

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490772 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.07.25

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

(22) Дата подачи заявки  
2022.10.14

---

(54) АКТИВИРУЕМЫЙ ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС

---

(31) 63/256,417; 63/370,897

(32) 2021.10.15; 2022.08.09

(33) US

(86) PCT/US2022/078160

(87) WO 2023/064929 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) Настоящее изобретение относится к активируемым гетеромультимерным биспецифическим полипептидным комплексам (НВРС), а также к способам их получения и применения.

---

A1

202490772

202490772

A1

## АКТИВИРУЕМЫЙ ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПЛЕКС

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

**[0001]** Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительных заявок на патенты США №№ 63/256417, поданной 15 октября 2021 г., и 63/370897, поданной 9 августа 2022 г., которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS WEB

**[0002]** Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей (4681\_002PC02\_Seqlisting\_ST26.xml; размер: 190193 байта; и дата создания: 13 октября 2022 г.), поданного в настоящей заявке, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

**[0003]** Настоящее изобретение относится к активируемым гетеромультимерным биспецифическим полипептидным комплексам (НВРС), а также к способам их получения и применения.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0004]** Образование и активация опухолевых антигенспецифических Т-клеток участвуют в иммуноопосредованном контроле развития и опосредовании регрессии опухоли. Для этого необходимы многочисленные Т-клеточные костимулирующие рецепторы и Т-клеточные негативные регуляторы или коингибиторные рецепторы, действующие согласованно для контроля активации Т-клеток, их пролиферации и приобретения или потери эффекторной функции. Однако опухолеспецифические Т-клеточные ответы трудно обеспечивать и поддерживать у онкологических пациентов из-за многочисленных механизмов ускользания опухолевых клеток от иммунитета. Тем не менее, были предприняты попытки использовать Т-клетки для терапии рака. Такие подходы включают использование привлекающих Т-клетки биспецифических антител, которые связывают поверхностный антиген-мишень на раковой клетке, а также связывают поверхностный полипептид Т-клеток, такой как CD3, на Т-клетках. Как правило, связывая каждую мишень, привлекающие Т-клетки биспецифические антитела приводят Т-клетки в непосредственную физическую близость с раковой клеткой и позволяют цитотоксическим белкам и ферментам Т-клеток атаковать опухолевые клетки и вызывать апоптоз, тем самым убивая раковые клетки.

**[0005]** Несмотря на потенциально перспективный класс терапевтических средств для лечения рака, существуют препятствия, которые необходимо преодолеть, такие как внецелевые токсичности вне опухоли, а также производственные проблемы. Соответственно, существует потребность в иммунотерапевтических вариантах с

улучшенными профилями безопасности, а также улучшенной технологичностью.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0006]** В данном документе представлен активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий (а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) и первый вариабельный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает первую мишень, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1), (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1); (iv) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1); (б) второй полипептид, который содержит (i) второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывает вторую мишень, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2) и (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2); и (с) третий полипептид, который (i) содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и (ii) не содержит вариабельный домен иммуноглобулина. В некоторых аспектах первая мишень представляет собой Т-клеточный антигенный полипептид, и вторая мишень представляет собой поверхностный антиген раковой клетки. В некоторых аспектах первая мишень представляет собой поверхностный антиген раковой клетки, и вторая мишень представляет собой Т-клеточный антигенный полипептид. В некоторых аспектах Т-клеточный антигенный полипептид представляет собой эpsilon-цепь CD3.

**[0007]** В некоторых аспектах первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи между нацеливающимся на антиген доменом VH2 и мономерным Fc-доменом.

**[0008]** В некоторых аспектах первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR1) иммуноглобулина между доменом CH1 и первым мономерным Fc-доменом.

**[0009]** В некоторых аспектах первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-HR1-Fc1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

**[0010]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, второй полипептид дополнительно содержит константный домен CL1 легкой цепи. В некоторых аспектах второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM2-CM2-VL2-CL1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

**[0011]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, третий полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR2) иммуноглобулина.

В некоторых аспектах третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу HR2-Fc2, при этом знак «-» представляет собой прямую или непрямую связь.

**[0012]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, первый полипептид HR1 и второй полипептид HR2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах первый полипептид HR1 и второй полипептид HR2 содержат разные аминокислотные последовательности.

**[0013]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, первый, второй и/или третий полипептиды содержат один или несколько линкеров.

**[0014]** В некоторых аспектах активируемый НВРС содержит линкер в одном или нескольких из следующих местоположений: (a) между MM1 и CM1; (b) между MM2 и CM2; (b) между переменными доменами тяжелой и легкой цепей scFv; (c) между переменным доменом тяжелой цепи и доменом CH1; (d) между доменом CH1 и шарнирной областью; (e) между шарнирной областью и Fc-доменом; (g) между CM2 и переменным доменом легкой цепи; (h) между переменным доменом легкой цепи и CL; (i) между доменом CH1 и вторым Fc-доменом; (j) между доменом CH1 и шарнирной областью и/или (k) между шарнирной областью и вторым Fc-доменом. В некоторых аспектах линкер(ы) содержит(содержат) от около 1 и около 20 аминокислот.

**[0015]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, MM1 связан с CM1 через линкер L1. В некоторых аспектах MM2 связан с CM2 через линкер L2. В некоторых аспектах активируемый биспецифический полипептидный комплекс содержит и L1, и L2. В некоторых аспектах MM2 связан с CM2 через линкер L3, а CM2 связан с scFv через линкер L4. В некоторых аспектах

**[0016]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, аминокислотные последовательности L1, L2, L3 и/или L4 являются одинаковыми. В некоторых аспектах аминокислотная последовательность по меньшей мере одного из L1, L2, L3 и/или L4 отличается.

**[0017]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, аминокислотная последовательность CM1 и аминокислотная последовательность CM2 являются одинаковыми. В некоторых аспектах аминокислотная последовательность CM1 и аминокислотная последовательность CM2 являются разными.

**[0018]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, каждый из CM1 и CM2 содержит субстрат для протеазы, которая присутствует в микроокружении опухоли. В некоторых аспектах каждый CM1 и CM2 независимо содержит субстрат для одной и той же протеазы. В некоторых аспектах CM1 и CM2



содержат субстраты для разных протеаз. В некоторых аспектах каждый CM1 и CM2 независимо содержит субстрат для протеазы, выбранной из группы протеаз, показанной в таблице 3. В некоторых аспектах по меньшей мере один из CM1 и CM2 содержит субстрат для протеазы, выбранной из группы, состоящей из серинпротеазы и матриксной металлопептидазы (ММР). В некоторых аспектах CM1 и/или CM2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:73-111 или SEQ ID NO: 156-159.

**[0019]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, MM1 и/или MM2 содержит от около 5 аминокислот до около 40 аминокислот.

**[0020]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из (i) линкера на основе глицина и серина, выбранного из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGS)<sub>n</sub>, при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40), при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:126), при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, (GSSGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:41), при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 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), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (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), GSSGGSGGGSGG (SEQ ID NO:57), GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:58), GGGSSGGS (SEQ ID NO:127) и GS; и (ii) линкера, содержащего глицин, серин и по меньшей мере один из лизина, треонина или пролина, такого как, например, линкер, выбранный 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), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO:64), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEQ ID NO:65) и GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO:66).

**[0021]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, первый полипептид содержит шарнир (HR) (шарнир 1), имеющий аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO:34. В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, второй полипептид содержит шарнир (HR) (шарнир 2), имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35.

**[0022]** Также в данном документе представлены композиции, содержащие активируемый НВРС, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах композиция содержит воду и активируемый НВРС. В некоторых аспектах композиция содержит 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или до 99% воды.

**[0023]** Также в данном документе представлены наборы, содержащие фармацевтическую композицию, описанную в данном документе.

**[0024]** Также в данном документе представлены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют первый полипептид, второй полипептид и/или третий полипептид активируемого НВРС, описанного в данном документе. В некоторых аспектах представлены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют первый полипептид активируемого НВРС. В некоторых аспектах представлены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют второй полипептид активируемого НВРС. В некоторых аспектах представлены нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидные последовательности, которые кодируют третий полипептид активируемого НВРС. Также в данном документе представлены векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе. Также в данном документе представлены клетки-хозяева, содержащие векторы, описанные в данном документе.

**[0025]** Также в данном документе представлены способы получения активируемого биспецифического полипептидного комплекса, включающие (а) культивирование клетки-хозяина в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования активируемого НВРС; и (b) извлечение активируемого НВРС.

**[0026]** Также в данном документе представлены способы лечения заболевания у субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса (НВРС) или его фармацевтической композиции субъекту. В некоторых аспектах субъектом является человек. В некоторых аспектах заболевание представляет собой рак

**[0027]** Также в данном документе представлены активируемые гетеромультимерные биспецифические полипептидные комплексы (НВРС) и их фармацевтические композиции для применения в ингибировании роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

**[0028]** Также в данном документе представлены активируемые гетеромультимерные

биспецифические полипептидные комплексы (НВРС) и их фармацевтические композиции для применения в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

**[0029]** Также в данном документе представлен активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий (а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), при этом scFv содержит первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют нацеливающийся на Т-клеточный антиген домен, который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1) и (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1); (iii) переменный домен тяжелой цепи (VH2), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, в паре с переменным доменом легкой цепи (VL2), (iv) первый мономерный Fc-домен (Fc1), (v) домен CH1 тяжелой цепи и (vi) шарнирную область иммуноглобулина между доменом CH1 и Fc1; (б) второй полипептид, содержащий (i) переменный домен легкой цепи (VL2), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, в паре с VH2, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2) и (iv) константный домен CL1 легкой цепи; и (с) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и шарнирную область (HR2) иммуноглобулина, при этом третий полипептид не содержит переменный домен иммуноглобулина, и при этом первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1, второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM2-CM2-VL2-CL1, и третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

**[0030]** Также в данном документе представлен активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий (а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1), (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1) и (iv) переменный домен тяжелой цепи (VH2), который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид, в паре со вторым переменным доменом легкой цепи (VL2) полипептида, (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1), (vi) домен CH1 тяжелой цепи и (vii) шарнирную область (HR1) иммуноглобулина между доменом CH1 и первым мономерным Fc-доменом; (б) второй полипептид, содержащий (i) переменный домен легкой цепи (VL2), который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид, в паре с первым VH2

полипептида, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2); (iv) константный домен CL1 легкой цепи; и (с) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и шарнирную область (HR2) иммуноглобулина; при этом первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1; второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM2-CM2-VL2-CL1; и третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» представляет собой прямую или непрямую связь, и при этом третий полипептид не содержит переменный домен иммуноглобулина.

**[0031]** Также в данном документе представлен активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий (а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1); (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1) и переменный домен тяжелой цепи (VH2), (iii) первый мономерный Fc-домен (Fc1), домен CH1 тяжелой цепи и шарнирную область иммуноглобулина между доменом CH1 и первым мономерным Fc-доменом; (b) второй полипептид, содержащий (i) переменный домен легкой цепи (VL2), который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид, в паре с первым VH2 полипептида, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2) и константный домен CL1 легкой цепи; и (с) третий полипептид, содержащий второй мономерный Fc-домен (Fc2) и шарнирную область иммуноглобулина; при этом первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1; второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM2-CM2-VL2-CL1; и третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь, и при этом третий полипептид не содержит переменный домен иммуноглобулина.

**[0032]** Также в данном документе представлен гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий (а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает первую мишень, (ii) второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и (iii) первый

мономерный Fc-домен (Fc1); (b) второй полипептид, который содержит второй переменный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливаемый домен, который специфически связывает вторую мишень; и (c) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и не содержит переменный домен иммуноглобулина.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0033]** На фиг. 1 представлена схема активируемого НВРС, описанного в данном документе.

**[0034]** На фиг. 2А показано связывание EGFR с помощью С1106 (контроля в виде активируемого двухплечевого двухвалентного биспецифического антитела к CD3 и к EGFR), комплекса-57 (активируемого НВРС) и комплекса-67 (активируемого НВРС), а также активированного С1106, активированного комплекса-57 и активированного комплекса-67.

**[0035]** На фиг. 2В показано связывание CD3 с помощью С1106 (контроля), комплекса-57 (активируемого НВРС), комплекса-67 (активируемого НВРС) и активированного С1106, активированного комплекса-57 и активированного комплекса-67.

**[0036]** На фиг. 3А показана цитотоксичность в отношении клеток HT29 после обработки активированным С1106 (контролем), комплексом-57, комплексом-67, С1106 (двухплечевой двухвалентной биспецифической контрольной конструкцией) и комплексом-57.

**[0037]** На фиг. 3В показана цитотоксичность в отношении клеток HT29 после обработки С1106 (контролем), комплексом-67, активированным С1106 (контролем) и активированным комплексом-67.

**[0038]** На фиг. 4 показан объем опухоли на модели ксенотрансплантатов опухоли HT29-luc2 как функции времени после обработки средой-носителем, 1,0 мг/кг С1106 (контроль) и 0,2, 0,6 и 1,8 мг/кг комплекса-67.

**[0039]** На фиг. 5 показан объем опухоли на модели ксенотрансплантатов опухоли НСТ116 как функции времени после обработки средой-носителем, 0,3 мг/кг и 1 мг/кг активированного комплекса-67 и комплекса-67.

**[0040]** На фиг. 6 показано процентное отношение (%) мономера в зависимости от концентрации для С1106 (контроля), комплекса-57 и комплекса-67.

**[0041]** На фиг. 7 показана цитотоксичность как процентное отношение лизиса клеток по действием маскированного активируемого НВРС (комплекса-339), контроля немаскированного активируемого НВРС (комплекса-342), активируемого полипептида в альтернативном формате 2 (комплекса-231) и немаскированного контрольного полипептида в альтернативном формате 2 (комплекса-164).

**[0042]** На фиг. 8А-8С показано оценивание проточной цитометрией связывания СИ107 с EGFR и CD3, экспрессированными на поверхности клеток HT29 (А), клеток НСТ116 (В) или клеток Jurkat (С). Кажущуюся Kd рассчитывали по результатам выполненных в двух повторностях экспериментов на клетках HT29 и выполненных в трех повторностях экспериментов на клетках Jurkat.

**[0043]** На фиг. 9А-9D показан процент цитотоксичности, опосредованной СИ107, в клетках НСТ116-Luc2 (А, С) и клетках HT29-Luc2 (В, D). Через 48 часов культивирования жизнеспособность и цитотоксичность клеток НСТ116-Luc2 или HT29-Luc2 измеряли относительно необработанных контролей (А, В). Через 16 часов культивирования измеряли экспрессию CD69 путем проточной цитометрии. MFI - средняя интенсивность флуоресценции (С, D).

**[0044]** На фиг. 10А-10Е показано высвобождение цитокинов после обработки с помощью СИ107, измеренное после 16 часов культивирования. (А) IFN- $\gamma$ , (В) IL-2, (С) IL-6, (D) MCP-1 и (Е) TNF- $\alpha$ .

**[0045]** На фиг. 11А-11В показаны объемы опухоли после обработки тестируемыми ТСВ у мышей, несущих опухоли HT29-Luc2 и приживленные РВМС человека. (А) Мышей обрабатывали один раз в неделю в течение 3 недель средой-носителем (PBS) или 0,3 мг/кг СИ020, СИ011, СИ040 или СИ048 (n = 8 на группу). Объем опухоли измеряли дважды в неделю. (В) Мышей NSG, несущих опухоли HT29-Luc2 и приживленные РВМС человека, обрабатывали средой-носителем или 1 мг/кг СИ020, СИ011, СИ040 или СИ048. Опухоли собирали через 7 дней после введения дозы и проводили иммуногистохимию на CD3. Темное окрашивание указывает на CD3+ клетки.

**[0046]** На фиг. 12А-12В показаны объемы опухоли после обработки с помощью СИ107 один раз в неделю в течение 3 недель в ксенотрансплантатах опухолей HT29 (А) и НСТ116 (В). Объем опухоли измеряли дважды в неделю. \* p < 0,5; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,0001.

**[0047]** На фиг. 13А-13В показаны уровни IL-6 (А) и IFN- $\gamma$  (В), измеренные через 8 часов после введения дозы СИ107.

**[0048]** На фиг. 13С показаны уровни аспартатаминотрансферазы (AST), измеренные с помощью химического анализа сыворотки крови через 48 часов после введения дозы СИ107 (С).

**[0049]** На фиг. 13D показаны концентрации акт-СИ107 и СИ107 в плазме крови, измеренные с помощью ELISA с использованием антиидиотипического захвата и выявления антител к Fc человека. Линии СИ107 представляют данные 3 отдельных животных, которым вводили дозу 2,0 мг/кг СИ107; линии акт-ТСВ представляют отдельных животных, которым вводили дозу 0,06 мг/кг или 0,18 мг/кг акт-ТСВ.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] Для того, чтобы данное изобретение было более понятным, сначала представлены определения некоторых терминов. Каждый из следующих терминов, используемых в настоящей заявке, если иное прямо не предусмотрено в данном документе, имеет значение, изложенное ниже. Дополнительные определения приведены в тексте заявки.

### Определения

[0051] В контексте данного документа термин «активируемый полипептидный комплекс» относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере один вариабельный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один вариабельный домен легкой цепи, которые вместе образуют антигенсвязывающую область, маскирующий фрагмент (ММ) и расщепляемый фрагмент (СМ), при этом ММ присоединен к антигенсвязывающей области (прямо или опосредованно) через СМ, который является расщепляемым протеазой.

[0052] Термин «активируемый», используемый вместе с термином «гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс» или «НВРС», относится в данном документе к НВРС, связывающая активность которого снижается из-за присутствия одного или нескольких маскирующих фрагментов, добавленных к структуре НВРС. Термины «активированный» и «активировать» могут быть использованы для обозначения активированного НВРС. Термины «активированный» и «немаскированный» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[0053] В контексте данного документа термин «полипептид» является общим термином для обозначения полимера аминокислотных остатков.

[0054] В контексте данного документа термин «Т-клетка» определяется как лимфоцит, происходящий из тимуса, который участвует в различных клеточно-опосредованных иммунных реакциях. В контексте данного документа термин «регуляторная Т-клетка» относится к  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Т-клетке с супрессивными свойствами. «Трег» представляет собой аббревиатуру, используемую в данном документе для обозначения регуляторной Т-клетки.

[0055] В контексте данного документа термин «хелперная Т-клетка» относится к  $CD4^+$  Т-клетке. Хелперные Т-клетки распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса II. Существует по меньшей мере два типа хелперных Т-клеток  $Th_1$  и  $Th_2$ , которые продуцируют различные цитокины. При активации хелперные Т-клетки становятся  $CD25^+$ , но только транзистентно становятся  $FoxP3^+$ .

[0056] В контексте данного документа термин «цитотоксическая Т-клетка» относится к  $CD8^+$  Т-клетке. Цитотоксические Т-клетки распознают антиген, связанный с молекулами МНС класса I.

**[0057]** Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антигенсвязывающего белка (например, антитела), который участвует в связывании антигенсвязывающего белка (например, антитела) с антигеном. Вариабельные области или домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL, соответственно) антигенсвязывающего белка, такого как антитело, можно дополнительно разделить на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образованными из структурно определенных петель), такие как гипервариабельные области (HVR) или определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся областями, являющимися более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). В общем случае существует по три HVR (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3) или CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) в каждой вариабельной области тяжелой цепи и по три HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3) или CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) в каждой вариабельной области легкой цепи. «Каркасные области» или «FR» известны в уровне техники и относятся к отличным от HVR или CDR частям вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. В общем случае существует четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). В каждой VH и VL три HVR или CDR и четыре FR, как правило, упорядочены 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 (также см. 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, можно выделять 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).

**[0058]** 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.

**[0059]** В контексте данного документа термин «константная область тяжелой цепи» относится к области, содержащей по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Неограничивающие примеры константных областей тяжелой цепи



включают  $\gamma$ ,  $\delta$  и  $\alpha$ . Неограничивающие примеры константных областей тяжелой цепи также включают  $\epsilon$  и  $\mu$ .

**[0060]** 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.

**[0061]** В контексте данного документа термин «константная область легкой цепи» относится к области, содержащей константный домен легкой цепи  $C_L$ . Неограничивающие примеры константных областей легкой цепи также включают  $\lambda$  и  $\kappa$ .

**[0062]** 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. 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.

**[0063]** Термин «антитело» относится к молекуле иммуноглобулина или иммунологически активной части молекулы иммуноглобулина (Ig), т. е. к молекуле, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает антиген (иммунологически реагирует с антигеном). «Антигенсвязывающая часть» антитела или полипептида (также называемая «антигенсвязывающий фрагмент») относится к одной или нескольким частям антитела или полипептида, которые являются специфическими к целевому антигену. Антитела и антигенсвязывающие части включают без ограничения поликлональные, моноклональные, химерные, доменные антитела, одноцепочечные антитела, Fab- и F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, scFv, Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, фрагменты однодоменных антител (sdAb), переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (DART), иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом; изолированные определяющие комплементарность области (CDR) или комбинацию двух или более изолированных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером, и библиотеку экспрессии Fab. Не являющееся человеческим антитело, например, верблюжье антитело, можно гуманизировать рекомбинантными способами для снижения его иммуногенности у человека.

**[0064]** Последовательности CDR, указанные в данном документе, определены в соответствии с системой нумерации Kabat (т. е. «CDR по Kabat»), как описано в работе

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 посредством ссылки во всей своей полноте. CDR по Kabat определяют 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.

**[0065]** «Специфически связывается» или «иммуноспецифически связывается» означает, что нацеливающийся домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент реагирует с одной или несколькими антигенными детерминантами желаемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с гораздо меньшей аффинностью ( $K_d > 10^{-6}$ ), где меньшая  $K_d$  означает большую аффинность. Иммунологические связывающие свойства выбранных полипептидов могут быть определены количественно с помощью способов, хорошо известных в уровне техники. Один из таких способов включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, причем эти скорости зависят от концентраций партнеров комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной мере 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)). Отношение  $k_{off}/k_{on}$  позволяет исключить все параметры, не связанные с аффинностью, и равняется константе диссоциации  $K_d$ . (См., в целом, Davies et al. (1990) *Annual Rev Biochem* 59:439-473). В некоторых аспектах нацеливающийся на антиген домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с его соответствующим антигеном, демонстрируют  $K_d$  менее чем около 10 мкМ, а в некоторых аспектах менее чем около 100 мкМ по отношению к целевому антигену.

**[0066]** Иммуноглобулин может происходить из любого широко известного изотипа, включая без ограничения IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области техники и включают без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изотип» относится к классу или подклассу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

**[0067]** Антитело или полипептид «к антигену» относится к антителу или полипептиду, что специфически связывается с антигеном. Например, полипептид к CD3 специфически связывается с CD3.

