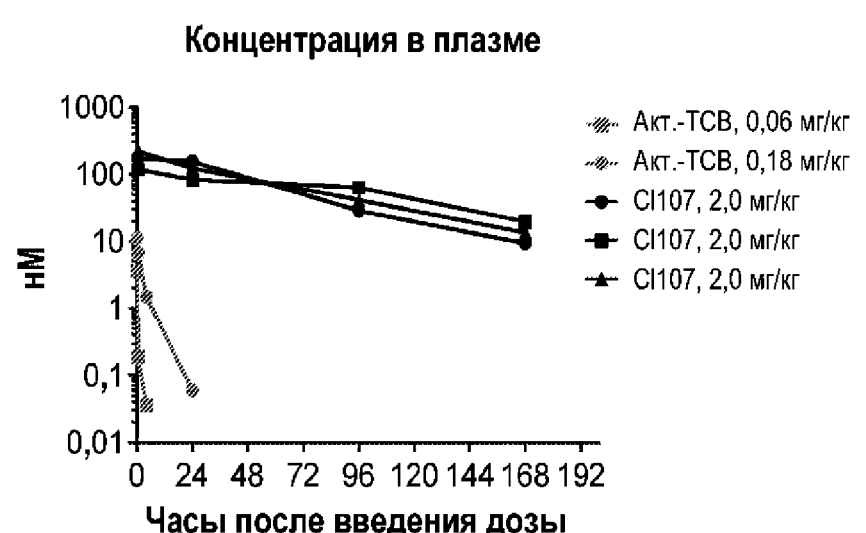
Фиг. 12А



Фиг. 12В



Фиг. 12С



Фиг. 12D