**[0068]** В контексте данного документа термины «ММ» и «маскирующий фрагмент»

используются взаимозаменяемо для обозначения пептида, который препятствует связыванию нацеливающегося домена с его соответствующим антигеном. Например, ММ1 представляет собой пептид, препятствующий связыванию первого нацеливающегося домена с первой мишенью, а ММ2 представляет собой пептид, препятствующий связыванию второго нацеливающегося домена со второй мишенью. Степень, с которой маскирующий элемент препятствует связыванию нацеливающегося домена с его соответствующей мишенью, количественно определяется его «эффективностью маскирования». Термины «эффективность маскирования» и «МЕ» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения соотношения, которое определяется следующим образом:

МЕ = ЕС50, активируемый НВРС (т. е. не расщепленный протеазой)

ЕС50, активированный НВРС.

**[0069]** В контексте данного документа термины «СМ» и «расщепляемый фрагмент» используются взаимозаменяемо для обозначения пептида, который подвержен расщеплению протеазой. Опосредованное протеазой расщепление СМ приводит к высвобождению ММ из структуры активируемого НВРС, в результате чего образуется «активированный» (т. е. немаскированный) продукт, при этом каждый соответствующий «активированный» (т. е. немаскированный) первый и/или второй нацеливающийся домен может свободно связывать его соответствующую мишень.

**[0070]** 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 в соответствии с настоящим изобретением включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие первый, второй и третий полипептиды.

**[0071]** В контексте данного документа термин «функционально связанный» относится к положениям описанных таким образом компонентов, находящихся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать ожидаемым для них путем. Контрольная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигируется таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

**[0072]** Как обсуждается в данном документе, незначительные вариации в аминокислотных последовательностях, описанных в данном документе (т. е. в каждой эталонной

последовательности), рассматриваются как охватываемые настоящим 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 эталонной последовательностью. В частности, рассматриваются консервативные замены аминокислот. Консервативные замены представляют собой замены, которые происходят в семействе аминокислот, родственных по характеру их боковых цепей. Аминокислоты можно разделить на следующие семейства: (1) кислые аминокислоты, представляющие собой аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты, представляющие собой лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты, представляющие собой аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженные полярные аминокислоты, представляющие 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 семейству амидсодержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, принадлежащие семейству алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, принадлежащие семейству ароматических аминокислот. Например, разумно ожидать, что в полипептидах и полипептидных комплексах, описанных в данном документе, выделенная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или аналогичная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не окажет существенного влияния на связывание или свойства полученной молекулы, особенно если замена не затрагивает аминокислоту в CDR или каркасной области. Приводит ли аминокислотное изменение к образованию функционального полипептидного комплекса, можно легко определить, проанализировав специфическую активность полученной молекулы, т. е. полученной аналоговой последовательности. Анализы подробно описаны в данном документе. Предпочтительные амино- и карбоксиконцы аналогов находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с общедоступными или проприетарными базами данных последовательностей. Предпочтительно использовать компьютеризированные методы сравнения для идентификации мотивов последовательности или доменов предсказанной конформации белка, которые встречаются

в других белках известной структуры и/или функции. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые складываются в известную трехмерную структуру. См., например, Bowie et al. *Science* 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут распознавать мотивы последовательностей и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов в соответствии с настоящим изобретением.

**[0073]** Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики эталонной последовательности (например, замещающая аминокислота не должна иметь тенденцию к разрыву спирали, которая встречается в эталонной последовательности, или к нарушению других типов вторичной структуры, которая характеризует эталонную 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).

**[0074]** Иллюстративные аминокислотные замены также включают те, которые (1) снижают восприимчивость к протеолизу в областях активируемого полипептида, отличных от расщепляемого линкера, содержащего СМ, (2) снижают восприимчивость к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для формирования белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания с антигеном и (4) придают или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Такие аминокислотные замены могут быть идентифицированы с использованием известных способов мутагенеза и/или способов направленной молекулярной эволюции с использованием анализов, описанных в данном документе. См., например, международную публикацию № WO 2001/032712, патент США № 7432083, публикацию патентного документа США № 2004/0180340 и патент США № 6297053, каждые из которых включены в данный документ посредством ссылки. Аналоги могут быть получены путем введения одной или нескольких мутаций в эталонную последовательность в активируемом НВРС. Например, одиночные или множественные аминокислотные замены могут быть произведены во встречающейся в природе последовательности (предпочтительно, в части полипептида вне домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты).

**[0075]** В контексте данного документа под «фармацевтически приемлемым» или «фармацевтически совместимым» подразумевается материал, который не является биологически или иным образом нежелательным, например, материал может быть включен

в фармацевтическую композицию, вводимую индивидууму или субъекту, не вызывающий каких-либо значительных нежелательных биологических эффектов или не взаимодействующий пагубным образом с любым из других компонентов композиции, в которой он содержится. Фармацевтически приемлемые носители или вспомогательные вещества, например, отвечают необходимым стандартам токсикологического и производственного тестирования и/или включены в справочник неактивных ингредиентов, подготовленный администрацией США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств.

**[0076]** В контексте данного документа термин «пациент» включает любого пациента, пораженного раком. Термины «субъект» и «пациент» применяют в данном документе взаимозаменяемо.

**[0077]** Термины «рак», «раковый» или «злокачественный» означают или описывают физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, например, меланому, такую как нерезектабельная или метастатическая меланома, лейкоз, лимфому, бластому, карциному и саркому. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз с положительной филадельфийской хромосомой (Ph+ ALL), плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки, рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, карциному толстой кишки, рак головы и шеи, гастральный рак, эмбрионально-клеточную опухоль, педиатрическую саркому, синоназальную из натуральных клеток-киллеров, множественную миелому, острый миелогенный лейкоз (AML) и хронический лимфоцитарный лейкоз (СМL).

**[0078]** В контексте данного документа термин «опухоль» относится к любой массе ткани, образованной в результате избыточного роста или пролиферации клеток, как доброкачественной (нераковой), так и злокачественной (раковой), включая предраковые поражения.

**[0079]** «Введение» относится к физическому введению композиции, содержащей терапевтическое средство, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Пути введения составов, раскрываемых в данном документе, включают внутривенный, внутримышечный,

подкожный, внутрибрюшинный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте данного документа выражение «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают без ограничения внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную 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 или путь введения через слизистые оболочки, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местным путем. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или нескольких продолжительных периодов.

**[0080]** «Лечение» или «терапия» субъекта относится к любому типу вмешательства или процесса, выполняемого в отношении субъекта, или к введению активного средства субъекту с целью обратить вспять, облегчить, ослабить, ингибировать, замедлить прогрессирование, развитие, тяжесть или рецидив симптома, осложнения или состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием.

**[0081]** В контексте данного документа «эффективное лечение» относится к лечению, которое приводит к положительному эффекту, например, облегчению по меньшей мере одного симптома заболевания или нарушения. Благоприятный эффект может иметь форму улучшения по сравнению с исходным уровнем, т. е. улучшения по сравнению с измерением или наблюдением, сделанным до начала терапии в соответствии с данным способом. Благоприятный эффект может также проявляться в виде остановки, замедления, торможения или стабилизации пагубного прогрессирования маркера опухоли. Эффективное лечение может означать облегчение по меньшей мере одного симптома, связанного с раком. 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.

**[0082]** Термин «эффективное количество» относится к количеству средства, которое обеспечивает желаемый биологический, терапевтический и/или профилактический результат. Этим результатом может быть снижение, уменьшение интенсивности, временное облегчение, уменьшение, отсрочка и/или облегчение одного или нескольких

проявлений, симптомов или причин заболевания или любое другое желаемое изменение биологической системы. Что касается солидных опухолей, эффективное количество включает количество, достаточное для того, чтобы заставить опухоль уменьшиться, и/или снизить скорость роста опухоли (например, подавить рост опухоли), или отсрочить другую нежелательную пролиферацию клеток. В некоторых аспектах эффективное количество представляет собой количество, достаточное для предотвращения или задержки рецидива опухоли. Эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. Эффективное количество лекарственного средства или композиции может (i) уменьшить количество раковых клеток; (ii) уменьшить размер опухоли; (iii) ингибировать, тормозить, до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (т. е. замедлять до некоторой степени и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли; (vi) предотвращать или задерживать возникновение и/или рецидив опухоли и/или (vii) облегчать до некоторой степени один или несколько симптомов, связанных с раком.

**[0083]** «Иммунный ответ» относится к действию клетки иммунной системы (например, Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, натуральных киллерных клеток (NK), макрофагов, эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток или нейтрофилов) и растворимых макромолекул, продуцируемых любой из этих клеток или печенью, селезенкой и/или костным мозгом (включая антитела, цитокины и комплемент), что приводит к селективному нацеливанию, связыванию, повреждению, разрушению и/или удалению из организма позвоночного вторгающихся патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых или других патологических клеток или, в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, нормальных клеток или тканей человека.

**[0084]** Схематические изображения активируемых полипептидов по настоящему изобретению, например, на фиг. 1, не являются исключительными. Другие элементы последовательности, такие как линкеры, спейсеры и сигнальные последовательности, могут присутствовать до, после или между перечисленными элементами последовательности на таких схематических изображениях. Также следует учитывать, что MM и CM могут быть присоединены к VH антитела или полипептида, а не к VL антитела или полипептида, и наоборот.

**[0085]** Применение альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее один из вариантов, оба варианта или любую комбинацию альтернатив. В контексте данного документа употребление формы единственного числа следует понимать как относящееся к «одному или нескольким» из любого из упомянутых или перечисленных компонентов.

**[0086]** В контексте данного документа термин «и/или» следует рассматривать как



конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, 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 такой фразе, 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).

**[0087]** Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в ином способе также предложены аналогичные аспекты, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий по сути из».

**[0088]** Термин «около» относится к значению или композиции, которые находятся в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретных значения или композиции, как определено специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение или композиция измеряется или определяется, т. Е. от ограничений системы измерения. Например, термин «около» или «состоящий по сути из» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы, «около» или «состоящий по сути из» может означать диапазон до 10% или 20% (т.е.,  $\pm 10\%$  или  $\pm 20\%$ ). Например, около 3 мг может включать любое число от 2,7 мг до 3,3 мг (для 10%) или от 2,4 мг до 3,6 мг (для 20%). Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут означать в пределах порядка величины или в пределах 5-кратного значения. Если в заявке и формуле изобретения представлены конкретные значения или композиции, если не указано иное, следует предполагать, что значение «около» находится в пределах допустимого диапазона ошибок для этих конкретных значения или композиции.

**[0089]** В контексте данного документа любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, части целого числа (например, одной десятой и одной сотой целого числа), если не указано иное.

**[0090]** Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях 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 Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, Oxford University Press, для специалиста в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в

настоящем изобретении.

**[0091]** Единицы, приставки и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные выше, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

**[0092]** Различные аспекты настоящего изобретения более подробно описаны в следующих подразделах.

### **Активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС)**

**[0093]** В настоящем изобретении представлен активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс, содержащий

- (a) первый полипептид, который содержит
  - (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), при этом scFv содержит первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) и первый вариабельный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает первую мишень,
  - (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1),
  - (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1), содержащий первый субстрат для первой протеазы,
  - (iv) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и
  - (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1);
- (b) второй полипептид, который содержит
  - (i) второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывает вторую мишень,
  - (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2) и
  - (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2), содержащий второй субстрат для второй протеазы; и
- (c) третий полипептид, который содержит
  - (i) второй мономерный Fc-домен (Fc2),

при этом третий полипептид не содержит вариабельный домен иммуноглобулина; и

при этом MM1 представляет собой пептид, препятствующий связыванию первого нацеливающегося домена с первой мишенью, а MM2 представляет собой пептид,

препятствующий связыванию второго нацеливающегося домена со второй мишенью.

**[0094]** В некоторых аспектах активируемый НВРС по настоящему изобретению селективно активируется в условиях, которые более распространены в опухолевом микроокружении. Однако до тех пор, пока такая активация не произойдет, способность связывать свои мишени ослаблена. Таким образом, активируемые биспецифические антитела (т. е. активируемые НВРС) по настоящему изобретению обладают потенциалом для снижения токсичности, связанной с мишенью, за счет минимизации внецелевого связывания. Структурно активируемые НВРС по настоящему изобретению имеют только один связывающий домен для каждой мишени (т. е. «одновалентны»). Кроме того, эти активируемые НВРС не проявляют существенной агрегации в зависимости от концентрации, что делает возможным изготовление активируемого НВРС (активируемого биспецифического антитела) при относительно высокой чистоте продукта и высоких уровнях производительности.

**[0095]** В некоторых аспектах первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv-VH2-Fc1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь. В контексте данного документа «прямая связь» относится к прямой конъюгации двух пептидов НВРС, а «непрямая связь» относится к конъюгации с использованием связывающей молекулы, например, спейсера или линкера. Как показано ниже, активируемые НВРС, имеющие вышеописанные структуры, выгодно отличаются повышенной активностью (при активации) и эффективностью маскирования, а также улучшенной устойчивостью к агрегации по сравнению с активируемыми биспецифическими антителами, имеющими альтернативные структуры.

**[0096]** В некоторых аспектах одна из первой и второй мишеней представляет собой поверхностный антиген на иммунной эффекторной клетке, такой как, например, лейкоцит, например, на Т-клетке, на естественной киллерной клетке (NK), на мононуклеарной эффекторной клетке (такой как, например, миелоидная мононуклеарная клетка), на макрофаге и/или на другой иммунной эффекторной клетке. В контексте данного документа термины «мишень» и «антиген» используются взаимозаменяемо. Подходящие мишени иммунных эффекторных клеток включают, например, CD3, CD27, CD28, GITR, HVEM, ICOS, NKG2D, OX40 и т. п. В некоторых аспектах настоящего изобретения по меньшей мере одна из первой мишени и второй мишени представляет собой CD3. В определенных аспектах первая мишень представляет собой CD3.

**[0097]** В определенных аспектах первая мишень и вторая мишень являются разными биологическими мишенями, и, соответственно, первый нацеливающийся домен (т. е. VL1

и VH1) и второй нацеливающийся домен (т. е. VL2 и VH2) являются разными. В некоторых аспектах одна из первой мишени и второй мишени представляет собой полипептид CD3 (и соответственно один из первого нацеливающегося домена и второго нацеливающегося домена представляет собой нацеливающийся на полипептид CD3 домен). В некоторых аспектах одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) содержит VH1 и VL1, которые вместе образуют первый нацеливающийся домен для Т-клеточного антигенного полипептида (т. е. для первой мишени), и VH2 и VL2, которые вместе образуют второй нацеливающийся домен для поверхностного антигена раковой клетки, такого как, например, ассоциированный с опухолью антиген или специфический в отношении опухоли антиген (т. е. для второй мишени). Иллюстративные поверхностные антигены раковой клетки включают без ограничения EGFR; PSA; PAP; CEA; AFP; HCG; LDH; энлазу 2; CA 15-3 и CA 27.29, а иллюстративные мишени представлены в таблице 1. В других аспектах одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) содержит VH1 и VL1, которые вместе образуют первый нацеливающийся домен для поверхностного антигена раковой клетки (т. е. для первой мишени), и VH2 и VL2, которые вместе образуют второй нацеливающийся домен для Т-клеточного антигенного полипептида.

**Таблица 1. Иллюстративные мишени**

|                            |      |                                    |                         |           |          |
|----------------------------|------|------------------------------------|-------------------------|-----------|----------|
| 1-92-LFA-3                 | CD52 | DL44                               | HVEM                    | LAG-3     | STEAP1   |
| Альфа-4<br>интегрин        | CD56 | DLK1                               | Гиалуронидаза           | LIF-R     | STEAP2   |
| Альфа-V<br>интегрин        | CD64 | DLL4                               | ICOS                    | Lewis X   | TAG-72   |
| альфа-4-бета-1<br>интегрин | CD70 | DPP-4                              | IFN-альфа               | LIGHT     | TAPA1    |
| Альфа-4-бета-7<br>интегрин | CD71 | DSG1                               | IFN-бета                | LRP4      | TGF-бета |
| AGR2                       | CD74 | ECFR                               | IFN-гамма               | LRRC26    | TIGIT    |
| Антитело к<br>Lewis-Y      |      | EGFRviii                           | IgE                     | MCSP      | TIM-3    |
| Рецептор<br>апелина J      | CD80 | Рецептор<br>эндотелина<br>B (ETBR) | Рецептор IgE<br>(FcεRI) | Мезотелин | TLR2     |
| APRIL                      | CD81 | ENPP3                              | IGF                     | MRP4      | TLR4     |
| B7-H4                      | CD86 | EpCAM                              | IGFIR                   | MUC1      | TLR6     |

|                     |                   |                   |                          |                                |           |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|-----------|
| BAFF                |                   | EPHA2             | IL1B                     | Муцин-16<br>(MUC16,<br>CA-125) | TLR7      |
| BTLA                | CD117             | EPHB2             | TLIR                     | Na/K<br>АТФаза                 | TLR8      |
| Комплемент C5       | CD125             | ERBB3             | TL2                      | Нейтрофил-<br>эластаза         | TLR9      |
| C-242               | CD132<br>(IL-2RG) | Белок F из<br>RSV | IL11                     | NCF                            | TMEM31    |
| CA9                 | CD133             | FAP               | IL12                     | Никастрин                      | TNF-альфа |
| CA19-9 (Lewis<br>a) | CD137             | FGF-2             | IL12p40                  | Рецепторы<br>Notch             | TNFR      |
| Карбоангидраза<br>9 | CD138             | FGF8              | IL-12R,<br>IL-12R-бета 1 | Notch 1                        | TNFRS12A  |
| CD2                 | CD166             | FGFR1             | IL13                     | Notch 2                        | TRAIL-R1  |
| CD3                 | CD172A            | FGFR2             | IL13R                    | Notch 3                        | TRAIL-R2  |

**[0098]** В одном аспекте антиген раковой клетки представляет собой рецептор фактора роста. Рецепторы факторов роста представляют собой рецепторы, которые связывают факторы роста. Фактор роста представляет собой вещество природного происхождения, которое может стимулировать рост клеток. Существует множество различных типов факторов роста, включая адреномедуллин, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов, фактор роста гепатоцитов, трансформирующий фактор роста и фактор некроза опухоли. Каждый тип фактора роста имеет свою специализированную функцию или клеточный процесс, который он может регулировать. Домен рецептора фактора роста богат цистеинами и встречается в различных эукариотических белках. Рецептор участвует в передаче сигнала с помощью таких ферментов, как тирозинкиназы. Несмотря на различные типы рецепторов факторов роста, они имеют общую структуру, содержащую домен рецептора фактора роста в виде связанной дисульфидом складки, содержащей бета-шпильку с двумя соседними дисульфидами.

**[0099]** В некоторых аспектах настоящего изобретения первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv-VH2-Fc1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

**[0100]** В некоторых аспектах Т-клеточный антигенный полипептид представляет собой CD3. Термин «CD3» или «кластер дифференцировки 3», используемый в данном

документе, относится к белковому комплексу из шести цепей, которые являются субъединицами комплекса Т-клеточного рецептора (Janeway et al., p. 166, 9<sup>th</sup> ed.). Гетеродимер TCR  $\alpha:\beta$  ассоциируется с субъединицами CD3, образуя антигенный рецептор TCR клеточной поверхности. Две цепи CD3 $\epsilon$ , цепь CD3 $\gamma$ , цепь CD3 $\delta$  и гомодимер цепей CD3 $\zeta$  образуют комплекс Т-клеточного рецептора, который участвует в распознавании пептидов, связанных с основным комплексом гистосовместимости I и II класса, и участвуют в активации Т-клеток. Антиген CD3 экспрессируется зрелыми Т-лимфоцитами и подмножеством тимоцитов. CD3, как используется в данном документе, может быть получен из источника, представляющего собой позвоночное животное, включая млекопитающих, таких как приматы (например, люди) и грызуны (например, мыши и крысы). Этот термин охватывает «полноразмерный» непроцессированный CD3 (например, непроцессированный или немодифицированный CD3 $\epsilon$  или CD3  $\gamma$ ), а также любую форму CD3, которая является процессирования в клетке. Этот термин также охватывает встречающиеся в природе варианты CD3, включая, например, сплайс-варианты или аллельные варианты. Нацеливающийся домен к CD3, описанный в данном документе, может специфически связываться с CD3E человека дикого типа (№ доступа в NCBI NM\_000733.3).

**[0101]** В некоторых аспектах настоящего изобретения Т-клеточный антигенный полипептид представляет собой эILON-цепь CD3. В некоторых аспектах scFv (например, scFv к CD3) содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1) и переменный домен легкой цепи (VL1).

**[0102]** В некоторых аспектах настоящего изобретения представлены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv), содержащие CDR1-3 VH и CDR1-3 VL антител к CD3, представленных в таблице 2. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) содержит CDR1-3 VH под SEQ ID NO: 3-5 и CDR1-3 VL под SEQ ID NO: 6-8, соответственно. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) содержит CDR1-3 VH под SEQ ID NO: 128, 4, 130, соответственно, и CDR1-3 VL под SEQ ID NO: 131-133, соответственно. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) содержит CDR1-3 VH под SEQ ID NO: 3-5, соответственно, и CDR1-3 VL под SEQ ID NO: 144, 7, 146, соответственно. В другом аспекте антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv) содержит CDR1-3 VH под SEQ ID NO: 128, 4, 130, соответственно, и CDR1-3 VL под SEQ ID NO: 145, 132, 133, соответственно.

**[0103]** Переменные домены и/или scFv любого из ряда антител к CD3, которые известны в уровне техники, подходят для применения в активируемых НВРС по настоящему

изобретению. В некоторых аспектах scFv является специфическим в отношении связывания CD3ε и включает или получен из антитела или его фрагмента, что связывает CD3ε, например, CH2527, FN18, H2C, ОКТ3, SP34, 2C11, UCHT1, I2C, V9, их варианты и т. п. Антитела к CD3 (и/или их переменные домены) и маскирующие фрагменты, которые подходят для применения в активируемых НВРС по настоящему изобретению, включают описанные, например, в международных публикациях №№ WO 2013/163631, WO 2015/013671, WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Активируемый НВРС по настоящему изобретению может содержать любой из иллюстративных CDR VL и CDR VH антитела к CD3, приведенных в таблице 2.

**Таблица 2**

| Антитело к CD3 | VH                       |  |                                     | VL                                 |                             |                              | Маскирующий фрагмент к CD3            |
|----------------|--------------------------|--|-------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
|                | CDR1                     | CDR2                                     | CDR3                                | CDR1                               | CDR2                        | CDR3                         |                                       |
| 1              | KYAMN<br>(SEQ ID NO:3)   | RIRSKYNNYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID NO:4) | HGNFGNSYISY<br>WAY<br>(SEQ ID NO:5) | GSSTGAVTSGNYPN<br>(SEQ ID NO:6)    | GTKFLAP<br>(SEQ ID NO: 7)   | VLWYSNRWV<br>(SEQ ID NO:8)   | VSTTCWWDPPCTPNT<br>(SEQ ID NO:1)      |
| 2              | TYAMN<br>(SEQ ID NO:128) | RIRSKYNNYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID NO:4) | HGNFGNSYVSWFAY<br>(SEQ ID NO:130)   | RSSTGAVTTSNYAN<br>(SEQ ID NO: 131) | GTNKRAP<br>(SEQ ID NO: 132) | ALWYSNLWV<br>(SEQ ID NO:133) | GYLWGC<br>EWNCGGIT<br>(SEQ ID NO:72)  |
| 3              | KYAMN<br>(SEQ ID NO:3)   | RIRSKYNNYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID NO:4) | HGNFGNSYISY<br>WAY<br>(SEQ ID NO:5) | GSSTGAVTSGYYPN<br>(SEQ ID NO: 144) | GTKFLAP<br>(SEQ ID NO: 7)   | ALWYSNRWV<br>(SEQ ID NO:146) | GYRWGC<br>EWNCGGIT<br>(SEQ ID NO:68)  |
| 4              | KYAMN<br>(SEQ ID NO:3)   | RIRSKYNNYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID NO:4) | HGNFGNSYISY<br>WAY<br>(SEQ ID NO:5) | GSSTGAVTSGYYPN<br>(SEQ ID NO: 144) | GTKFLAP<br>(SEQ ID NO: 7)   | ALWYSNRWV<br>(SEQ ID NO:146) | MMYCGG<br>NEVLCGPRV<br>(SEQ ID NO:67) |

|    |                                 |   |  |   |                                    |                                     |   |
|----|---------------------------------|---|--|---|------------------------------------|-------------------------------------|---|
| 5  | KYAM<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:3)   | RIRSKYN<br>NYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID<br>NO:4) | HGNFG<br>NSYISY<br>WAY<br>(SEQ ID<br>NO:5)   | GSSTGA<br>VTSGYY<br>PN<br>(SEQ ID<br>NO: 144) | GTKFLA<br>P<br>(SEQ ID<br>NO: 7)   | ALWYS<br>NRWV<br>(SEQ ID<br>NO:146) | VYYCGG<br>NESLCGE<br>RR<br>(SEQ ID<br>NO:147) |
| 6  | TYAM<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:128) | RIRSKYN<br>NYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID<br>NO:4) | HGNFG<br>NSYVS<br>WFAY<br>(SEQ ID<br>NO:130) | RSSTGA<br>VTTSNY<br>AN<br>(SEQ ID<br>NO: 131) | GTNK<br>RAP<br>(SEQ ID<br>NO: 132) | ALWYS<br>NLWV<br>(SEQ ID<br>NO:133) | MMYCGG<br>NEVLCGP<br>RV<br>(SEQ ID<br>NO:67)  |
| 7  | TYAM<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:128) | RIRSKYN<br>NYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID<br>NO:4) | HGNFG<br>NSYVS<br>WFAY<br>(SEQ ID<br>NO:130) | RSSGAV<br>TTSNYA<br>N<br>(SEQ ID<br>NO: 145)  | GTNKR<br>AP<br>(SEQ ID<br>NO: 132) | ALWYS<br>NLWV<br>(SEQ ID<br>NO:133) | GYRWGC<br>EWNCGGI<br>TT<br>(SEQ ID<br>NO:68)  |
| 8  | TYAM<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:128) | RIRSKYN<br>NYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID<br>NO:4) | HGNFG<br>NSYVS<br>WFAY<br>(SEQ ID<br>NO:130) | RSSTGA<br>VTTSNY<br>AN<br>(SEQ ID<br>NO: 131) | GTNKR<br>AP<br>(SEQ ID<br>NO: 132) | ALWYS<br>NLWV<br>(SEQ ID<br>NO:133) | VYYCGG<br>NESLCGE<br>RR<br>(SEQ ID<br>NO:147) |
| 9  | TYAM<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:128) | RIRSKYN<br>NYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID<br>NO:4) | HGNFG<br>NSYVS<br>WFAY<br>(SEQ ID<br>NO:130) | RSSTGA<br>VTTSNY<br>AN<br>(SEQ ID<br>NO: 131) | GTNKR<br>AP<br>(SEQ ID<br>NO: 132) | ALWYS<br>NLWV<br>(SEQ ID<br>NO:133) | WYSGGC<br>EAFCGIL<br>SS<br>(SEQ ID<br>NO:148) |
| 10 | TYAM<br>N<br>(SEQ ID<br>NO:128) | RIRSKYN<br>NYATYY<br>ADSVKD<br>(SEQ ID<br>NO:4) | HGFNG<br>SYVSW<br>FAY<br>(SEQ ID<br>NO:143)  | RSSTGA<br>VTTSNY<br>AN<br>(SEQ ID<br>NO: 131) | GTNKR<br>AP<br>(SEQ ID<br>NO: 132) | ALWYS<br>NLWV<br>(SEQ ID<br>NO:133) | FMCQQR<br>MWGNEF<br>CHQ<br>(SEQ ID<br>NO:149) |

Другие подходящие маскирующие фрагменты антитела к CD3 (например, MM1) включают, например, YSLWGCEWGC DRGLY (SEQ ID NO:150), GYRWGCEWNCGGITT (SEQ ID NO: 68), YSACEMFGEVECCFC (SEQ ID NO:151), WYSGGCEAFCGILSS (SEQ ID NO:148), GYSGGCEFRCYQLYS (SEQ ID NO:152), KFCHCGYYCRVCTLK (SEQ ID



NO:153), LGCNNLWGNEFCHPV (SEQ ID NO:154) и GHPCWGNESYCHTHS (SEQ ID NO:155).

**[0104]** В некоторых аспектах настоящего изобретения первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи, расположенный между VH2 и мономерным Fc-доменом. В некоторых аспектах настоящего изобретения первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR1) иммуноглобулина, расположенную между доменом CH1 и первым мономерным Fc-доменом.

**[0105]** В некоторых аспектах настоящего изобретения первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-HR1-Fc1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

**[0106]** В некоторых аспектах антиген раковой клетки представляет собой антиген дифференцировки опухолевых клеток или другой антиген, связанный с опухолью. Некоторые антигены, экспрессируемые на опухолевых клетках, также экспрессируются, по меньшей мере на некоторых стадиях дифференцировки на незлокачественных клетках той клеточной линии, из которой развилась опухоль. Поэтому такие специфические в отношении линии антигены можно считать маркерами дифференцировки. Маркеры дифференцировки обнаруживаются на раковых клетках потому, что злокачественные клетки обычно экспрессируют по меньшей мере некоторые гены, характерные для нормальных типов клеток, из которых произошла опухолевая клетка. Присутствие этих антигенов нормальной дифференцировки может помочь ограничить цитотоксические эффекты терапевтического антитела одной клеточной линией.

**[0107]** Иллюстративная схема активируемого НВРС по настоящему изобретению представлена на фигуре 1, на которой изображен (а) первый полипептид, включающий первый маскирующий фрагмент (MM1) **100**, первый расщепляемый фрагмент (CM1) **101**, scFv **102** (включающий последовательности VH1 и VL1, соединенные через линкер), второй переменный домен тяжелой цепи VH2 (вверху) и домен CH1 (внизу), вместе указанные как **103**, которые соединены шарнирной областью **109**, с первым Fc-доменом **104**; и (b) второй полипептид, включающий второй маскирующий фрагмент (MM2) **105**, второй расщепляемый фрагмент (CM2) **106**, второй переменный домен легкой цепи VL2 (вверху) и константный домен легкой цепи (внизу), вместе указанные как **107**; и (c) третий полипептид, включающий шарнирную область **110** и второй Fc-домен **108**. Как показано на фигуре 1, первый и второй Fc-домены связаны друг с другом, а второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и второй переменный домен легкой цепи (VL2) образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывается со второй

мишенью. В некоторых аспектах scFv представляет собой scFv к CD3, при этом первая мишень представляет собой CD3, а VH2 и VL2 образуют домен, связывающий ассоциированный с опухолью или специфический в отношении опухоли антиген (т. е. при этом вторая мишень представляет собой ассоциированный с опухолью антиген или специфический в отношении опухоли антиген). Иллюстративные активируемые НВРС к CD3 и к EGFR, а также другие НВРС к CD3 и к ассоциированным с опухолью антигенам более подробно описаны в примерах ниже.

**[0108]** В некоторых аспектах настоящего изобретения активируемый НВРС содержит иллюстративный scFv к CD3, который содержит CDR1 тяжелой цепи (CDR1 VH, также упоминаемую в данном документе как CDRH1), CDR2 (CDR2 VH, также упоминаемую в данном документе как CDRH2) и CDR3 (CDR3 VH, также упоминаемую в данном документе как CDRH3), а также CDR1 переменной легкой цепи (CDR1 VL, также упоминаемую в данном документе как CDRL1), CDR2 (CDR2 VL, также упоминаемую в данном документе как CDRL2) и CDR3 (CDR3 VL, также упоминаемую в данном документе как CDRL3).

**[0109]** В некоторых аспектах настоящего изобретения scFv содержит переменный домен тяжелой цепи (VH1), содержащий (i) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность KYAMN (SEQ ID NO:3), (ii) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO:4), и (iii) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность HGNGFGNSYISYWAY (SEQ ID NO:5); и переменный домен легкой цепи (VL1), содержащий (i) CDR1, содержащую аминокислотную последовательность GSSTGAVTSGNYPN (SEQ ID NO:6), (ii) CDR2, содержащую аминокислотную последовательность GTKFLAP (SEQ ID NO:7), и (iii) CDR3, содержащую аминокислотную последовательность VLWYSNRWV (SEQ ID NO:8).

**[0110]** В некоторых аспектах настоящего изобретения VH1 содержит переменный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичный, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичный SEQ ID NO:9. В некоторых аспектах настоящего изобретения VL1 содержит переменный домен легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичный, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичный SEQ ID NO:10.

**[0111]** В некоторых аспектах настоящего изобретения первый полипептид scFv содержит переменный домен тяжелой цепи под SEQ ID NO:9. В некоторых аспектах настоящего

изобретения первый полипептид scFv содержит переменный домен легкой цепи под SEQ ID NO:10.

**[0112]** В некоторых аспектах если 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); а 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 под SEQ ID NO:1.

**[0113]** В альтернативном аспекте одноцепочечный переменный фрагмент 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), и (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130); и переменный 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).

**[0114]** В некоторых из этих аспектов по настоящему изобретению VH1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:134. В определенных аспектах настоящего изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:135. В конкретном аспекте по настоящему изобретению scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:122 (которая содержит SEQ ID NO:134 и 135).

**[0115]** В некоторых аспектах настоящего изобретения VH1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:134. В некоторых аспектах настоящего изобретения VL1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%,

по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:135.

**[0116]** В некоторых аспектах настоящего изобретения одноцепочечный вариабельный фрагмент первого полипептида 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), (iii) CDR3 VH, содержащую аминокислотную последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO:130), а также содержит вариабельный домен тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичный, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичный SEQ ID NO:135.

**[0117]** В некоторых аспектах настоящего 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), при этом аминокислотная последовательность VL1 на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:135.

**[0118]** В некоторых из этих аспектов, если 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); а 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), то MM1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:72.

**[0119]** Как описано выше, первый полипептид дополнительно содержит мономерный Fc-домен (Fc1). Fc-домены, которые известны в уровне техники, подходят для применения в активируемых НВРС по настоящему изобретению и описаны более подробно в данном документе ниже.

**[0120]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи, расположенный

между VH2 и Fc1. В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса (НВРС), описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина, расположенную между VH2 и Fc1. В некоторых аспектах, где присутствует домен CH1, шарнирная последовательность иммуноглобулина расположена между доменом CH1 и доменом Fc1.

**[0121]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-шарнирная область (HR1)-Fc1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь.

**[0122]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, первый полипептид дополнительно содержит один или несколько необязательных линкеров, которые более подробно описаны в данном документе ниже.

**[0123]** В некоторых аспектах настоящего изобретения активируемый НВРС содержит первый полипептид, содержащий Fc1, имеющий аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:24. В некоторых аспектах настоящего изобретения активируемый НВРС содержит первый полипептид, содержащий шарнирную область, имеющую последовательность шарнира-1 (SEQ ID NO:34) или шарнира-2 (SEQ ID NO:35).

**[0124]** В некоторых аспектах настоящего изобретения активируемый НВРС содержит второй полипептид, содержащий нацеливающийся домен, который содержит варибельный домен легкой цепи (VL2), который содержит CDR1 VL, CDR2 VL и CDR3 VL.

**[0125]** В некоторых аспектах активируемого НВРС, описанного в данном документе, второй полипептид содержит один или несколько линкеров. В некоторых аспектах MM2 соединяется с CM2 через линкер.

**[0126]** В некоторых аспектах второй полипептид активируемого НВРС, описанного в данном документе, дополнительно содержит линкер, содержащий от около 1 и около 20 аминокислот. Линкеры, подходящие для применения по настоящему изобретению, обсуждаются более подробно ниже.

**[0127]** В некоторых аспектах второй полипептид дополнительно содержит константный домен легкой цепи (CL). Иллюстративные CL включают любые из известных в уровне техники. В некоторых аспектах второй полипептид содержит CL, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:25. В некоторых из этих аспектов второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к

карбоксиконцу MM2-CM2-VL2-CL, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь.

**[0128]** В некоторых аспектах третий полипептид активируемого НВРС, описанного в данном документе, содержит мономерный Fc-домен (Fc2) и не содержит вариабельный домен иммуноглобулина. Fc2 может содержать любой из Fc-доменов, обсуждаемых в данном документе.

**[0129]** В некоторых аспектах активируемый НВРС, раскрываемый в данном документе, содержит третий полипептид, характеризующийся следующим структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: шарнирная область-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь. В некоторых аспектах знак «-» представляет собой прямую связь. В определенных аспектах третий полипептид состоит по сути из или состоит из шарнирной области и Fc2. В некоторых аспектах третий полипептид содержит Fc2, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:28 (необязательно, с С-концевым лизином, т. е. SEQ ID NO:29). В одном аспекте третий полипептид содержит шарнир, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:35, и Fc2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:28 (необязательно, с С-концевым лизином, т. е. SEQ ID NO:29). В определенных аспектах первый полипептид содержит шарнир, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:34, и Fc1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:23 (необязательно, с С-концевым лизином, т. е. SEQ ID NO:137).

**[0130]** Как представлено выше, в некоторых аспектах третий полипептид может содержать линкер, например, между шарнирной областью и Fc2. Линкер может содержать любой из линкеров, обсуждаемых в данном документе. В определенных аспектах третий полипептид не содержит линкер.

**[0131]** Структурное расположение компонентов в активируемом НВРС, описанном в данном документе, т. е. включающем первый, второй и третий полипептиды, как описано выше, выгодно отличается повышенной активностью (при активации), а также улучшенной устойчивостью к агрегации, по сравнению с активируемыми полипептидами, имеющими другое структурное расположение тех же компонентов. Примеры, приведенные в данном документе, свидетельствуют о том, что структура активируемых НВРС по настоящему изобретению обеспечивает выгодные свойства по сравнению с другими форматами маскированных биспецифических конструкций. Результаты были последовательными для различных видов конструкций и, как оказалось, не зависели от типа вариабельных доменов антител, маскирующих фрагментов и других переменных последовательностей.

**[0132]** Активируемый НВРС, представленный в данном документе, содержит первый маскирующий фрагмент и второй маскирующий фрагмент (ММ1 и ММ2, соответственно). Каждый ММ имеет аминокислотную последовательность, которая соединена или иным образом присоединена к активируемому НВРС и расположена внутри активируемого НВРС таким образом, чтобы препятствовать связыванию НВРС с его мишенями. Таким образом, константа диссоциации ( $K_d$ ) активируемого НВРС обычно больше, чем  $K_d$  соответствующего активируемого НВРС (или НВРС отдельно). Подходящие первый и второй ММ могут быть идентифицированы с помощью любой из множества известных методик. Например, пептидные ММ могут быть идентифицированы с помощью способов, описанных в публикациях заявок на патенты США №№ 2009/0062142 и 2012/0244154, а также в РСТ публикации № WO 2014/026136, каждая из которых тем самым включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0133]** В некоторых аспектах VH1 и VL1 вместе образуют домен, который специфически связывается с Т-клеточным антигенным полипептидом (т. е. первой мишенью), и ММ1 является таким, который уменьшает способность активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса специфически связываться с Т-клеточным антигенным полипептидом. В некоторых аспектах VH2 и VL2 вместе образуют домен, который специфически связывает антиген раковой клетки (т. е. вторую мишень), и ММ2 является таким, что уменьшает способность активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса специфически связываться с антигеном раковой клетки. В некоторых аспектах ММ1 и/или ММ2 специфически связывается(связываются) с антигенсвязывающим(ими) доменом(ами).

**[0134]** Например, маскирующие фрагменты, которые подходят для применения в осуществлении настоящего изобретения в связи с различными связывающими доменами антител, включают любые известные в уровне техники, в том числе описанные, например, в РСТ публикациях №№ WO 2013/163631, WO 2013/192550, WO 2014/052462, WO 2015/066279, WO 2016/014974, WO 2016/149201, WO 2016/179285, WO 2016/179257, WO 2016/179335, WO 2017/011580, WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Маскирующие фрагменты антитела к CD3, которые подходят для применения в осуществлении настоящего изобретения, включают любые из тех, которые известны в уровне техники, в том числе описанные, например, в РСТ публикациях №№ WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0135]** В некоторых аспектах активируемых НВРС, представленных в данном документе,

ММ1 и/или ММ2 содержат от 5 аминокислот до около 40 аминокислот или любой диапазон между ними, включая как 5 аминокислот, так и 40 аминокислот.

**[0136]** Активируемые НВРС по настоящему изобретению активируются, когда первый и второй субстраты (и, следовательно, первый и второй СМ) расщепляются первой и второй протеазой, соответственно, тем самым отвязывая маскирующие фрагменты от НВРС. В данном аспекте каждый СМ имеет один или несколько расщепляемых протеазой сайтов последовательности. Таким образом, полученный активированный НВРС может свободно связываться с первой и второй мишенями. В некоторых аспектах первый и второй субстраты (и, следовательно, первый и второй СМ) одинаковы. В этих аспектах первый и второй субстраты (и первый и второй СМ) расщепляются одной и той же протеазой, т. е. первая протеаза и вторая протеаза одинаковы. В некоторых аспектах первый и второй субстраты различны (и, как таковые, первый и второй СМ различны). В некоторых из этих аспектов первая и вторая протеазы одинаковы. В других аспектах первая и вторая протеазы различны.

**[0137]** В некоторых аспектах СМ специфичен для протеазы, которая активирована в опухолевом микроокружении. Такие активируемые НВРС используют дисрегуляцию протеазной активности в опухолевых клетках для направленной активации гетеромультимерного биспецифического полипептида (НВРС) в участке лечения и/или диагностики. Многочисленные исследования продемонстрировали взаимосвязь уровней aberrантных протеаз, например, uPA, легумаина, МТ-SP1, матриксных металлопротеаз (ММП), 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 служить субстратом для нескольких протеаз, например, субстратом для серинпротеазы и второй другой протеазы, например, ММП. В некоторых аспектах СМ может служить субстратом для более чем одной серинпротеазы, например, матриптазы и/или uPA. В некоторых аспектах СМ может служить субстратом для более чем одной ММП, например, ММП9 и ММП14.

**[0138]** В некоторых аспектах СМ1 и/или СМ2 содержат аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, приведенной в таблице 3 ниже. В определенных аспектах каждый СМ1 и СМ2 независимо содержит аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы,



приведенной в таблице 3 ниже.

**Таблица 3. Иллюстративные протеазы**

|  |  |  |
|--|--|--|
| ADAMS, ADAMTS,<br><i>например,</i><br>ADAM8<br>ADAM9<br>ADAM10<br>ADAM12<br>ADAM15         | цистеинпротеиназы,<br><i>например,</i><br>Крузипаин<br>Легумаин<br>Отубаин-2 | серинпротеазы, <i>например,</i><br><br>активированный белок С<br>Катепсин А<br>Катепсин G<br>Химаза    |
| ADAM17/TACE<br><br>ADAMDEC1<br>ADAMTS1<br>ADAMTS4<br>ADAMTS5                               | KLK, <i>например,</i><br><br>KLK4<br><br>KLK5<br>KLK6<br>KLK7<br>KLK8        | протеазы фактора свертывания<br>крови<br>( <i>например,</i> FVIIa, FIXa, FXa,<br>FXIa,<br>FXIIa)       |
|  | KLK10  | Эластаза   |
| Аспаргатпротеазы,<br><i>например,</i><br>BACE<br>Реним                                     | KLK11<br><br>KLK13<br>KLK14  | Гранзим В<br>Гуанидинобензоатаза   |
|  |  | НtrA1  |
|  |  | Нейтрофил-эластаза человека  |
|  |  | Лактоферрин  |
|  |  | Марапсин   |
|  |  | NS3/4A   |
| Аспарагиновая кислота –<br>катепсины, <i>например,</i><br>Катепсин D<br>Катепсин E         | Металлопротеиназы,<br><i>например,</i><br>Меприн<br>Неприлизин               | РАСЕ4<br><br>Плазмин<br>PSA  |
|  | PSMA   | tPA  |
| Каспазы, <i>например,</i><br>Каспаза 1<br>Каспаза 2<br>Каспаза 3<br>Каспаза 4<br>Каспаза 5 | BMP-1<br><br>MMP, <i>например,</i><br>MMP1<br>MMP2<br>MMP3                   | Тромбин<br>Триптаза<br>uPA<br><br>II типа трансмембранные<br>Серинпротеазы (TTSP),<br><i>например,</i> |

|  |       |                   |
|--|-------|-------------------|
| Каспаза 6                                | MMP7  | DESC1             |
| Каспаза 7                                | MMP8  | DPP-4             |
| Каспаза 8                                | MMP9  | FAP               |
| Каспаза 9                                | MMP10 | Гепсин            |
| Каспаза 10                               | MMP11 | Матриптаза-2      |
| Каспаза 14                               | MMP12 | MT-SP1/Матриптаза |
|  | MMP13 | TMPRSS2           |
| Цистеин - катепсины,<br><i>например,</i> | MMP14 | TMPRSS3           |
| Катепсин В                               | MMP15 | TMPRSS4           |
| 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 активируемых НВРС, описанных в данном документе, СМ1 и/или СМ2 включают от около трех аминокислот до около 15 аминокислот. В некоторых аспектах СМ1 и/или СМ2 могут включать два или более сайтов расщепления. В некоторых аспектах СМ1 может включать два или более сайтов расщепления для одной протеазы. В некоторых аспектах СМ2 может включать два или более сайтов расщепления для двух или более протеаз. В некоторых аспектах первая протеаза и вторая протеаза являются одной и той же протеазой. В некоторых аспектах СМ1 и СМ2 содержат различные субстраты для одной и той же протеазы. В некоторых аспектах СМ1 и СМ2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах СМ1 и СМ2 содержат разные аминокислотные последовательности. В некоторых аспектах СМ1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:73. В некоторых аспектах СМ1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2. В некоторых аспектах СМ2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14. В определенных аспектах активируемый НВРС, описанный в данном документе, содержит СМ1, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:2, и СМ2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14. В некоторых аспектах активируемый НВРС, описанный в данном документе, содержит СМ1, содержащий

аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 73, и CM2, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:14.

[0140] Иллюстративные CM, которые подходят для применения в активируемых НВРС, описанных в данном документе, включают те, что известны в уровне техники. Иллюстративные CM включают без ограничения описанные, например, в таблице 4 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 посредством ссылки во всей своей полноте.

[0141] В некоторых аспектах CM1 и/или CM2 содержат аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 4 ниже. В определенных аспектах каждый CM1 и CM2 независимо содержит аминокислотную последовательность, приведенную в таблице 4 ниже.

**Таблица 4. Расщепляемые фрагменты**

| SEQ ID NO CM | 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      |
| 156 | ALAHGLF            |
| 157 | APRSALAHGLF        |
| 158 | ISSGLLSGRSNI       |
| 159 | LSGRSNI            |

[0142] В некоторых аспектах активируемых гетеромультимерных биспецифических полипептидов (НВРС) по настоящему изобретению первый полипептид содержит один или несколько линкеров между ММ и СМ. В некоторых аспектах ММ1 соединяется с СМ1 через линкер. В некоторых аспектах ММ2 соединяется с СМ2 через линкер. В некоторых аспектах ММ1 связан с СМ1 через линкер L1, и СМ1 связан с scFv к CD3 через линкер L2. В некоторых аспектах ММ2 связан с СМ2 через линкер L3, и СМ2 связан с scFv через линкер L4. В некоторых аспектах аминокислотные последовательности L1, L2, L3 и/или L4 являются одинаковыми. В некоторых аспектах аминокислотные последовательности L1,

L2, L3 и/или L4 являются разными.

**[0143]** В некоторых аспектах активируемый НВРС содержит линкер между СМ и нацеливаемым доменом или его варибельным доменом. Линкеры, подходящие для применения в активируемых гетеромультимерных биспецифических полипептидах (НВРС), описанных в данном документе, обычно являются такими, которые обеспечивают гибкость активируемых гетеромультимерных биспецифических полипептидов (НВРС) 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, в том числе 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 в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

**[0144]** Иллюстративные гибкие линкеры включают полимеры глицина (G)<sub>n</sub>, полимеры глицин-серина (включая, например, (GS)<sub>n</sub>, (GSGGS)<sub>n</sub> и (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:41 и SEQ ID NO:40, соответственно), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере единице), полимеры глицин-аланин, полимеры аланин-серин и другие гибкие линкеры, известные в уровне техники. Полимеры глицина и глицин-серина относительно бесструктурны и поэтому могут служить нейтральной привязкой между компонентами. Глицин имеет доступ к значительно большему пространству фи-пси, чем даже аланин, и значительно менее ограничен, чем остатки с более длинными боковыми цепями (см. Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)). Рядовому специалисту в данной области техники понятно, что конструкция активируемых полипептидов может содержать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может включать гибкий линкер, а также одну или несколько частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры.

**[0145]** Активируемый биспецифический полипептидный комплекс (т. е. НВРС), описанный в данном документе, может содержать линкер в одном или нескольких из следующих местоположений: (a) между ММ1 и СМ1 и/или между СМ1 и scFv (т. е. между СМ1 и варибельным доменом тяжелой цепи (VH1) scFv или между СМ1 и варибельным доменом легкой цепи (VL1) scFv); (b) между ММ2 и СМ2; (b) между варибельными доменами тяжелой и легкой цепей scFv; (c) между варибельным доменом тяжелой цепи и доменом СН1; (d) между доменом СН1 и шарнирной областью; (e) между шарнирной областью и Fc-доменом; (g) между СМ2 и варибельным доменом легкой цепи; (h) между варибельным

доменом легкой цепи и CL; (i) между доменом CH1 и вторым Fc-доменом; (j) между доменом CH1 и шарнирной областью и/или (k) между шарнирной областью и вторым Fc-доменом.

**[0146]** В некоторых аспектах линкер выбран из группы, состоящей из (i) линкера на основе глицина и серина, выбранного из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGS)<sub>n</sub>, при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40), при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:126), при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, (GSGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:41), при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, и в некоторых аспектах при этом n представляет собой целое число от 1 до 10, GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:12), GGSG (SEQ ID NO:42), GGS GG (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), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:51), GGGGS (SEQ ID NO:52), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:53), GGGS (SEQ ID NO:54), GGGSGGGS (SEQ ID NO:55), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:57), GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:58), GGGSSGGS (SEQ ID NO:127) и GS; и (ii) линкера, содержащего глицин, 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), PKSCDKTHTCPPCPPELLG (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).

**[0147]** В некоторых аспектах настоящего изобретения активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс может содержать компоненты в дополнение к описанным выше. Такие компоненты могут включать спейсер. Термин «спейсер» относится в данном случае к аминокислотному остатку или пептиду, включенному на свободном конце первого, второго и/или третьего полипептида. Спейсеры, которые подходят для применения в осуществлении настоящего изобретения, включают любой отдельный аминокислотный остаток или любой пептид. Подходящие спейсеры включают любые из тех, которые описаны, например, в международных публикациях №№ WO 2016/014974, WO 2019/075405 и WO 2019/213444, каждая из которых включена в данный документ

посредством ссылки во всей своей полноте.

**[0148]** 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 количество между ними. В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса, 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:119).

**[0149]** В некоторых аспектах первый и второй Fc-домены (Fc1 и Fc2, соответственно) активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса, 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 являются модифицированными вариантами нативного Fc-домена IgG1 (например, человека). В некоторых аспектах Fc1 и/или Fc2 являются модифицированными вариантами нативного Fc-домена IgG4 (например, человека).

**[0150]** В некоторых аспектах настоящего изобретения Fc-домены, используемые в качестве Fc1 и/или Fc2, представляют собой мутированные формы нативной аминокислотной последовательности Fc. Мутации могут придавать активируемому гетеромультимерному биспецифическому полипептиду (и, соответственно, активированному НВРС) желаемые полезные свойства. 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; и Olafson et al., Methods Mol. Biol. 907:537-556, 2012). Подходит включение любых известных мутаций в Fc-домене, которые могут модулировать эффекторную функцию. Например, мутация N297A или N297G в аминокислотной последовательности Fc может быть использована для снижения эффекторных функций IgG (например, ADCC и CDC), что может снизить токсичности, не зависящие от мишени (см., например, Lund et al., Mol. Immunol. 29:35-39, 1992). Fc-домены, подходящие для применения в контексте настоящего изобретения, включают любой Fc-домен, известный в уровне техники, включая без ограничения любой известный гетеродимерный Fc (например, «выступы-во-впадины» и т. п.).

**[0151]** В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс, раскрываемый в данном документе, дополнительно содержит шарнирную область иммуноглобулина. Подходящие шарнирные области включают любые

шарнирные области, известные в уровне техники. Например, шарнирная область из любого из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) подходит для применения по настоящему изобретению. Различные классы иммуноглобулинов имеют различные и хорошо известные структуры субъединиц и трехмерные конфигурации.

**[0152]** В некоторых аспектах активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса, описанного в данном документе, Fc1 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична, на по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:23 (необязательно с С-концевым лизином (т. е. SEQ ID NO:24)).

**[0153]** 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%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична SEQ ID NO:28. В некоторых аспектах Fc2 содержит SEQ ID NO:28 (необязательно с концевым лизином (т. е. SEQ ID NO:29)).

**[0154]** В некоторых аспектах третий полипептид содержит шарнирную область, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34 и 35.

**[0155]** Как указано в других разделах данного документа, формат или структура активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса, раскрытого в данном документе, может включать любое количество необязательных дополнительных компонентов, включая линкеры и спейсеры. Исключительно в качестве примера, структуры, представленные ниже, являются одними из предполагаемых аспектов. Однако представленные ниже аспекты не ограничивают настоящее изобретение каким-либо образом.

**[0156]** В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс содержит первый полипептид, имеющий структуру (I).

Структура (I) первого полипептида:

(S1) – MM1 – (L1) – CM1 – L2 – VH1 – L3 – VL1 – (L4) – VH2 – (L5) – (CH11) – (L6) – (шарнир 1) – (L7) – Fc1,

при этом



- (S1) представляет собой необязательный спейсер;
- MM1 представляет собой маскирующий фрагмент для первого нацеливающегося домена;
- каждый из (L1), (L4), (L5), (L6) и (L7) независимо представляет собой необязательный линкер,
- L2 и L3 представляют собой линкеры,
- (CH11) представляет собой необязательный домен CH1,
- (шарнир1) представляет собой необязательную шарнирную область, и
- Fc1 является таким, как описано в данном документе выше.

[0157] В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс содержит второй полипептид, имеющий структуру (II).

Структура (II) второго полипептида:

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

при этом

- (S2) представляет собой необязательный спейсер;
- каждый из (L8), (L9) и (L10) независимо представляет собой необязательный линкер,
- MM2 представляет собой маскирующий фрагмент для второго нацеливающегося домена; и
- VL2 является таким, как описано в данном документе выше; и
- (CL) представляет собой необязательный константный домен легкой цепи.

[0158] В некоторых аспектах активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс содержит третий полипептид, имеющий структуру (III).

Структура (III) третьего полипептида:

(S3) – (CH12) – (L11) – (шарнир 2) – (L12) – Fc2,

при этом

- (S3) представляет собой необязательный спейсер;
- (CH12) представляет собой необязательный домен CH1,
- каждый из (L11) и (L12) независимо представляет собой необязательный линкер,
- Fc2 является таким, как описано в данном документе выше.

[0159] Линкеры, спейсеры, MM, CM, Fc-домены, домены CH1 (т. е. CH11 и CH12), шарнирные области и CL, которые подходят для применения в структурах (I), (II) и (III), включают любые из известных в уровне техники или описанных в данном документе.

[0160] В некоторых аспектах настоящего изобретения активируемый НВРС содержит (a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv),

содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют нацеливающийся на Т-клеточный антиген домен, который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1), (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1); (iv) второй переменный домен тяжелой цепи (VH2), (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1), (vi) домен CH1 тяжелой цепи и (vii) первую шарнирную область (HR1) иммуноглобулина между доменом CH1 и Fc1; (b) второй полипептид, содержащий (i) переменный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют нацеливающийся на поверхностный антиген раковой клетки домен, который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2) и (iv) константный домен CL1 легкой цепи; и (c) третий полипептид, который (i) содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и шарнирную область иммуноглобулина и (ii) не содержит переменный домен иммуноглобулина.

**[0161]** В определенных аспектах первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу

MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1;

второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу:

MM2-CM2-VL2-CL1;

и третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь. В некоторых аспектах третий полипептид состоит по сути из или состоит из HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую (например, через линкер) связь.

**[0162]** В некоторых аспектах первый полипептид HR1 и второй полипептид HR2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность. В некоторых аспектах первый полипептид HR1 и второй полипептид HR2 содержат разные аминокислотные последовательности.

**[0163]** В настоящем изобретении также представлен гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (например, компонент НВРС в активируемых НВРС, описанных в данном документе), содержащий (a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает

первую мишень, (ii) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и (iii) и первый мономерный Fc-домен (Fc1); (b) второй полипептид, который содержит второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывает вторую мишень; и (c) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2), и при этом третий полипептид не содержит вариабельный домен иммуноглобулина. В некоторых аспектах описанные выше конструкции НВРС могут быть созданы путем «активации» активируемых НВРС, описанных в данном документе. Любые из компонентов VH1, VL1 (и scFv), VH2, VL2, Fc1, Fc2 и необязательного линкера, HR1, HR2 и CH1, описанных в данном документе как подходящие для активируемых НВРС по настоящему изобретению, подходят для описанных выше конструкций НВРС. Три полипептида в НВРС имеют структуру, которая включает следующие элементы: (a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), содержащий первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) и первый вариабельный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает первую мишень, (ii) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2) и (iii) первый мономерный Fc-домен (Fc1); (b) второй полипептид, который содержит второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывает вторую мишень; и (c) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и не содержит вариабельный домен иммуноглобулина.

### **Наборы**

[0164] В данном документе представлены наборы, содержащие один или несколько активируемых НВРС или НВРС из них, как описано в данном документе, при этом наборы предназначены для диагностики или лечения. В некоторых аспектах в данном документе представлена упаковка или набор, включающий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами композиций, описанных в данном документе, такими как один или несколько активируемых НВРС, представленных в данном документе, или их антигенсвязывающий фрагмент, и необязательные инструкции по применению. В некоторых аспектах наборы содержат композицию, описанную в данном документе, и любое диагностическое, профилактическое или терапевтическое средство, например, описанное в данном документе.

### **Терапевтическое применение и способы**

[0165] В некоторых аспектах в данном документе представлены способы лечения заболеваний, например, раковых заболеваний, включающие введение нуждающемуся в

этом субъекту активируемого НВРС или его НВРС, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе представлены способы ингибирования роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающие введение нуждающемуся в этом субъекту активируемого НВРС или его НВРС, описанного в данном документе, или фармацевтической композиции, описанной в данном документе. В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к активируемому НВРС или его НВРС, описанному в данном документе, или к фармацевтической композиции, представленной в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата. Обычно субъектом является человек, но можно также лечить и отличных от человека млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих.

**[0166]** Количество активируемого НВРС, или его НВРС, или композиции, которое будет эффективно при лечении состояния, зависит от характера заболевания. Точная доза, используемая в композиции, также зависит от пути введения и тяжести заболевания.

**[0167]** Неограничивающие примеры заболевания включают раковые заболевания, ревматоидный артрит, болезнь Крона, SLE, сердечно-сосудистое нарушение, ишемию и т. д. Например, показания могут включать лейкозы, в том числе Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз (Т-ALL), лимфобластные заболевания, в том числе множественную миелому, и солидные опухоли, в том числе рак легкого, колоректальный, предстательной железы, поджелудочной железы и молочной железы, в том числе трижды негативный рак молочной железы. Например, показания могут включать заболевание костей или метастазы при раке, независимо от происхождения первичной опухоли; рак молочной железы, включая, в качестве неограничивающего примера, ER/PR+ рак молочной железы, Her2+ рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы; колоректальный рак; рак эндометрия; рак желудка; глиобластому; рак головы и шеи, такой как плоскоклеточный рак головы и шеи; рак пищевода; рак легких, такой как, в качестве неограничивающего примера, немелкоклеточный рак легких; множественную миелому; рак яичников; рак поджелудочной железы; рак предстательной железы; саркому, такую как остеосаркома; рак почек, такой как, в качестве неограничивающего примера, почечно-клеточная карцинома; и/или рак кожи, такой как, в качестве неограничивающего примера, плоскоклеточный рак, базально-клеточная карцинома или меланома.

### **Полинуклеотиды**

**[0168]** В некоторых аспектах в данном документе представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую первый, второй и/или третий полипептид активируемых НВРС и конструкций НВРС по настоящему изобретению (соответственно упоминаемые в данном документе как «первый полинуклеотид», «второй

полинуклеотид» и «третий полинуклеотид»), соответственно. Подходящие полинуклеотиды включают любые, которые кодируют любой из первого, второго и/или третьего полипептидов, описанных в данном документе, или их часть. Ниже в данном документе приведен иллюстративный ряд полинуклеотидных последовательностей, кодирующих первый, второй и третий полипептиды.

**[0169]** Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут быть оптимизированы по последовательности для оптимального продуцирования из организма-хозяина, выбранного для экспрессии, например, путем оптимизации кодонов/РНК, замены на гетерологичные сигнальные последовательности и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы создания оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих активируемый НВРС или его НВРС для рекомбинантной экспрессии, путем введения изменений кодонов (например, изменения кодонов, кодирующих одну и ту же аминокислоту в силу вырожденности генетического кода) и/или устранения ингибирующих областей в мРНК могут быть осуществлены путем адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США №№ 5965726, 6174666, 6291664, 6414132 и 6794498, соответственно.

**[0170]** Полинуклеотид, кодирующий полипептид или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, или его домен, может быть создан из нуклеиновых кислот из подходящего источника (например, гибридомы) с использованием способов, хорошо известных в уровне техники (например, ПЦР и другие способы молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификация с использованием синтетических праймеров, гибридизирующихся с 3'- и 5'-концами известной последовательности, может быть выполнена с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих представляющее интерес антитело. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Амплифицированные нуклеиновые кислоты могут быть клонированы в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения гуманизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

**[0171]** Полинуклеотиды, представленные в данном документе, могут представлять собой РНК или ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК, и при этом ДНК может быть двухнитевой или однонитевой. Если ДНК однонитевая, она может быть

кодирующей или некодирующей (антисмысловой) нитью. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой кДНК или ДНК, в которой отсутствует один из эндогенных интронов. В некоторых аспектах полинуклеотид представляет собой не встречающийся в природе полинуклеотид. В некоторых аспектах полинуклеотид получают рекомбинантным путем. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются выделенными. В некоторых аспектах полинуклеотиды являются по сути чистыми. В некоторых аспектах полинуклеотид очищают от природных компонентов.

### **Векторы, клетки-хозяева и способы получения**

[0172] В данном документе представлены один или несколько векторов, содержащих полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и/или третий полипептиды по настоящему изобретению (соответствующие первому полинуклеотиду, второму полинуклеотиду и третьему полинуклеотиду, соответственно). В некоторых аспектах такие векторы могут быть использованы для рекомбинантного получения полипептидов активируемого НВРС (или НВРС) из клетки-хозяина, как более подробно описано в данном документе ниже. В некоторых аспектах вектор содержит первый, второй и/или третий полинуклеотид, функционально связанный с один или несколькими промоторными последовательностями. В определенных аспектах в настоящем изобретении представлено множество векторов, которые в совокупности включают полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептиды (т. е. первый, второй и третий полинуклеотиды), где множество включает по меньшей мере один вектор, который включает не более двух или не более одного из первого, второго и третьего полинуклеотидов. В этих аспектах последовательности первого, второго и третьего полинуклеотида во множестве векторов обычно функционально связаны с одной или несколькими промоторными последовательностями.

[0173] Также в данном документе представлены рекомбинантные клетки-хозяева, содержащие любой из описанных выше полинуклеотидов и/или векторов для рекомбинантной экспрессии полинуклеотидов, кодирующих полипептиды активируемого НВРС или НВРС по настоящему изобретению. Для экспрессии описанных в данном документе полипептидов можно использовать различные системы векторов экспрессии хозяина (см., например, патент США № 5807715). Такие системы экспрессии хозяина представляют собой среды-носители, с помощью которых могут быть получены и впоследствии очищены представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые при трансформации или трансфекции соответствующими нуклеотидными кодирующими последовательностями могут экспрессировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе *in situ*. Иллюстративные клетки-хозяева, которые подходят для применения в

качестве хозяина рекомбинантной экспрессии описанных выше полинуклеотидов, включают системы клеток млекопитающих (например, клетки COS (например, COS1 или COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa и NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 и т. п.). Векторы, используемые для конструирования рекомбинантной клетки-хозяина млекопитающего, могут включать промотор, полученный из генома клетки млекопитающего (например, промотор металлотioneина) или из вируса млекопитающего (например, поздний промотор аденовируса; промотор вируса коровьей оспы 7.5K). В некоторых аспектах рекомбинантная клетка-хозяин представляет собой клетку CHO или клетку NS0.

**[0174]** В некоторых аспектах рекомбинантная экспрессия полипептида, описанного в данном документе, например, первого, второго и/или третьего полипептида, включает конструирование вектора экспрессии, содержащего первый, второй и/или третий полинуклеотиды. Вектор(ы), содержащий(ие) полинуклеотиды, кодирующие активируемый НВРС или НВРС по настоящему изобретению, можно легко создать с помощью технологии рекомбинантной ДНК, используя методики, хорошо известные в уровне техники. Способы, хорошо известные специалистам в данной области, могут быть использованы для конструирования векторов экспрессии, содержащих один или несколько полинуклеотидов, кодирующих описанные в данном документе полипептиды, например, первый, второй и/или третий полипептид, а также соответствующие сигналы транскрипционного и трансляционного контроля. Эти способы включают, например, методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Также представлены реплицируемые векторы, содержащие нуклеотидную последовательность, функционально связанную с промотором. Такие векторы, например, могут включать 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; а также патент США № 5122464), и переменные домены полипептида могут быть клонированы в такой вектор для экспрессии всей VH, всей VL или всей и VH, и VL.

**[0175]** Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку (например, клетку-хозяина) обычными методиками, и полученные клетки могут быть затем культивированы обычными методиками для получения активируемого НВРС или НВРС, описанного в данном документе. Таким образом, в данном документе представлены клетки-хозяева содержащие полинуклеотид, кодирующий НВРС, описанный в данном документе, функционально связанный с промотором для экспрессии таких последовательностей в клетке-хозяине. В

некоторых аспектах клетка-хозяин содержит вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, кодирующих активируемый НВРС или НВРС, описанный в данном документе, или его домен. В некоторых аспектах клетка-хозяин содержит три разных вектора, при этом первый вектор содержит первый полинуклеотид, кодирующий первый полипептид, описанный в данном документе, второй вектор содержит второй полинуклеотид, кодирующий второй полипептид, описанный в данном документе, и третий вектор содержит третий полинуклеотид, кодирующий третий полипептид, описанный в данном документе.

**[0176]** В некоторых аспектах в данном документе представлена популяция векторов, которые в совокупности включают полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептиды, при этом каждый вектор содержит только один или два полинуклеотида, кодирующие первый, второй или третий полипептиды. В определенных аспектах в данном документе представлен один вектор, включающий полинуклеотиды, кодирующие первый, второй и третий полипептиды (т. е. первый, второй и третий полинуклеотиды, соответственно).

**[0177]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлены способы получения активируемого НВРС по настоящему изобретению, включающие (а) культивирование клетки-хозяина, содержащей один или несколько полинуклеотидов, кодирующих полипептиды по настоящему изобретению (например, первый полинуклеотид, второй полинуклеотид и/или третий полинуклеотид, а также вектор(ы), содержащий(ие) упомянутые выше полинуклеотиды), в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования активируемого НВРС; и (b) извлечение активируемого НВРС.

**[0178]** В конкретном аспекте в данном документе представлены способы получения активируемого НВРС по настоящему изобретению, включающие экспрессию его первого, второго и третьего полипептидов в клетке-хозяине. Более конкретно, в данном документе представлен способ получения активируемого НВРС, включающий (а) культивирование клетки-хозяина, содержащей один или несколько полинуклеотидов, кодирующих полипептиды по настоящему изобретению, в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования активируемого НВРС; и (b) извлечение активируемого НВРС. В другом аспекте способ дополнительно включает очистку собранного биологического материала (бесклеточного продукта экспрессии) активируемого НВРС или другой обрабатываемой композиции, включающую подвергание водной композиции, включающей активируемый НВРС, такой единичной операции, как, например, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография,



хроматография на керамическом гидроксипатите и т. п. В определенных аспектах единичная операция представляет собой хроматографию на керамическом гидроксипатите.

**[0179]** В следующем аспекте в данном документе представлены способы получения НВРС по настоящему изобретению, включающие экспрессию его первого, второго и третьего полипептидов в клетке-хозяине. Более конкретно, в данном документе представлен способ получения НВРС по настоящему изобретению, включающий (а) культивирование клетки-хозяина, содержащей один или несколько полинуклеотидов, кодирующих полипептиды по настоящему изобретению, в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования НВРС; и (b) извлечение НВРС. В другом аспекте способ дополнительно включает очистку собранного биологического материала (бесклеточного продукта экспрессии) НВРС или другой обрабатываемой композиции, включающую подвергание водной композиции, включающей активируемый НВРС, такой единичной операции, как, например, аффинная хроматография, эксклюзионная хроматография, ионообменная хроматография, хроматография на керамическом гидроксипатите и т. п. В определенных аспектах единичная операция представляет собой хроматографию на керамическом гидроксипатите.

### **Композиции**

**[0180]** В некоторых аспектах активируемые НВРС по настоящему изобретению или их НВРС могут быть использованы в фармацевтической композиции, применимой для любых из терапевтических применений, раскрываемых в данном документе. В определенных аспектах фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или нескольких активируемых НВРС, вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. В другом аспекте фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество одного или нескольких активируемых НВРС, фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант. Приемлемые материалы состава являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции можно составлять в виде жидких, замороженных или лиофилизированных композиций.

**[0181]** В определенных аспектах фармацевтическая композиция может содержать составляющие материалы для модификации, поддержания или сохранения, например, pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции. Подходящие для составления материалы включают без ограничения аминокислоты; противомикробные средства; антиоксиданты; буферы; объемобразующие

средства; хелатирующие средства; комплексообразующие средства; наполнители; углеводы, такие как моносахариды или дисахариды; белки; красящие, ароматизирующие и разбавляющие средства; эмульгирующие средства; гидрофильные полимеры; низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты; растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты; суспендирующие средства; поверхностно-активные вещества или смачивающие средства; средства, повышающие стабильность; средства, повышающие тоничность; среды-носители доставки и/или фармацевтические адъюванты. Дополнительные подробности и варианты в отношении подходящих средств, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, приведены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22<sup>nd</sup> Edition, (Lloyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7<sup>th</sup> ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); и Kibbe *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> ed., Pharmaceutical Press (2000).

**[0182]** Компоненты фармацевтической композиции выбирают в зависимости от, например, предполагаемого пути введения, формата доставки и необходимой дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22<sup>nd</sup> Edition, (Lloyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013). Композиции подбирают так, чтобы повлиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения *in vivo* описанных антигенсвязывающих белков. Первичные среда-носитель или носитель в фармацевтической композиции могут быть водными или неводными по своей природе. Например, подходящие среда-носитель или носитель могут представлять собой воду для инъекций или физиологический солевой раствор. В определенных аспектах композиции антигенсвязывающего белка могут быть получены для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей желаемую степень чистоты, с необязательными средствами для составления в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Кроме того, в определенных аспектах антигенсвязывающий белок можно составлять в виде лиофилизата, используя соответствующие вспомогательные вещества.

**[0183]** В некоторых составах концентрация активируемого НВРС 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 НВРС имеет концентрацию 10-20 мг/мл, 20-40 мг/мл, 40-60 мг/мл, 60-80 мг/мл или 80-100 мг/мл.

**[0184]** Некоторые композиции содержат буфер или регулирующее pH средство. Типичные буферы включают без ограничения соли органических кислот (такие как соли лимонной

кислоты, уксусной кислоты, аскорбиновой кислоты, глюконовой кислоты, карбоновой кислоты, винной кислоты, янтарной кислоты или фталевой кислоты); Трис; фосфатные буферы и, в некоторых случаях, аминокислоты, как описано ниже. В определенных аспектах для поддержания физиологического рН или немного меньшего рН композиции применяют буферы, как правило, в диапазоне рН от около 5 до около 8. Некоторые композиции имеют рН около 5-6, 6-7 или 7-8. В других аспектах рН составляет 5,5-6,5, 6,5-7,5 или 7,5-8,5.

**[0185]** Свободные аминокислоты используют в некоторых композициях как объемобразующие средства, стабилизаторы и/или антиоксиданты. В качестве примера, для стабилизации белков в составе можно использовать лизин, пролин, серин и аланин. Глицин применим при лиофилизации, чтобы гарантировать правильную структуру и свойства таблетки. Аргинин можно использовать для ингибирования агрегации белка как в жидких, так и в лиофилизированных составах. Метионин используют как антиоксидант. В некоторых аспектах включены глутамин и аспарагин. В некоторые составы включены аминокислоты из-за их буферной способности. Такие аминокислоты включают, например, аланин, глицин, аргинин, бетаин, гистидин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, цистеин, лизин, лейцин, изолейцин, валин, метионин, фенилаланин, аспартам и т. п. Определенные составы также включают белковое вспомогательное вещество, такое как сывороточный альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин (HSA) и рекомбинантный человеческий альбумин (rHA)), желатин, казеин и т. п.

**[0186]** 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 (PEG) и схожие вещества. Полиолы являются космотропными. Они являются применимыми стабилизирующими средствами как в жидких, так и в лиофилизированных составах, защищая белки от процессов физического и химического распада. Полиолы также применимы для регуляции тоничности составов.

**[0187]** Определенные композиции содержат маннит в качестве стабилизатора. Его в общем случае используют с лиопротектором, например, сахарозой. Сорбит и сахароза применимы для регуляции тоничности и в качестве стабилизаторов для защиты от стресса вследствие замораживания-размораживания во время транспортировки или изготовления нефасованного продукта в процессе производства. PEG применим для стабилизации белков и в качестве криопротектора и может быть в связи с этим использован в настоящем изобретении.

**[0188]** В некоторые составы могут быть включены сахара, включая моносахариды, ди-, три-

, тетра- и олигосахариды; дериватизированные сахара, такие как альдитолы, альдоновые кислоты, эстерифицированные сахара и т. п.; а также полисахариды или сахарные полимеры. Например, подходящие углеводные вспомогательные вещества включают моносахариды, такие как фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-манноза, сорбоза и т. п.; дисахариды, такие как лактоза, сахароза, трегалоза, целлобиоза и т. п.; полисахариды, такие как раффиноза, мелецитоза, декстраны, крахмалы и т. п.; и альдитолы, такие как маннит, ксилит, мальтит, лактит, ксилит-сорбит (глюцит), миоинозит и т. п.

**[0189]** В определенные составы могут быть включены поверхностно-активные вещества. Поверхностно-активные вещества, как правило, используют для предотвращения, минимизации или снижения адсорбции белка на поверхности и последующей агрегации на поверхностях раздела воздух-жидкость, твердое тело-жидкость и жидкость-жидкость, и для регуляции конформационной стабильности белков. Подходящие поверхностно-активные вещества включают, например, полисорбат 20, полисорбат 80, другие сложные эфиры жирных кислот или сложные эфира сорбитана, поверхностно-активные вещества Тритон, лехитин, тилоксапал и полоксамер 188.

**[0190]** В некоторых аспектах в фармацевтическую композицию включены один или несколько антиоксидантов. Антиоксидантные вспомогательные вещества можно использовать для предотвращения окислительного распада белков. Восстановительные средства, поглотители кислорода/свободных радикалов и хелатирующие средства являются применимыми антиоксидантами в этом смысле. Антиоксиданты, как правило, являются водорастворимыми и сохраняют свою активность в течение срока годности продукта. ЭДТА представляет другой применимый антиоксидант.

**[0191]** Определенные составы содержат ионы металлов, которые являются кофакторами белков и необходимы для образования координационных комплексов белков. Ионы металлов также могут ингибировать некоторые процессы, которые разрушают белки. Например, можно использовать ионы магния (10–120 мМ), чтобы ингибировать изомеризацию аспарагиновой кислоты до изоаспарагиновой кислоты.

**[0192]** Также в определенные составы может быть включено средство, повышающее тоничность. Примеры таких средств включают галогениды щелочных металлов, предпочтительно хлорид натрия или калия, маннит и сорбит.

**[0193]** В определенные составы могут быть включены один или несколько 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, м-крезол, п-крезол, о-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 кислоту, салициловую кислоту, хлоргексидин или их смеси в водном разбавителе.

**[0194]** Фармацевтическую композицию составляют так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают внутривенное (в/в), интрадермальное, ингаляционное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение.

**[0195]** Компоненты состава, подходящего для парентерального введения (например, внутривенного, подкожного, внутриглазного, внутрибрюшинного, внутримышечного), включают стерильный разбавитель, такой как вода для инъекций, физиологический солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие средства, такие как ЭДТА; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты; и средства для регуляции тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

**[0196]** Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stermophor EL™ (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси) или забуференный фосфатом солевой раствор (PBS). Носитель должен быть стабильным в условиях производства и должен быть защищен от микроорганизмов. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, включающие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), и их подходящие смеси.

**[0197]** Дополнительное руководство по подходящим составам в зависимости от формы доставки приведено, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22<sup>nd</sup> Edition, (Lloyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013).

**[0198]** Фармацевтические составы могут быть стерильными. Стерилизацию можно осуществлять любым подходящим способом, например, фильтрацией через стерильные фильтровальные мембраны. Если композиция лиофилизирована, стерилизацию через фильтр можно проводить до или после лиофилизации и восстановления.

**[0199]** Как показано в примерах 7 и 8, активируемые НВРС, описанные в данном документе, оказываются относительно устойчивыми к агрегации даже при относительно высоких концентрациях. Таким образом, в другом аспекте в данном документе

представлены композиции, содержащие любые активируемые НВРС, описанные в данном документе, и воду, при этом активируемый НВРС присутствует при концентрации по меньшей мере 1 мг/мл, и при этом композиция содержит по меньшей мере 95% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого НВРС. В контексте данного документа термин «мономерный активируемый НВРС» относится к активируемому НВРС в неагрегированной форме. В некоторых из этих аспектов композиция содержит по меньшей мере около 2 мг/мл и по меньшей мере 95% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого НВРС. В некоторых аспектах композиция содержит по меньшей мере около 3 мг/мл и по меньшей мере 95% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого НВРС. В некоторых аспектах композиция содержит по меньшей мере около 4 мг/мл и по меньшей мере 95% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 96% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 97% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 98% мономерного активируемого НВРС, или по меньшей мере около 99% мономерного активируемого НВРС. Процентное отношение мономерного активируемого НВРС может быть легко определено, например, с помощью эксклюзионной ВЭЖХ, как показано в примере 7, при этом процент мономерного активируемого НВРС определяют как процент площади пика, соответствующей мономерному активируемому НВРС, от общей площади пика.

## ПРИМЕРЫ

[0200] Примеры, приведенные в данном разделе Примеры, представлены в качестве иллюстрации, а не ограничения.

### *Пример 1. Конструкция и экспрессия активируемых гетеромультимерных биспецифических полипептидов*

[0201] Получали два иллюстративных активируемых гетеромультимерных биспецифических полипептидных комплекса (НВРС), комплекс-57 и комплекс-67, имеющие структуру, показанную на **фигуре 1**. Каждая из этих конструкций активируемого

НВРС имела три полипептида, как показано на фигуре 1. ScFv в каждом случае представлял собой часть антитела к CD3ε, а второй нацеливающийся домен (т. е. VH2 и VL2) в каждом случае нацеливался на EGFR. Нацеливающийся на EGFR домен в каждой конструкции был один и тот же, а нацеливающиеся на CD3ε домены были разными..

Компоненты комплекса-67 перечислены в таблицах 5А-5С, а компоненты конструкции комплекса-57 перечислены в таблицах 6А-6С.

**Таблица 5А. Первый полипептид комплекса-67**

| Наименование  | Первый полипептид       |                          |                         |                            |                  |
|---|-------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|------------------|
|   | MM1                     | CM1                      | scFv                    | VH2                        | Fc1 <sup>Δ</sup> |
| Первый полипептид<br><br>SEQ ID NO:30 <sup>*,++</sup> | ML15<br><br>SEQ ID NO:1 | 0011<br><br>SEQ ID NO:73 | i2C<br><br>SEQ ID NO:11 | C225v5<br><br>SEQ ID NO:21 | SEQ ID NO:23     |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:112 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от наличия или отсутствия в гене) или SEQ ID NO:139.

<sup>++</sup>Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:33.

<sup>Δ</sup>Fc1 расположен на C-конце последовательности CH1 (SEQ ID NO:26)-шарнир (SEQ ID NO:34).

**Таблица 5В. Второй полипептид комплекса-67**

| Наименование  | Второй полипептид        |                          |                            |                              |
|---|--------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
|   | MM2                      | CM2                      | VL2                        | Константная легкая цепь (CL) |
| Второй полипептид<br><br>SEQ ID NO:31 <sup>*,++</sup> | CF41<br><br>SEQ ID NO:13 | 2008<br><br>SEQ ID NO:14 | C225v5<br><br>SEQ ID NO:22 | CL<br><br>SEQ ID NO:25       |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:113 или, в качестве альтернативы, SEQ ID NO: 115.

<sup>++</sup>Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

**Таблица 5С. Компоненты третьего полипептида комплекса-67**

| Наименование                                     | Третий полипептид |
|--|-------------------|
|  | Fc2               |
| Третий полипептид<br>SEQ ID NO:32* <sup>++</sup> | SEQ ID NO:28      |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от наличия или отсутствия в гене) или SEQ ID NO:141.<sup>++</sup>Содержит шарнир (SEQ ID NO:35), расположенный на N-конце Fc2.

**[0202]** Ниже представлены аминокислотные и полинуклеотидные последовательности, кодирующие комплекс-67. Компоненты полипептидных последовательностей обозначены следующим образом: спейсерная последовательность заключена в скобки, маскирующая последовательность подчеркнута, линкеры выделены жирным шрифтом, субстрат (т. е. расщепляемый фрагмент) выделен курсивом, а CD3-связывающий фрагмент выделен курсивом и подчеркнут.

**Первый полипептид**

[QGQSGS]VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDDHGGGSEVQLVESGGGLVQ  
PGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWWROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR  
DSKNTAYLOMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFNGNSYISYWAYWGOGTLVTVSSGGGGSGGGGSG  
GGGSOTVVTOEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQOKPGOAPRGLIGGTFKFLAP  
GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVOPEDAEEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQVQLK  
 QSGPGLVQPSQLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPF  
 SRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSAAST  
 KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL  
 YLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS  
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYG  
 STYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRK  
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSSFFLYSKLTVDKS  
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:30), необязательно с С-  
 концевым лизином (т. е. SEQ ID NO:137).

**[0203]** В некоторых аспектах первый полипептид имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120 (без спейсера, но с С-концевым лизином) или



аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120 без С-концевого лизина.

[0204] Во втором полипептиде, показанном ниже, спейсерная последовательность заключена в скобки, маскирующая последовательность подчеркнута, линкеры выделены жирным шрифтом, субстрат (т. е. расщепляемый фрагмент) выделен курсивом.

#### **Второй полипептид**

[QGQSGQG]LSCEGWAMNREQCRA**GGGSSGGS***ISSGLLSGRSDQHGGGS*QILLTQSPVIL  
SVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLS  
INSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC  
LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVY  
ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:31).

[0205] В третьем полипептиде, показанном ниже, шарнирная область выделена жирным шрифтом и подчеркнута, а остальная часть последовательности представляет собой Fc2.

#### **Третий полипептид**

**DKTHTCPPC**PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS  
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPP  
VLDSGDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID  
NO:32), необязательно с С-концевым лизином (SEQ ID NO: 36).

#### **Нуклеиновые кислоты**

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

CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGGGACCCTCCATGCACACCT  
AATACCGGCAGCTCTGGTGGCTCTGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGA  
TGATCACGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGTGGCGGACTGGTTC  
AGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAACAAAT  
ACGCCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGCCAGA  
ATCAGAAGCAAGTACAACAATACTATGCCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAG  
ATTCACCATCAGCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAACC  
TGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGTGTGCGGCACGGCAACTTCGGCAAC  
AGCTACATCAGCTACTGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCCAGATTTCTAGT  
GGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGGCGGAGGTTCTCAAACAGTGGT  
CACCCAAGAGCCTAGCCTGACCGTTTCTCCTGGCGGAACCGTGACACTGACATGCGG  
ATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAACTACCCTAATTGGGTGCAGCAGAAGC

CAGGCCAGGCTCCTAGAGGACTGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCAGGAACA  
CCAGCCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTCTGACACTTTCTGGC  
GTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGTACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATG  
GGTGTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGTAGCCAGGTCC  
AGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTGCAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACC  
TGTACCGTGTCCGGCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGC ACTGGGTTTCGACAATCT  
CCC GGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGACTA  
CAACACCCCATTCACCAGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCAGG  
TGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTC  
GGGCCCTGACCTACTATGACTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGA  
CAGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCA  
AGTCTACATCCGGTGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCG  
AGCCAGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGGCGTGCACACATTC  
CAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCTGTACTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCCA  
GCAGTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAAC  
ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCTGTCC  
TCCATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCTCCAAAG  
CCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGGA  
TGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGAAG  
TGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCAGGGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGC  
GTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTG  
CAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCA  
AGGGCCAGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATG  
ACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATC  
GCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACA ACTACAAGACAACCCCTCC  
TGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGAG  
CAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA  
ACCACTACACCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAA

[0206] В вариации этого иллюстративного полинуклеотида кодон, кодирующий С-концевой лизин, может отсутствовать (т. е. SEQ ID NO:139).

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

CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGGGCGATGAATAGAGAACA  
ATGTCGAGCCGGAGGTGGCTCGAGCGGCGGCTCTATCTTCCGGACTGCTGTCCGG  
CAGATCCGACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGACACAGTCTCCTGTCAT

ACTGAGTGTCTCCCCGGCGAGAGAGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGTCTAT  
TGGGACTAACATACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCCGCGCCTGCTGA  
TTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGC  
AGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGCGAAGATATTGCGGA  
TTATTATTGCCAGCAGAACAACAACACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAA  
GGAAGTCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA  
GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG  
AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG  
AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTG  
ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA  
TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

[0207] Второй полипептид комплекса-67 также кодируется полинуклеотидом, имеющим последовательность под SEQ ID NO:115.

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

GATAAGACCCACACCTGTCTCCATGTCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCC  
GTGTTCTGTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAA  
GTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTG  
GTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAG  
TACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTG  
AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGA  
GAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCAGGTGTACACACTGC  
CTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAG  
GGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAA  
CAACTACGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAG  
CGACCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCG  
TGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTG  
GCAAA

[0208] В вариации этого иллюстративного полинуклеотида кодон, кодирующий С-концевой лизин, может отсутствовать (т. е. SEQ ID NO:141).

[0209] В данном документе описан еще один иллюстративный активируемый НВРС по настоящему изобретению, который содержит первый полипептид, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:38 (кодируемую полинуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:142 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от наличия или отсутствия в гене) или SEQ ID NO:143); второй

полипептид, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:31 (кодируемый полинуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:113 или SEQ ID NO:115); и третий полипептид, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO:32 (кодируемый полинуклеотидной последовательностью под SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от наличия или отсутствия в гене) или SEQ ID NO:141).

**Таблица 6А. Первый полипептид комплекса-57**

| Наименование  | Первый полипептид         |                          |                          |                            |                      |
|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------|
|   | MM1                       | CM1                      | scFv                     | VH2                        | Fc1 <sup>Δ</sup>     |
| Первый полипептид<br><br>SEQ ID NO:38 <sup>*,++</sup> | H20GG<br><br>SEQ ID NO:72 | 0011<br><br>SEQ ID NO:73 | v16<br><br>SEQ ID NO:122 | C225v5<br><br>SEQ ID NO:21 | <br><br>SEQ ID NO:23 |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:160 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от наличия или отсутствия в гене) или SEQ ID NO:142.

<sup>++</sup>Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

<sup>Δ</sup>Fc1 расположен на C-конце последовательности CH1 (SEQ ID NO:26)-шарнир (SEQ ID NO:34).

**Таблица 6В. Второй полипептид комплекса-57**

| Наименование  | Второй полипептид        |                          |                            |                              |
|---|--------------------------|--------------------------|----------------------------|------------------------------|
|   | MM2                      | CM2                      | VL2                        | Константная легкая цепь (CL) |
| Второй полипептид<br><br>SEQ ID NO:31 <sup>*,++</sup> | CF41<br><br>SEQ ID NO:13 | 2008<br><br>SEQ ID NO:14 | C225v5<br><br>SEQ ID NO:22 | CL<br><br>SEQ ID NO:25       |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:113 или, в качестве альтернативы, SEQ ID NO: 115.

<sup>++</sup>Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

**Таблица 6С. Третий полипептид комплекса-57**

| Наименование | Третий полипептид |
|--------------|-------------------|
|              |                   |

|   |              |
|---|--------------|
|   | Fc2          |
| Третий полипептид<br><br>SEQ ID NO:32 <sup>*,++</sup> | SEQ ID NO:28 |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:114 (концевой лизин не присутствует в очищенном белке независимо от наличия в гене) или SEQ ID NO:141.

<sup>++</sup>Содержит шарнир (SEQ ID NO:35), расположенный на N-конце Fc2.

*Конструкция контрольного активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида к EGFR и к CD3*

**[0210]** Конструкцию контрольного активируемого биспецифического антитела, упоминаемую в данном документе как «С1106», получали, как описано в международной публикации патентной заявки № WO 2019/075405, которая включена в данный документ посредством ссылки. С1106 представляет собой конструкцию активируемого двухплечевого биспецифического антитела, состоящую из четырех полипептидов, соответствующих двум идентичным тяжелым цепям (два первых полипептида) и идентичным легким цепям (два вторых полипептида), при этом каждая тяжелая и легкая цепи образуют плечо конструкции биспецифического антитела. Биспецифическое антитело является «двухвалентным» в том смысле, что оно имеет по два связывающих домена 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 компоненты спейсер, расщепляемые фрагменты, VH к EGFR и расщепляемый фрагмент. Тяжелая цепь С1106 и первый полипептид комплекса-57 имеют идентичные компоненты - спейсер, MM/MM1 к CD3, расщепляемый фрагмент, VL/VH к CD3 (и идентичный scFv к CD3) и VH к EGFR. Что касается С1106, все четыре нацеливающихся домена (два связывающих домена к CD3 и два связывающих домена к EGFR) были замаскированы. Компоненты С1106 представлены в таблицах 7А-7В.

**Таблица 7А. Компоненты тяжелой цепи С1106**

| Наименование | Тяжелая цепь               |                       |            |                   |                 |
|--------------|----------------------------|-----------------------|------------|-------------------|-----------------|
|              | Маскирующий фрагмент к CD3 | Расщепляемый фрагмент | scFv к CD3 | Варибельный домен | Fc <sup>Δ</sup> |
|              |                            |                       |            |                   |                 |

|                                  |              |              |               |                           |                  |
|----------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------------------|------------------|
|                                  |              |              |               | тяжелой<br>цепи к<br>EGFR |                  |
| С1106                            | H20GG        | 0011         | v16           | C225v5                    | SEQ ID<br>NO:124 |
| SEQ ID<br>NO:123 <sup>*,++</sup> | SEQ ID NO:72 | SEQ ID NO:73 | SEQ ID NO:122 | SEQ ID<br>NO:21           |                  |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:125 (белок, по-видимому, теряет концевой лизин во время экспрессии/очистки).

<sup>++</sup>Содержит N-концевой спейсер (SEQ ID NO:116).

<sup>Δ</sup>Fc-домен расположен на C-конце последовательности CH1 (SEQ ID NO:26)-шарнир (SEQ ID NO:34).

**Таблица 7В. Компоненты легкой цепи С1106**

| Наименование                    | Легкая цепь                       |              |              |                            |
|---------------------------------|-----------------------------------|--------------|--------------|----------------------------|
|                                 | Маскирующий<br>фрагмент к<br>EGFR | СМ           | VL2 к EGFR   | Константная<br>легкая цепь |
| С1106 LC                        | CF41                              | 2008         | C225v5       | CL                         |
| SEQ ID<br>NO:31 <sup>*,++</sup> | SEQ ID NO:13                      | SEQ ID NO:14 | SEQ ID NO:22 | SEQ ID NO:25               |

\*Соответствующая полинуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO:113 или, в качестве альтернативы, SEQ ID NO: 115.

<sup>++</sup>Содержит N-концевой спейсер, SEQ ID NO:117.

**Пример 2. Связывание активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептида к EGFR и к CD3 с EGFR<sup>+</sup> клетками HT-29 и CD3ε<sup>+</sup> клетками Jurkat**

[0211] Чтобы подтвердить, что описанные маскирующие пептиды к EGFR и к CD3 могут ингибировать связывание активируемого гетеромультимерного биспецифического полипептидного комплекса с EGFR и CD3, проводили анализ связывания на основе проточной цитометрии.

[0212] Клетки HT-29-luc2 (Perkin Elmer, Inc., Уолтем, Массачусетс (официально Caliper Life

Sciences, Inc.) и Jurkat (клон E6-1, ATCC, TIB-152) культивировали в среде RPMI-1640 + Glutamax (Life Technologies, № по каталогу 72400-047), дополненной 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сывороткой (HI-FBS, Life Technologies, № по каталогу 10438-026). «Активированные» молекулы получали в виде активируемых НВРС, которые подвергали протеолитическому расщеплению для получения активированных форм. Также получали активируемые НВРС, которые впоследствии не подвергались протеолитическому расщеплению до начала эксперимента. Тестировали следующие полипептидные комплексы: активированный С1106 (двухвалентная двухплечевая биспецифическая конструкция), активированный комплекс-57 (НВРС) и активированный комплекс-67 (НВРС), а также активируемый (маскированный) НВРС комплекс-57, (маскированный) НВРС комплекс-67 и двухвалентная двухплечевая биспецифическая конструкция с двойной маскировкой С1106. Как отмечено в примере 1, одна комбинация CD3-связки (scFv к CD3 v16) и маски (ММ H20GG) использовалась в С1106 и комплексе-57, а другая комбинация CD3-связывающего (scFv к CD3 I2C) и маскирующего (ML15) фрагментов использовалась в комплексе-67.

**[0213]** Клетки HT29-luc2 отделяли с помощью Versene™ (Life Technologies, № по каталогу 15040-066), промывали, высевали в 96-луночные планшеты из расчета примерно 150000 клеток/луночка и повторно суспендировали в 50 мкл активированного или активируемого (маскированного) НВРС. Клетки Jurkat подсчитывали и высевали, как описано для клеток HT29-luc2. Титрование активированного (немаскированного) НВРС или активируемого (маскированного) НВРС начинали при концентрациях, указанных на фиг. 2А и 2В, с последующими 3-кратными серийными разведениями в FACS Stain Buffer + 2% FBS (BD Pharmingen, № по каталогу 554656). Клетки инкубировали при 4°C при встряхивании около 1 часа, собирали и промывали 2x200 мкл FACS Stain Buffer. Клетки повторно суспендировали в 50 мкл конъюгированного с Alexa Fluor 488 Fc к IgG человека (10 мкг/мл, Jackson ImmunoResearch) и инкубировали при 4°C при встряхивании около 1 часа. Клетки собирали, промывали и повторно суспендировали в конечном объеме 200 мкл FACS Stain Buffer, содержащем 2,5 мкг/мл 7-AAD (BD Biosciences, № по каталогу 559925). Клетки, окрашенные только вторичным антителом, использовали в качестве отрицательного контроля. Данные получали на проточном цитометре Attune NxT и рассчитывали медианную интенсивность флуоресценции (MFI) жизнеспособных клеток с помощью FlowJo® V10 (Treestar). По данным MFI, вычитаемым из фона, строили график в GraphPad Prism с использованием анализа соответствия кривых.

**[0214]** Как показано на фигурах 2А-2В, активируемые НВРС, комплекс-57 и комплекс-67, а также С1106 (маскированный), демонстрировали снижение связывания с мишенями EGFR

и CD3 по сравнению с активированным (немаскированным) комплексом-57, активированным (немаскированным) комплексом-67 и активированным (немаскированным) СИ106. Уменьшение связывания представлено сдвигом кривых связывания вправо. Эффективность маскирования EGFR в этом эксперименте по связыванию с клетками составила 105 для комплекса-57, 338 для комплекса-67 и 594 для СИ106.

***Пример 3. Биологическая активность активируемых и активированных НВРС***

[0215] Биологическую активность активируемых (маскированных) и активированных (немаскированных) НВРС оценивали с помощью анализа цитотоксичности. РВМС человека приобретали у Stemcell Technologies (Ванкувер, Канада) и совместно культивировали с линией EGFR-экспрессирующих раковых клеток HT29-luc2 (Perkin Elmer, Inc., Уолтем, Массачусетс (официально Caliper Life Sciences, Inc.)) при соотношении E (CD3+):T 5:1 в RPMI-1640 + GlutaMax, дополненной 5% инактивированной нагреванием сывороткой человека (Sigma, № по каталогу H3667). Тестировали титры активированного (немаскированного) СИ106 (контроль), активированного (немаскированного) комплекса-57 (НВРС) и активированного (немаскированного) комплекса-67 (НВРС), а также СИ106 (контроль), комплекса-57 (активируемого НВРС) и комплекса-67 (активируемого НВРС). Через 48 часов цитотоксичность оценивали с помощью ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, Мэдисон, Висконсин, № по каталогу E6130). Люминесценцию измеряли на Infinite® M200 Pro (Tecan Trading AG, Швейцария). Процентную цитотоксичность рассчитывали и наносили на график в GraphPad PRISM с анализом соответствия кривых. Потенциал активированных молекул сравнивали путем расчета соотношений EC50. Для каждой молекулы эффективность маскирования рассчитывали как соотношение EC50 интактной и активированной молекул.

[0216] Как показано на фигурах 3А и 3В, активируемые (маскированные) НВРС имеют смещенную кривую зависимости ответа от дозы по сравнению с активированными (немаскированными) НВРС.

[0217] В этом анализе данные на фигуре 3А показывают эффективность маскирования 29650 для СИ106 и эффективность маскирования 1034 для комплекса-57. Данные на фигуре 3В показывают эффективность маскирования 26537 для СИ106 и эффективность маскирования 7141 для комплекса-67. Комплекс-57, как правило, демонстрирует в 10-42 раза более низкую эффективность по сравнению с комплексом-67, исходя из нескольких экспериментов с использованием этого анализа.

***Пример 4. НВРС индуцировал регрессию установленных опухолей HT29 у мышей***

[0218] В этом примере активируемый (маскированный) НВРС комплекс-67 и контрольный



СП106 анализировали на способность индуцировать регрессию или уменьшать рост установленных ксенотрансплантатов опухолей HT29 у мышей NSG с приживленными PBMC человека.

[0219] Линию клеток рака толстой кишки человека HT29-luc2 (Perkin Elmer, Inc., Уолтем, Массачусетс)) культивировали в соответствии с установленными процедурами. Очищенные замороженные PBMC человека получали от HemaCare, Inc. (Ван-Найс, Калифорния). Мышей NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ) получали от The Jackson Laboratories (Бар-Харбор, Мэн).

[0220] В день 0 каждой мыши подкожно в правый бок инокулировали  $2 \times 10^6$  клеток HT29-luc2 в 100 мкл бессывороточной среды RPMI + GlutaMax. В день 3 вводили (в/б) предварительно замороженные PBMC от одного донора при соотношении CD3<sup>+</sup> Т-клеток и опухолевых клеток 1:1. Когда объем опухоли достигал 150-200 мм<sup>3</sup> (примерно в день 12), мышей рандомизировали, распределяли по группам обработки и вводили им дозу в/в в соответствии с таблицей 8. Объем опухоли и массу тела измеряли дважды в неделю. Уровни дозы комплекса-67 корректировали с учетом различий в молекулярной массе между СП106 и комплексом-67.

**Таблица 8 Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата HT29-luc2**

| Группа | Количество | Обработка   | Доза (мг/кг) |
|--------|------------|---|--------------|
| 1      | 8          | Носитель  | н.о.         |
| 2      | 8          | СП106<br>Двухвалентная двухплечевая<br>биспецифическая конструкция<br>с двойной маскировкой | 1,0          |
| 3      | 8          | Комплекс-67<br>Активируемый<br>(маскированный) НВРС   | 0,2          |
| 4      | 8          | Комплекс-67<br>Активируемый<br>(маскированный) НВРС   | 0,6          |
| 5      | 8          | Комплекс-67<br>Активируемый<br>(маскированный) НВРС   | 1,8          |

[0221] Как показано на фигуре 4, где представлен график зависимости объема опухоли от количества дней после первоначальной дозы обработки (день 0), комплекс-67 оказывает

зависимое от дозы влияние на рост ксенотрансплантатов опухолей HT29-luc2. Комплекс-67 продемонстрировал противоопухолевую активность, более мощную, чем контроль СИ06, при эквивалентной дозе (1 мг/кг СИ06 и 0,6 мг/кг комплекса-67);  $p = 0,0099$  RMANOVA с t-критерием Даннета).

**Пример 5. Регрессия установленных опухолей НСТ116 у мышей после обработки активированными НВРС**

[0222] Активированный (немаскированный) НВРС акт-комплекс-67 и активируемый (маскированный) НВРС комплекс-67 анализировали на способность индуцировать регрессию или уменьшать рост установленных ксенотрансплантатов опухолей НСТ116 у мышей NSG с приживленными Т-клетками человека. Клеточную линию рака толстой кишки человека НСТ116 (ATCC) культивировали в среде RPMI + Glutamax + 10% FBS в соответствии с установленными процедурами. Модель опухоли осуществляли, как описано в примере 4. Мышам вводили дозы в соответствии с таблицей 9.

**Таблица 9. Группы и дозы для исследования ксенотрансплантата НСТ116**

| Группа | Количество | Обработка   | Доза (мг/кг) |
|--------|------------|---|--------------|
| 1      | 8          | Носитель  | н.о.         |
| 2      | 8          | Акт-комплекс-67<br>(Активированный,<br>немаскированный) | 0,3          |
| 3      | 8          | Акт-комплекс-67<br>(Активированный,<br>немаскированный) | 1,0          |
| 4      | 8          | Комплекс-67<br>(Активируемый,<br>маскированный)         | 1,0          |
| 5      | 8          | Комплекс-67<br>(Активируемый,<br>маскированный)         | 3,0          |

[0223] Как показано на фигуре 5, где представлен график зависимости объема опухоли от количества дней исследования после первоначальной дозы обработки (день 0 исследования), регрессия опухоли была продемонстрирована для обеих молекул при всех тестируемых дозах.

**Пример 6. Оценивание процента мономера после очистки с помощью хроматографии на**

**керамическом гидроксипатите (СНТ)**

[0224] Контрольный С106 с двойным маскированием и активируемый (маскированный) НВРС комплекс-67 очищали с использованием колонки для хроматографии на керамическом гидроксипатите, чтобы сравнить количество димеризации при высоких концентрациях во время очистки. Это оценивали путем анализа процентного отношения мономера на каждом этапе процесса очистки.

[0225] Образцы загружали в колонку с гранулами СНТ тип I, 40 мкм (Biorad, №№ по каталогу 157-0040 и 157-0041), загруженную 20 г/л смолы. Колонку промывали буфером для уравнивания, который представлял собой буфер с 10 мМ NaPO<sub>4</sub> и 100 мМ гистидина, pH 6,5, затем элюировали во фракциях по 2 мл с помощью буфера с 10 мМ NaPO<sub>4</sub>, 100 мМ гистидина, 200 мМ лизина-HCl при pH 6,5 для С106 и буфера с 10 мМ NaPO<sub>4</sub>, 100 мМ гистидина и 100 мМ лизина-HCl при pH 6,5 для комплекса-67. С106 собирали во фракции по 2 мл, а затем пять фракций объединяли для получения элюата. Сбор пиков начинали при около 25 мЕОП (миллиединиц оптической плотности) и прекращали при около 300 мЕОП для С106. Комплекс-67 собирали в одну пробирку, при этом сбор пиков начинали при 100 мЕОП и прекращали при 500 мЕОП. Затем следовал этап с буфером для снятия белка с 500 мМ NaPO<sub>4</sub> при pH 7,0. Концентрацию белка в каждой фракции определяли количественно по поглощению УФ-излучения при длине волны 280 нм. Процент мономера в каждой фракции определяли с помощью SE-HPLC (аналитической эксклюзионной хроматографии) на основе общей площади пика.

[0226] На стадии связывания при хроматографии белок сначала связывается с верхней частью колонки и движется вниз по колонке только по мере заполнения верхних участков. Это приводит к высокой концентрации молекул в колонке. Мультимерные формы С106 и комплекс-67 связываются с колонкой с более высокой аффинностью, чем мономерные формы, и поэтому для их полного удаления из колонки требуется более сильный буфер. Поэтому, при элюировании колонки более слабым буфером с последующим снятием белка более сильным буфером элюаты характеризуются более низким процентным отношением димера (более высоким процентным отношением мономера), чем снятия. Как показано в таблице 10, при прогоне комплекса-67 (активируемого НВРС) процент мономера в элюате увеличился на 7,6%, при этом высокомолекулярный материал оставался в колонке до этапа снятия, что привело к 77% извлечению в элюат. Это сравнимо с прогоном С106, в результате которого процент мономера в элюате снизился на 5,4% до 65,0%, даже несмотря на то, что большее количество димерного материала (только 30,6% мономера) оставалось в колонке до снятия, что привело к 81% извлечению в элюат.

**Таблица 10. Результаты хроматографии СНТ**

| Молекула    | % мономера<br>в загрузке | % мономера<br>в элюате | %<br>извлечения в<br>элюат | % мономера<br>в снятии | %<br>извлечения в<br>снятии |
|-------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Комплекс-67 | 90,9                     | 98,5                   | 77                         | Нет данных             | Нет данных                  |
| С1106       | 70,4                     | 65,0                   | 81                         | 30,6                   | 9                           |

[0227] Эти результаты свидетельствуют о том, что комплекс-67 не подвергается дополнительной димеризации при высокой концентрации в колонке, что приводит к удалению почти всех высокомолекулярных соединений с 98,5% мономера в элюате по сравнению с только 65% для С1106. Что касается С1106, в объединенном элюате больше высокомолекулярных соединений, чем в исходной загрузке. Однако С1106 не может быть очищен ни этим, ни каким-либо другим способом хроматографии в режиме связывания/элюирования из-за димеризации, которая происходит, когда С1106 подвергается высоким концентрациям в колонке.

[0228] Улучшенное поведение комплекса-67 позволяет очищать высокомономерный комплекс-67 с помощью хроматографии СНТ типа 1.

**Пример 7. Оценивание зависимой от концентрации димеризации путем концентрирования в центробежном концентраторе**

[0229] Очищенные с помощью белка А и SEC препараты комплекса-67 (активируемого НВРС), комплекса-57 (активируемого НВРС) и контроля С1106 сравнивали по проценту мономера после центрифужного концентрирования и инкубации на протяжении ночи при самой высокой концентрации.

[0230] Комплекс-67, комплекс-57 и С1106 очищали с помощью белка А и SEC, а затем составляли в буфере с низким рН (10 мМ ацетат, 100 мМ лизин, рН 6). Образцы разводили 1:15 в PBS (753-45-01) и концентрировали с помощью Pierce™ Protein Concentrators PES 10K MWCO 0,5 мл (Thermo Fisher, № по каталогу 88513) путем центрифугирования при 14000 оборотов в минуту в течение 2 минут при каждой концентрации. Наиболее концентрированные образцы хранили на протяжении ночи и оценивали на предмет процента мономера. Полученные концентрации и процентное содержание мономера представлены в таблице 11 и на фигуре 6.

**Таблица 11. Процент мономерного активируемого НВРС по сравнению с концентрацией общего белка**

| Комплекс-67 |            | Комплекс-57 |            | С1106 в PBS |   |
|-------------|------------|-------------|------------|-------------|---|
| 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     |
| На протяжении<br>ночи | 98,9 | На протяжении<br>ночи | 97,9 |       |          |

**[0231] На фигуре 6** и в таблице 11 показано, что при увеличении концентрации в комплекс-67 сохраняется высокое процентное отношение мономера (98% - 99%) и очень низкая агрегация в растворе. Это сравнимо с СП06, который демонстрирует заметную димеризацию в зависимости от концентрации при увеличении концентрации. Комплекс-57 показал очень слабую зависимость димеризации от концентрации с сохранением стабильного процентного отношения мономера при увеличении концентрации. Комплекс-67 также сохранял процентное отношение мономера во время инкубации на протяжении ночи при самой высокой концентрации, демонстрируя стабильность процентного отношения мономера при более высокой концентрации.

***Пример 8. Сравнение альтернативных аналогичных структур***

**[0232]** Готовили наборы активируемых биспецифических конструкций, нацеленных на CD3 и опухоль-ассоциированный антиген, антиген А, в одном наборе, и CD3 и опухоль-ассоциированный антиген, антиген В, в другом наборе. Ни антиген А, ни антиген В не представляли собой EGFR. Каждый набор содержал активируемые НВРС по настоящему изобретению и другие активируемые одновалентные биспецифические конструкции с двойной маскировкой, имеющие те же компоненты, что и активируемые НВРС (т. е. тот же scFv к CD3, те же последовательности VH и VL к опухоль-ассоциированному антигену, тот же маскирующий фрагмент к CD3 и маскирующий фрагмент к опухоль-ассоциированному антигену) в структурных расположениях, обозначенных как альтернатива (формат) 1 и альтернатива (формат) 2, которые отличаются друг от друга, а также от структуры активируемых НВРС по настоящему изобретению. Свойства каждой конструкции в каждом наборе характеризовали, как описано в примерах 9 и 10.

***Пример 9. Сравнение одновалентных биспецифических форматов с двойной маскировкой***

**[0233]** Биологические активности и маскирующие эффективности биспецифических конструкций к CD3 и к антигену А, описанных в примере 8 (т. е. в форматах активируемых

НВРС по настоящему изобретению - альтернатива (формат) 1 и альтернатива (формат) 2), определяли с помощью анализов цитотоксичности. Клетки Овсар-8 культивировали совместно с Т-клетками человека в соотношении 1:10 и обрабатывали сериями разведений молекул, приведенных в таблицах 12, 13 и 14. Через 48 часов цитотоксичность оценивали с помощью Cell Titer Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой молекулы эффективность маскирования рассчитывали как соотношение EC<sub>50</sub> интактной и активированной молекул. Аминокислотные последовательности scFv к CD3, маскирующего фрагмента к CD3, VH и VL к опухоль-ассоциированному антигену, маскирующего фрагмента к опухоль-ассоциированному антигену и двух расщепляемых фрагментов были одинаковыми для трех разных форматов (т. е. активируемого НВРС по настоящему изобретению, альтернативы (формата) 1 и альтернативы (формата) 2). Эффективности маскирования молекул активируемого НВРС, альтернативы 1 и альтернативы 2, а также соответствующих немаскированных контрольных молекул представлены в таблицах 12 (маскирующий фрагмент ML21 к антигену А и маскирующий фрагмент ML15 к CD3), 13 (маскирующий фрагмент ML24 к антигену А и маскирующий фрагмент ML15 к CD3) и 14 (маскирующий фрагмент ML34 к антигену А и маскирующий фрагмент ML15 к CD3). Как показано ниже, активируемый НВРС демонстрировал самую высокую эффективность маскирования в каждом случае. Поскольку компоненты были одинаковыми в каждом типе формата, результаты позволяют предположить, что улучшение эффективности маскирования активируемых НВРС связано с особым расположением компонентов в этом формате активируемого НВРС по сравнению с альтернативой (форматом) 1 и альтернативой (форматом) 2.

**Таблица 12. Эффективность маскирования в зависимости от формата - маскирующих фрагментов ML21 и ML15 - антигена А**

| <b>Формат</b>                      | <b>Молекула</b> | <b>Маскирующий фрагмент к антигену А</b> | <b>Маскирующий фрагмент к CD3</b> | <b>Эффективность маскирования</b> |
|------------------------------------|-----------------|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Контроль в виде альтернативы 1 и 2 | Комплекс-165    | Немаскированный                          | Немаскированный                   | 1                                 |
| Альтернатива 2                     | Комплекс-211    | ML21                                     | ML15                              | 69                                |
| Альтернатива 2                     | Комплекс-271    | ML21                                     | ML15                              | 68                                |

|   |                  |                 |                 |             |
|---|------------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Альтернатива<br>2                           | Комплекс-<br>272 | ML21            | ML15            | 97          |
| Альтернатива<br>2                           | Комплекс-<br>273 | ML21            | ML15            | 119         |
|   |                  |                 |                 |             |
| Альтернатива<br>1                           | Комплекс-<br>349 | ML21            | ML15            | 339         |
| Альтернатива<br>1                           | Комплекс-<br>350 | ML21            | ML15            | 237         |
| Альтернатива<br>1                           | Комплекс-<br>351 | ML21            | ML15            | 492         |
| Альтернатива<br>1                           | Комплекс-<br>352 | ML21            | ML15            | 391         |
| Альтернатива<br>1                           | Комплекс-<br>338 | ML21            | ML15            | 110         |
|   |                  |                 |                 |             |
| Контроль в<br>виде<br>активируемого<br>НВРС | Комплекс-<br>355 | Немаскированный | Немаскированный | 1           |
| Активируемый<br>НВРС                        | Комплекс-<br>353 | ML21            | ML15            | <b>1316</b> |

**Таблица 13. Эффективность маскирования в зависимости от формата - маскирующих фрагментов ML24 и ML15 - антигена А**

| <b>Формат</b>                               | <b>Молекула</b>          | <b>Маскирующий<br/>фрагмент к<br/>антигену А</b> | <b>Маскирующий<br/>фрагмент к CD3</b> | <b>Эффективность<br/>маскирования</b> |
|---|--------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Контроль в<br>виде<br>альтернативы<br>1 и 2 | Комплекс-<br>165         | Немаскированный                                  | Немаскированный                       | 1                                     |
| Альтернатива<br>2                           | <b>Комплекс-<br/>275</b> | ML24   | ML15                                  | <b>112</b>                            |

|                                    |              |                 |                 |      |
|------------------------------------|--------------|-----------------|-----------------|------|
| Контроль в виде активируемого НВРС | Комплекс-355 | Немаскированный | Немаскированный | 1    |
| Активируемый НВРС                  | Комплекс-429 | ML24            | ML15            | 8274 |
| Активируемый НВРС                  | Комплекс-430 | ML24            | ML15            | 6460 |
| Активируемый НВРС                  | Комплекс-432 | ML24            | ML15            | 7754 |

**Таблица 14. Эффективность маскирования в зависимости от формата - маскирующих фрагментов ML34 и ML15 - антигена А**

| Формат                             | Молекула     | Маскирующий фрагмент к антигену А | Маскирующий фрагмент к CD3 | Эффективность маскирования |
|------------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Альтернатива 2                     | Комплекс-419 | ML34                              | ML15                       | <b>н.о.</b>                |
| Альтернатива 1                     | Комплекс-426 | ML34                              | ML15                       | 248                        |
| Контроль в виде активируемого НВРС | Комплекс-355 | Немаскированный                   | Немаскированный            | 1                          |
| Активируемый НВРС                  | Комплекс-354 | ML34                              | ML15                       | 2491                       |

[0234] В таблице 13 активируемый НВРС демонстрировал 15-кратное увеличение маскирующей эффективности по сравнению с альтернативой 2 и 2-4-кратное увеличение маскирующей эффективности по сравнению с альтернативой 1. В таблице 13 НВРС показал эффективность маскирования 6460-8274, в то время как альтернатива 2 имела ME 112. В таблице 13 активируемый НВРС показал 68-кратное увеличение маскирующей эффективности по сравнению с альтернативой 2 и 10-кратное увеличение маскирующей



эффективности по сравнению с альтернативой 1. В таблице 14 НВРС имел эффективность маскирования 2491, в то время как альтернатива 1 имела МЕ 248. Согласно таблице 15 комплекс-463 готовили на основании альтернатив 1 и 2 и проводили два анализа комплекса-463 в альтернативе 1. НВРС показал эффективность маскирования в диапазоне 1500-2100 МЕ или примерно 6-10-кратное увеличение МЕ для НВРС по сравнению с альтернативой 1 и примерно 47-кратное по сравнению с альтернативой 2.

[0235] Эти результаты позволяют предположить, что улучшение эффективности маскирования, по-видимому, связано с особым структурным расположением активируемого НВРС по настоящему изобретению.

**Пример 10. Цитотоксичность активируемого НВРС и альтернативных биспецифических молекул в линии клеток СНО**

[0236] Эффективность маскирования и цитотоксичность определяли для молекул активируемого НВРС, альтернативы 1 и альтернативны 2, каждая из которых нацелена на CD3 и антиген В. Клетки СНО, экспрессирующие антиген В, культивировали совместно с РВМС человека в соотношении 1:10 и обрабатывали сериями разведений молекул, указанных в таблице 15. После 48-часовой инкубации цитотоксичность определяли с помощью Cytotox Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой молекулы эффективность маскирования рассчитывали как соотношение EC<sub>50</sub> интактной и активированной молекул. Результаты представлены ниже в таблице 15.

**Таблица 15. Эффективность маскирования и цитотоксичность – антиген В**

| Формат                              | Молекула     | Маскирующий фрагмент к антигену В | Маскирующий фрагмент к CD3 | EC <sub>50</sub> | Эффективность маскирования |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------|------------------|----------------------------|
| Контроль в виде альтернативы 1 и 2* | Комплекс-164 | н.о.                              | н.о.                       | 1,48-4,0         | н.о.                       |
| Альтернатива 1**                    | Комплекс-463 | PC7                               | ML15                       | 6167-7366        | 1542-2188                  |
| Альтернатива 2                      | Комплекс-231 | PC7                               | ML15                       | 473              | 319                        |
| Контроль в виде активируемого НВРС  | Комплекс-342 | н.о.                              | н.о.                       | 3,1              | н.о.                       |

|                      |                 |     |      |                    |          |
|----------------------|-----------------|-----|------|--------------------|----------|
| Активируемый<br>НВРС | Контроль-<br>39 | PC7 | ML15 | > 10e <sup>5</sup> | > 15000X |
|----------------------|-----------------|-----|------|--------------------|----------|

<sup>\*,\*\*,†</sup>Несколько экспериментов

[0237] Активируемый НВРС показал наилучшие результаты. На фиг. 7 показана цитотоксичность как процент лизиса клеток по действию маскированного активируемого НВРС (контроля-39), контроля в виде немаскированного активируемого НВРС (комплекса-342), активируемого полипептида в альтернативе (формате) 2 (комплекса-231) и контроля в виде немаскированной альтернативы (формата) 2 (комплекса-164).

[0238] Результаты показывают, что расположение компонентов в специфической структуре активируемых НВРС, описанных в данном документе, по-видимому, коррелирует с более высокой эффективностью маскирования, по сравнению с эффективностями маскирования активируемых одновалентных биспецифических конструкций, имеющих те же компоненты, расположенные в альтернативных форматах.

[0239] Величина эффективностей маскирования, наблюдаемых для активируемого НВРС к CD3 и к антигену А и активируемого НВРС к CD3 и к антигену В, согласуется с таковой, наблюдаемой для комплекса-67 и комплекса-57. Эти положительные результаты, по-видимому, не зависят от конкретных используемых нацеливающихся доменов/аминокислотных последовательностей.

***Пример 11. Безопасность и эффективность активируемой конструкции к EGFR и к CD3 TCB C1107***

[0240] В этом исследовании безопасность и эффективность C1107, конструкции TCB к EGFR и к CD3, имеющей тот же структурный формат, что и контроль C1106 (описанный выше), оценивали на доклинических моделях для оценки терапевтического потенциала для лечения EGFR-экспрессирующих опухолей. C1107 получали, как описано в международной публикации патентной заявки № WO 2019/075405, которая включена в данный документ посредством ссылки. Конструкция TCB C1107 альтернативно упоминается в данном примере как «рекрутирующее Т-клетки биспецифическое антитело» или «TCB».

**Способы**

**Исследования на животных**

[0241] Все исследования на животных проводили в соответствии с правилами Институционального комитета по уходу и использованию животных, регулирующими учреждение, в котором проводили каждое исследование. Исследования с использованием ксенотрансплантации мышей проводились компанией CytomX Therapeutics, Inc (CytomX), а исследования на яванских макаках проводились компанией Altasciences (Эверетт, Вашингтон). Все исследования на животных проводили в соответствии с правилами,

установленными Законом США о благополучии животных и руководством по уходу и использованию лабораторных животных.

#### Материалы

**[0242]** Все ТСВ и другие конструкции, описанные в данном исследовании, включая С1107, С1128, С1020, С1011, С1040, С1048 и С1104, создавались компанией CytomX Therapeutics, Inc. (см. WO 2016/014974 и WO 2019/075405). С1107, С1128, С1020, С1011, С1040 и С1104 имеют тот же структурный формат, что и С1106. С1048 соответствует активированному С1011. Активированные ТСВ создавали путем обработки *in vitro* активатором плазминогена урокиназного типа (uPA) с последующей очисткой с помощью SEC (Desnoyers 2013). Клетки HT29-Luc2 получали от Caliper Life Sciences (Хопкингтон, Массачусетс), а клетки НСТ116 и Jurkat получали из Американской коллекции типовых культур (АТСС). Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) человека получали в виде криоконсервированных флаконов с клетками от отдельных доноров от компании NemaCare Corporation (Нортридж, Калифорния), AllCells (Аламида, Калифорния) или STEMCELL Technologies (Сиэтл, Вашингтон). Мышей NOD.Cg-Prkcdscid Il2rg tm1Wjl/SzJ (NSG) получали от компании Jackson Laboratories (Сакраменто, Калифорния).

#### Клеточные анализы связывания

**[0243]** Клетки HT29 и Jurkat поддерживали в полной среде. Клетки HT29 собирали с помощью буфера для диссоциации клеток Versene™. Клетки центрифугировали при 250 x g в течение 5-10 минут и повторно суспендировали в FACS-буфере, содержащем 2% FBS (BD Pharmingen). Клетки высевали при 150000/лунка в 96-луночные планшеты с V-образным дном и обрабатывали комплексом-07 или активированным протеазой С1104 *in vitro* при различных концентрациях, полученных путем 3-кратных серийных разведений в FACS-буфере, начиная с 1,5 мкМ С1107 для клеток HT29 и 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 FACS-буфером и повторно суспендировали в 10 мкг/мл вторичного антитела к Fc человека Alexa Fluor 647. Затем клетки инкубировали с защитой от света в течение 30-60 минут при 4°C, дважды промывали FACS-буфером, повторно суспендировали в FACS-буфере, содержащем 7-AAD, и анализировали на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec). Данные о средней интенсивности флуоресценции корректировали с учетом фонового сигнала вторичного антитела, строили график в Graphpad Prism и рассчитывали значения EC50.

#### Анализ цитотоксичности

**[0244]** НСТ116-Luc2 или HT29-Luc2 высевали в 96-луночный белый планшет с плоским дном, обработанный культурой ткани (Costar, № 3917), при 10000 клеток/лунка в RPMI +

5% сыворотки человека. РВМС человека незадолго размораживали и дважды промывали с помощью RPMI + 5% сыворотки человека и 100000 РВМС добавляли в RPMI + 5% сыворотки человека в лунки, содержащие НСТ116-Luc2 или НТ29-Luc2. Затем в лунки добавляли активированный протеазой ТСВ или СИ107 в различных концентрациях, полученных 3-кратными серийными разведениями. Контрольные лунки содержали необработанные клетки-мишени + эффекторные клетки, только клетки-мишени, только эффекторные клетки или только среду. Затем планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение примерно 48 часов. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega, № E6120) и устройства для считывания планшетов Tecan. Процент цитотоксичности рассчитывали следующим образом:  $(1 - (\text{RLU эксперимента} / \text{среднее значение RLU без обработки})) * 100$ .

#### *In vitro* анализ активации Т-клеток и цитокинов

**[0245]** Активацию Т-клеток измеряли по индукции экспрессии CD69 в РВМС, совместно культивированных с клетками НТ29-Luc2 или НСТ116-Luc2. Клетки НТ29-Luc2 или НСТ116-Luc2 высевали при 10000 клеток/лунка в неадгезивный планшет с U-образным дном. РВМС человека размораживали, дважды промывали с помощью RPMI, содержащей сыворотку, и добавляли 100000 РВМС/лунка в планшеты с опухолевыми клетками. Дубликаты планшетов, содержащие только РВМС, высевали для компенсационных контролей проточной цитометрии. Трехкратные серийные разведения СИ107, активированного СИ107 или СИ128 готовили в среде и добавляли к высеянным клеткам. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 16 часов. Для подготовки к проточному цитометрическому анализу планшеты центрифугировали при 250 x g в течение 10-15 минут. Супернатант удаляли для анализа цитокинов, в каждую лунку добавляли блок для Fc (Human TruStain FcX, BioLegend) и планшеты инкубировали в течение 10 минут. В лунки добавляли коктейли антител, содержащие антитело к CD45 FITC (BioLegend), антитело к CD3 Pacific blue (BioLegend), антитело к CD8a APC (BioLegend) и антитело к 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 FACS-буфером и повторно суспендировали в FACS-буфере, содержащем 7-AAD. Флуоресценцию измеряли с использованием проточного цитометра Attune и собирали 15000 событий, представляющих РВМС.

**[0246]** Для анализа цитокинов использовали анализы с планшетами Meso Scale Discovery U-PLEX (Meso Scale Diagnostics, Роквилл, Мэриленд). Планшеты U-PLEX готовили в соответствии с протоколом производителя для оценки уровней MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2 и IFN- $\gamma$ . Образцы супернатанта, собранные из НТ29-Luc2 или НСТ116-Luc2, совместно

культивированных с РВМС и обработанных маскированным (активируемым) С1107, активированным (также упоминаемым в данном документе как «акт-») С1107 или С1128, разбавляли, добавляли в планшет и обрабатывали в соответствии с инструкциями производителя.

#### *Исследования эффективности in vivo*

**[0247]** В экспериментах *in vivo* эффекты ТСВ на рост опухоли измеряли у мышей, несущих опухоли HT29-Luc2 или НСТ116 и приживленные Т-клетки человека, полученные в результате внутрибрюшинной (в/б) инъекции РВМС человека. Два миллиона клеток HT29-Luc2 или НСТ116 подкожно инъецировали в 100 мкл бессывороточной RPMI в бок самкам мышей NSG в день 0. Замороженные РВМС от одного донора незадолго размораживали и вводили путем в/б инъекции в день 3 в 100-200 мкл бессывороточной среды RPMI + GlutaMax. РВМС предварительно характеризовали на предмет процентного отношения CD3+ Т-клеток, и количество РВМС, используемых для введения *in vivo* было основано на соотношении CD3+ Т-клеток и опухолевых клеток 1:1. Измерения опухоли в примерно день 12 использовали для рандомизации мышей перед внутривенным (в/в) введением дозы ТСВ, контрольного препарата или среды-носителя. Животным еженедельно в течение 3 недель вводили дозу тестируемых препаратов, а объем опухоли и массу тела регистрировали дважды в неделю. Для исследований *in vivo* использовали активированный ТСВ С1104. Конструкция С1104 отличается от С1107 только расщепляемым линкером, используемым для связки маскирующего фрагмента CD3 с scFv. После активации протеазой *in vitro* для полного удаления маскирующих фрагментов активированный С1104 идентичен активированному С1107 и может быть использован для оценки активности активированного С1107, и последующие исследования цитотоксичности *in vitro* подтвердили, что активность активированного С1104 такая же, как у активированного С1107.

#### *Исследования безопасности на отличных от человека приматах*

**[0248]** Самцы яванского макака получали медленную в/в болюсную инъекцию тестируемых препаратов в день 1 или один раз в дни 1 и 15, в зависимости от тестируемого препарата. После введения тестируемого препарата клинические наблюдения проводили дважды в день. Образцы крови собирали в различные моменты времени после введения дозы для анализа высвобождения цитокинов, химического состава сыворотки, гематологии и токсикокинетических показателей. Анализ цитокинов проводили в образцах сыворотки с использованием набора Life Technologies Monkey Magnetic 29-Plex Panel Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс). Для токсикокинетического анализа образцы перерабатывали в плазму и хранили при от -60 до -86°C до отправки на анализ в АИТ

Bioscience (Индианаполис, Индиана) или CytomX. Концентрацию тестируемых препаратов в плазме крови измеряли с помощью ELISA с использованием антиидиотипического антитела захвата и антитела захвата к IgG человека (Fc). Токсикокинетический анализ проводился компанией Northwest PK Solutions с использованием некомпартментного анализа с использованием Phoenix WinNonlin v6.4 (Certara, Принстон, Нью-Джерси).

## **Результаты**

[0249] СИ107 разрабатывали как дважды маскированную (активируемую) двухплечевую двухвалентную биспецифическую молекулу, содержащую домены к EGFR и к CD3. СИ107 создавали с использованием полученного из цетуксимаба антитела с полученным из SP34 scFv к CD3ε, слитым с N-концом тяжелой цепи. СИ107 имеет Fc-домен IgG1 человека с мутациями, которые заглушают функцию Fc. Для создания СИ107 специфический маскирующий пептид для компонента антитела к EGFR был слит с N-концом легкой цепи с использованием линкера расщепляемого протеазой субстрата, фланкированного гибкими пептидными линкерами, богатыми Gly-Ser, как описано ранее (Desnoyers 2013). Маскирующий пептид, специфический в отношении компонента к CD3, аналогичным образом добавляли к scFv с использованием линкера расщепляемого протеазой субстрата. СИ107 нарушает функцию Fc-эффектора, чтобы минимизировать перекрестное связывание с клетками, экспрессирующими FcγR. Конструкция предназначена для максимального связывания с мишенью и активности в богатом протеазой опухолевом микроокружении при минимальном связывании и активности в нормальных тканях. Все сравнительные ТСВ, используемые в данном примере, содержат EGFR- и CD3-связывающие домены, маскирующие фрагменты и линкерные пептиды с варьирующей степенью расщепляемости. СИ101 и СИ040 представляют собой версии первого поколения СИ104 и СИ107. Молекулы СИ104 и СИ107 содержат оптимизированный scFv к CD3, расщепляемые линкеры следующего поколения и дополнительные мутации сайленсинга Fc. СИ104 и СИ107 имеют одинаковые маскирующие фрагменты, EGFR- и CD3-связывающие домены, но отличаются линкером протеазы CD3; однако после активации протеазой активированный ТСВ является таким же. СИ128 использовали в качестве ненацеленного контроля, в котором EGFR-связывающий домен заменен нерелевантным антителом (антителом к RSV).

*Маскирование ухудшает связывание с EGFR на поверхности клеток.*

[0250] Чтобы оценить, ухудшает ли маскирование EGFR-связывающего домена связывание с EGFR, экспрессированным на поверхности клеток, измеряли связывание СИ107 и сравнительных активированных конструкций ТСВ (т. е. акт-ТСВ) с клетками HT29 и НСТ116, экспрессирующими EGFR.

[0251] Клетки-мишени инкубировали с возрастающими концентрациями СИ107 или

сравнительных активированных конструкций и связывание оценивали с помощью проточной цитометрии. Как показано на фигурах 8А и 8В, присутствие маскирующего фрагмента EGFR в С1107 значительно ослабляло связывание с EGFR, экспрессированным на поверхности клеток, по сравнению с активированным ТСВ С1107. Активированные конструкции ТСВ связывались с клетками HT29 с расчетной Kd 0,17 нМ, тогда как Kd для связывания С1107 составляла 91,28 нМ, что представляет собой более чем 500-кратное снижение связывания по сравнению с активированным ТСВ. Аналогичные результаты получали с использованием клеток HCT116. Также оценивали связывание С1128, ненацеленного контрольного ТСВ, который содержит тот же модуль к CD3, что и С1107, но не обладает нацеливанием на EGFR. Этот контроль не связывался с клетками HT29 и HCT116 (см. фигуры 8А и 8В).

*Маскирование ухудшает связывание с CD3 на поверхности лимфоцитов.*

**[0252]** Чтобы определить, нарушает ли маскировка связывающего домена к CD3 связывание С1107 с CD3 на поверхности лимфоцитов, измеряли связывание С1107 и активированного С1107 (т. е. активированного ТСВ) с клетками Jurkat. Как показано на фигуре 8С, активированный ТСВ связывался с клетками Jurkat с Kd 0,62 нМ. Однако связывание С1107 не было обнаружено, и Kd не могла быть рассчитана. Активированный контрольный С1128 связывался с клетками Jurkat с такой же аффинностью, что и активированный ТСВ.

**[0253]** В совокупности эти данные показывают, что двойное маскирование связывающих доменов к EGFR и к CD3 в С1107 ослабляет связывание с клетками, экспрессирующими EGFR или CD3.

*Маскирование ослабляет цитотоксичность и активацию Т-клеток в совместной культуре с РВМС.*

**[0254]** Чтобы выяснить, может ли нацеливание С1107 на EGFR привести к противоопухолевым эффектам, проводили анализы цитотоксичности *in vitro*. Экспрессирующие люциферазу клетки HT29 или HCT116 совместно культивировали с РВМС человека и инкубировали с возрастающими концентрациями С1107, активированного ТСВ или ненацеленного контроля С1128. Через 48 часов культивирования жизнеспособность клеток HCT116-Luc2 или HT29-Luc2 измеряли с помощью люциферазного анализа. Как показано на фигуре 9А, обработка контрольным С1128 привела к минимальной цитотоксичности для клеток HCT116-Luc2, совместно культивированных с РВМС, что свидетельствует о том, что для цитотоксической активности необходимо вовлечение как EGFR, так и CD3. Напротив, и маскированный С1107, и активированный С1107 (т. е. акт-ТСВ) оказывали цитотоксические эффекты на

клетки НСТ116-Luc2. Однако активированный ТСВ приводил к цитотоксичности при гораздо более низких концентрациях по сравнению с маскированной формой, при этом значения EC50 составляли 0,44 пМ и 7297 пМ, соответственно. Аналогичные результаты наблюдали и в клетках НТ29-Luc2, при этом значения EC50 составляли 0,25 пМ для активированного ТСВ против 3678 пМ для СИ107 (фигура 9B). Таким образом, двойное маскирование доменов к EGFR и к CD3 в СИ107 приводило к примерно 15000-кратному снижению цитотоксической активности, опосредованной РВМС в отсутствие активации протеазой.

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

[0255] Чтобы определить, приводит ли СИ107 к активации Т-клеток, уровень 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 вовлечения TCR/CD3 экспрессия CD69 быстро индуцируется на поверхности Т-лимфоцитов, и CD69 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 измеряли уровень экспрессии CD69 с помощью проточной цитометрии. Как показано на фигуре 9C, СИ107 приводил к индукции экспрессии CD69 на CD8+ Т-клетках, совместно культивированных с клетками НСТ116-Luc2, с EC50 14178 пМ. В отличие от этого, обработка активированным СИ107 приводила к индукции CD69 с EC50 7,65 пМ, что отражает примерно 18000-кратный сдвиг кривой активации Т-клеток по сравнению с СИ107. Активацию Т-клеток не наблюдали при использовании не нацеленного на EGFR контрольного СИ128, что указывает на то, что для активации Т-клеток недостаточно вовлечения только CD3. Аналогично, обработка РВМС от того же донора, совместно культивированных с клетками НТ29-Luc2, приводила к индукции CD69 со значениями EC50 65971 пМ для маскированного СИ107 против 8,75 пМ для активированного ТСВ, что отражает примерно 7500-кратную разницу в способности индукции CD69 (фигура 9D).

*Обработка с помощью СИ107 приводит к высвобождению цитокинов.*

[0256] Для дальнейшей оценки активации Т-клеток в РВМС, совместно культивированных с EGFR-экспрессирующими раковыми клетками, при обработке с помощью ТСВ, высвобождение цитокинов оценивали после обработки с помощью СИ107, активированного ТСВ (т. е. активированного СИ107) или контрольного СИ128. Уровни IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, MCP-1 и TNF- $\alpha$  измеряли через 16 часов после обработки возрастающими концентрациями ТСВ.



Как показано на фигуре 10А-10Е, обработка с помощью СИ107 при концентрациях в диапазоне 104 пМ приводила к высвобождению каждого из измеряемых цитокинов. Напротив, активированный ТСВ приводил к высвобождению цитокинов при обработке концентрациями в диапазоне 1-100 пМ. Эти результаты в целом совпадали у различных донорских клеток РВМС и линиях раковых клеток (НСТ116-Luc2 против НТ29-Luc2).

**[0257]** В совокупности эти данные показывают, что двойное маскирование связывающих доменов к EGFR и к CD3 в СИ107 ослабляет активацию Т-клеток в отсутствие активации протеазой.

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

**[0258]** Противоопухолевую эффективность ТСВ оценивали *in vivo*. Иммунокомпromетированных мышей, несущих опухоли НТ29-Luc2 и приживленные РВМС человека, обрабатывали один раз в неделю в течение 3 недель средой-носителем (PBS) или 0,3 мг/кг ТСВ, содержащих линкеры с различной чувствительностью к протеазам (СИ11, СИ40), нерасщепляемый линкер (СИ20), или немаскированным биспецифическим терапевтическим СИ48. Предполагали, что СИ20 будет обладать минимальной противоопухолевой активностью из-за нерасщепляемого линкера, в то время как немаскированный СИ48, как предполагали, будет обладать максимальной эффективностью. СИ11 и СИ40, оба из которых содержат фрагменты, маскирующие EGFR и CD3, имеют различную чувствительность к протеазам из-за разных линкерных пептидов; при этом чувствительность к протеазам СИ40 выше, чем у СИ11.

**[0259]** Как показано на фигуре 11А, обработка немаскированным ТСВ СИ48 приводила к регрессиям опухолей в пределах одной недели после начала обработки. Аналогично, обработка маскированными СИ11 и СИ40 также приводила к регрессии или стазису опухоли; при этом регрессия, наблюдаемая с СИ40, коррелирует с большей расщепляемостью линкеров в этой молекуле по сравнению с СИ11. В отличие от этого, обработка СИ20, содержащим нерасщепляемые линкеры, не влияла на рост опухоли, что указывает на то, что расщепляемость протеазами необходима для противоопухолевой активности ТСВ *in vivo*.

**[0260]** Чтобы определить, коррелирует ли противоопухолевая эффективность, опосредованная тестируемыми ТСВ, с присутствием Т-клеток в опухолях, опухоли собирали через одну неделю после того, как животные получали 1 мг/кг маскированного ТСВ или активированного ТСВ, и проводили иммуногистохимию на предмет CD3. Как показано на фигуре 11В, минимальные количества Т-клеток наблюдали в опухолевой ткани после обработки средой-носителем или нерасщепляемым СИ20. Напротив, при обработке

с помощью ТСВ СИ040 или активированным *in vitro* протеазой ТСВ СИ048 наблюдали увеличение количеств Т-клеток. Опять же, ТСВ с большей чувствительностью к протеазе (СИ040) приводил к увеличению количеств Т-клеток в опухоли.

**[0261]** В совокупности эти данные позволяют предположить, что ТСВ могут приводить к появлению внутриопухолевых Т-клеток и противоопухолевой эффективности *in vivo*, что коррелирует с чувствительностью к протеазному расщеплению маскирующих фрагментов EGFR- и CD3-связывающих доменов.

*Обработка с помощью СИ107 индуцирует зависимость от дозы регрессии установленных ксенотрансплантатов опухолей.*

**[0262]** Оценивали эффекты СИ107 на рост опухоли *in vivo*. Мышам NSG подкожно имплантировали клетки HT29 с последующей в/б инъекцией РВМС и обеспечивали приживание РВМС в течение примерно 11 дней. Затем животных обрабатывали средой-носителем, 0,5 мг/кг СИ107 или 1,5 мг/кг СИ107 один раз в неделю в течение 3 недель. Как показано на фигуре 12А, обработка с помощью 0,5 мг/кг СИ107 приводила к стазису опухоли, 1,5 мг/кг СИ107 - к регрессии опухоли, начиная с примерно одной недели после начала обработки.

**[0263]** Эффективность СИ107 *in vivo* также оценивали на опухолях НСТ116. После приживания опухоли и РВМС животных обрабатывали средой-носителем, 0,3 мг/кг СИ107, 1 мг/кг СИ107 или 0,3 мг/кг активированного ТСВ. Как показано на фигуре 12В, 0,3 мг/кг СИ107 задерживало рост опухоли НСТ116, в то время как 1 мг/кг СИ107 и 0,3 мг активированного ТСВ приводили к сходным уровням регрессии и стазису опухоли на протяжении всего периода обработки.

**[0264]** Эти данные показывают, что СИ107 индуцирует зависимость от дозы ингибирование роста и регрессии опухоли в ксенотрансплантатах опухолей HT29 и НСТ116, и что противоопухолевая активность в 3 раза большей дозы СИ107 аналогична активности активированного ТСВ.

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

**[0265]** 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, после чего проводили клинические наблюдения за животными. У животных, получавших обработку 0,18 мг/кг активированного ТСВ, наблюдались серьезные клинические эффекты, включая рвоту, отсутствие аппетита, бледность, сгорбленную позу и истощение, при этом неблагоприятные эффекты отмечали уже через 2 часа и до 10 дней после введения дозы. У

животных, получавших обработку 0,06 мг/кг активированного ТСВ, наблюдали умеренные и транзистные клинические эффекты, включая рвоту и сгорбленную позу в день 1 после введения дозы; на основании быстрого разрешения этих эффектов дозу 0,06 мг/кг определяли как максимально переносимую дозу (MTD) для активированного ТСВ. Напротив, у животных, получавших обработку 2,0 мг/кг С1107, наблюдали лишь транзистные и слабые клинические эффекты (рвоту в день 2), а у животных, получавших обработку 0,6 мг/кг С1107, не наблюдали никаких побочных эффектов. У животных, получивших обработку 4,0 мг/кг С1107, наблюдали умеренные клинические эффекты (включая рвоту через 4, 8 и 24 часа после введения дозы и отсутствие аппетита в день 2). Животное, получившее обработку 6,0 мг/кг С1107, было найдено мертвым в день 2. Клинические признаки, отмеченные перед смертью, включали сгорбленную позу, бледный вид, рвоту и жидкий кал после введения дозы. Поэтому 4,0 мг/кг расценивали как MTD для С1107. В целом, маскированный С1107 обеспечивал более чем 60-кратное улучшение переносимости по сравнению с активированным ТСВ.

**[0266]** Также исследовали уровни цитокинов после обработки активированным С1107 или маскированным С1107. Как показано на фигуре 13, уровни IL-6 (13A) и IFN- $\gamma$  (13B) были повышены у животных, получавших активированный ТСВ, через 8 часов после введения дозы. В отличие от этого, минимальные изменения IL-6 или IFN- $\gamma$  наблюдали после обработки с помощью 0,6 мг/кг или 2,0 мг/кг С1107; повышенные уровни этих цитокинов наблюдали только после обработки с помощью 4,0 мг/кг С1107. В соответствии с клиническими наблюдениями, С1107 изменяет зависимый от дозы ответ высвобождения цитокинов более чем в 60 раз.

**[0267]** Анализ химических показателей сыворотки крови также продемонстрировал различия между активированным ТСВ и С1107. Как показано на фигуре 13C, обработка активированным ТСВ приводила к зависимым от дозы повышениям уровня аспаратаминотрансферазы (AST), маркера гепатоклеточного повреждения, через 48 часов после введения дозы. В отличие от этого, после обработки с помощью С1107 на любом из уровней переносимой дозы изменений AST не наблюдали, что свидетельствует об улучшении переносимости этого маскированного ТСВ.

**[0268]** Чтобы выяснить, влияет ли маскирование EGFR- и CD3-связывающих доменов на фармакокинетические показатели, измеряли концентрации в плазме активированного ТСВ (т. е. активированного С1107) и маскированного С1107 после введения дозы. Как показано на фигуре 13D, активированный ТСВ быстро выводился из циркуляции в течение 24 часов после введения дозы. В отличие от этого, С1107 сохранялся в плазме крови в течение 7 дней после введения дозы, что позволяет предположить, что маскирование может увеличить

воздействие по сравнению с активированным TCB. AUC(0-7) после однократного введения активированного TCB при 0,06 мг/кг составила 0,04 дня\*нМ (n = 1), тогда как AUC(0-7) после введения СИ107 при 2 мг/кг составила 331,7 дня\*нМ (в среднем n = 3), демонстрируя более чем 8000-кратное увеличение переносимого воздействия.

[0269] Это свидетельствует о том, что улучшения переносимости и фармакокинетических показателей, наблюдаемые при использовании маскированного СИ107, соответствуют ожидаемому ослаблению связывания с EGFR и CD3 в нормальном тканевом окружении.

**Таблица 16. Таблица последовательностей**

| SEQ ID NO: | ОПИСАНИЕ               | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|------------|------------------------|---|
| 1          | MM1 –<br>комплекс-67   | VSTTCWWDPPCTPNT   |
| 2          | CM1                    | GLSGRSDDH   |
| 3          | CDR1 VH<br>Комплекс-67 | KYAMN   |
| 4          | CDR2 VH<br>Комплекс-67 | RIRSKYNNYATYYADSVKD   |
| 5          | CDR3 VH<br>Комплекс-67 | HGNFGNSYISYWAY  |
| 6          | CDR1 VL<br>Комплекс-67 | GSSTGAVTSGNYPN  |
| 7          | CDR2 VL<br>Комплекс-67 | GTKFLAP   |
| 8          | CDR3 VL<br>Комплекс-67 | VLWYSNRWV   |
| 9          | VH1<br>Комплекс-67     | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNKYAMNWVRQ<br>APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN<br>TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQ<br>GTLVTVSS |
| 10         | VL1<br>Комплекс-67     | QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWWVQQ<br>KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSVQ<br>PEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL                     |
| 11         | scFv                   | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNKYAMNWVRQ   |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ                               | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|--|--|
|               | Комплекс-67                            | APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN<br>TAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQ<br>GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGT<br>VTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLA<br>PGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNR<br>WVFGGGTKLTVL |
| 12            | Линкер                                 | GSSGGSGGSG   |
| 13            | MM2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57      | LSCEGWAMNREQCRA  |
| 14            | CM2                                    | ISSGLLSGRSDQH  |
| 15            | CDR1 VH2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | NYGVH  |
| 16            | CDR2 VH2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | VIWSSGNTDYNTPFTS   |
| 17            | CDR3 VH2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | ALTYDYEFAY   |
| 18            | CDR1 VL2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | RASQSIGTNIH  |
| 19            | CDR2 VL2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | YASESIS  |
| 20            | CDR3 VL2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | QQNNNWPTT  |
| 21            | Домен VH2<br>Комплекс-67               | QVQLKQSGPLVQPSQSLTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP<br>GKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFK<br>MNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSA   |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|--|---|
|               | Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)                             |   |
| 22            | Домен VL2<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль) | QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNG<br>SPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADY<br>YCQQNNNWPTTFGAGTKLELK  |
| 23            | Fc1<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57                              | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT<br>LPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG  |
| 24            | Fc1 с<br>концевым<br>лизином                                   | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT<br>LPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 25            | Домен CL<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)  | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW<br>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK<br>HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 26            | CH1-IgG1<br>человека-<br>комплекс-67<br>Комплекс-57            | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC<br>NVNHKPSNTKVDKVKV  |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ  | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|---|---|
| 27            | CH1-IgG4<br>человека  | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYT<br>CNVDHKPSNTKVDKRVDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP<br>KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV<br>HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV<br>SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVS<br>LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFF<br>LYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP<br>G  |
| 28            | Fc2 без C-<br>концевого<br>лизина<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57 | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT<br>LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG   |
| 29            | Fc2 с C-<br>концевым<br>лизином                                 | PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT<br>LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGK  |
| 30            | Первый<br>полипептид<br>Комплекс-67                             | [ <u>QQQSGS</u> ] <u>VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGLSGRSDD</u><br><u>HGGGSEVOLVESGGGLVOPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNW</u><br><u>VROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNT</u><br><u>AYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVT</u><br><u>VSSGGGSGGGGSGGGGSOTVVTOEPSLTVSPGGTVTLTCS</u><br><u>STGAVTSGNYPNWVOOKPGOAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGS</u><br><u>LLGGKAALTLSGVOPEDAEEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL</u><br><b>GGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSL</b> SITCTVSGFSLTNYGVH<br>WVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSK<br>SQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGL<br>VTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP<br>VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|--|--|
|               |  | TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG                                      |
| 31            | Второй<br>полипептид<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57<br>СИ06<br>(контроль) | [QGQSGQG] <u>LSCEGWAMNREQCRA</u> <b>GGGSSGGS</b> <i>ISSGLLSGRSDQHGGGS</i> QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIK YASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 32            | Третий<br>полипептид<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57                       | <b><u>DKTHTCPPC</u></b> PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPG   |
| 33            | Спейсер  | QGQSGS   |
| 34            | Шарнир-1<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57<br>СИ06<br>(контроль)             | EPKSCDKTHTCPPC   |
| 35            | Шарнир-2<br>Комплекс-67<br><br>Комплекс-57                               | DKTHTCPPC  |
| 36            | Третий<br>полипептид с   | DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR   |



| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|--|---|
|               | концевым<br>лизином<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57                            | CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 37            | комплекс-<br>67/комплекс-<br>57-2 <sup>й</sup><br>полипептид<br>без спейсера | LSCEGWAMNREQCRAGGGSSGGSISSGLLSGRSDQHGGGS<br>QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNG<br>SPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADY<br>YCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS<br>GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK<br>SFNRGEC   |
| 38            | Комплекс-57<br>1 <sup>ый</sup><br>полипептид<br>без концевого<br>лизина      | QGQSGSGYLWGCEWNCGGITGSSGGSGGGLSGRSDD<br>HGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN<br>WVQQTGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTI<br>TGAQADDESYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSG<br>GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST<br>YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR<br>FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYV<br>SWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSL<br>ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY<br>NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALT<br>YYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br>LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<br>CDKTHCPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTY<br>RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br>WESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG<br>NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG |
| 39            | Линкер   | GGGS  |
| 40            | Линкер   | (GGGS) <sub>n</sub>   |

| <b>SEQ ID NO:</b> | <b>ОПИСАНИЕ</b> | <b>ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ</b> |
|-------------------|-----------------|---------------------------|
| 41                | Линкер          | (GSGGS) <sub>n</sub>      |
| 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          | GGGSGGGSGGGGS             |
| 57                | Линкер          | GSSGGSGGSGG               |
| 58                | Линкер          | GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS  |
| 59                | Линкер          | GSTSGSGKPGSSEGST          |
| 60                | Линкер          | SKYGPPCPPCPAPEFLG         |
| 61                | Линкер          | GGSLDPKGGGGS              |
| 62                | Линкер          | PKSCDKTHTCPPCPAPELLG      |
| 63                | Линкер          | GKSSGSGSESKS              |
| 64                | Линкер          | GSTSGSGKSSEGKG            |
| 65                | Линкер          | GSTSGSGKSSEGSSTKG         |
| 66                | Линкер          | GSTSGSGKPGSGEGSTKG        |
| 67                | MM1             | MMYCGGNEVLCGPRV           |
| 68                | MM1             | GYRWGCEWNCGGITT           |
| 69                | MM1             | MMYCGGNEIFCEPRG           |
| 70                | MM1             | GYGWGCEWNCGGSSP           |
| 71                | MM1             | MMYCGGNEIFCGPRG           |
| 72                | MM1             | GYLWGCEWNCGGITT           |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ                                   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ |
|---------------|--|--------------------|
| 73            | CM1<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57<br>СИ106 | 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           |
| 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   | AVGLLAPPGLSGRSDDH  |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ  | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|---|---|
| 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   |
| 112           | Комплекс-67<br>Полинуклеоти<br>д,<br>кодирующий<br>первый<br>полипептид | CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGG<br>GACCCTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGC<br>TCTGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGAT<br>CACGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGT<br>GGCGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGC<br>TGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCATG<br>AACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATG<br>GGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAACAACCTATGCCA<br>CCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCA<br>GCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATG<br>AACAACCTGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTIONGT<br>GTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTAC<br>TGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCT<br>AGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGG<br>CGGAGGTTCTCAAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCT<br>GACCGTTTCTCCTGGCGGAACCGTGACACTGACATGCGG<br>ATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAACTACCCTAA<br>TTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGAC<br>TGATCGGCGGCACAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCAG<br>CCAGATTCAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTC<br>TGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGT<br>ACTATTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTTCG |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|----------|--|
|               |          | GCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGT<br>AGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTG<br>CAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCC<br>GGCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGC ACTGGGTTCGA<br>CAATCTCCCGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATT<br>TGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCCATTCACC<br>AGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCA<br>GGTGTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGATAC<br>CGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTATGA<br>CTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGAC<br>AGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCC<br>ACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGC<br>CGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTCCCGAGCC<br>AGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGG<br>CGTGACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCT<br>GTA CTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCAGCAGCTC<br>TCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAA<br>GCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCA<br>AGAGCTGCGATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTG<br>CTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCC<br>TCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC<br>TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGA<br>TCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGA<br>AGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCAGGGAACAGT<br>ACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGC<br>TGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC<br>AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAA<br>ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCA<br>GGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCA<br>AGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCT<br>ACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGAC<br>AGCCCGAGAACA ACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGA<br>AGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCG |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|--|---|
|               |  | TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGC<br>TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC<br>CAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAA  |
| 113           | Полинуклеоти<br>д,<br>кодирующий<br>второй<br>полипептид | CAAGGCCAGTCTGGCCAAGGTCTTAGTTGTGAAGGTTGG<br>GCGATGAATAGAGAACAATGTTCGAGCCGGAGGTGGCTC<br>GAGCGGCGGCTCTATCTCTTCCGGACTGCTGTCCGGCAG<br>ATCCGACCAGCACGGCGGAGGATCCCAAATCCTGCTGAC<br>ACAGTCTCCTGTCATACTGAGTGTCTCCCCGGCGAGAG<br>AGTCTCTTTCTCATGTCGGGCCAGTCAGTCTATTGGGACT<br>AACATACACTGGTACCAGCAACGCACCAACGGAAGCCC<br>GCGCCTGCTGATTAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGG<br>CATTCCGAGCCGCTTTAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGA<br>TTTTACCCTGAGCATTAACAGCGTGGAAAGCGAAGATAT<br>TGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACAACACTGGCCGAC<br>CACCTTTGGCGCGGGCACCAAACCTGGAACCTGAAACGTAC<br>GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT<br>GAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTG<br>CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG<br>AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA<br>GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA<br>GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTAC<br>GAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA<br>GGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG<br>GAGAGTGT |
| 114           | Полинуклеоти<br>д,<br>кодирующий<br>третий<br>полипептид | GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAA<br>CTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCCTCCAAAGC<br>CTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCTGAAGTG<br>ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAA<br>GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAC<br>AACGCCAAGACAAAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCAG<br>CACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA<br>GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGT   |

| SEQ ID NO: | ОПИСАНИЕ    | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|------------|-------------|--|
|            |             | ССААСААГГСССТГССТГСТСТАТССААААССАТССА<br>ГСААГГССАААГГССАГССТАГАГААССССАГГТГАТ<br>АССТГССТССААГССГГГАААГАТГАССААААССА<br>ГГТГТСССТГАССТГССТГГТСАААГГССТТСТАССТТСС<br>ГАТАТССГССГТГГААТГГГААГССААТГГАССАГССССА<br>ГААССААСТАССАССАССАССТССАГТГГТГАССАГСС<br>АССГТСТАТТТСТТТСТГАТАССАГССТГАССГТГГАССА<br>АГАССАГАТГГССАГСАААГССААССГТТТАССТГАСС<br>ГТГАТССАССАГГСССТССАССАССАССАССАССА<br>ГТСССТГАСССТГТТСТТТССААА   |
| 115        | Легкая цепь | СААГГАССААТСТГГАССАГСССТГАССТГТГААГГСТ<br>ГСССАТАГАТАААГАААААССАГТГССААГСТГСССГССГГАТ<br>СТТСТГСССГСТСТАТСТТТСТТГГАСТГТГАСССГССА<br>ГААГССГАТСААССАГСССГГААГГСТТТАССАТССТГСТ<br>АССАССАГСССССГТАТСТТГТГТГТГТГТГТГТГТГТГТ<br>АГАСТГТССТТАССАГТТАААССАГССАССАГТССАТССГСС<br>АССААТАТССАСТГГАТАССАССАССАССАССАССАССА<br>ССССАГАСТГТГАТТАААССАССАССАССАССАССАССА<br>СГССАТССССАССАГАТТТТТТСТГССАСССГСТТТГССА<br>ССАСТТТАСССТГАССАТТААССАССАССАССАССАССА<br>АТАТССССАСТТАСТТАССАССАССАССАССАССАССА<br>ССАССАССТТТГГАСССГССАССАААССАССАССАССА<br>АГААССАГТГСССГСТТАССАССАССАССАССАССАССА<br>ТССГАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССА<br>ТГСССТГТГААССАССАССАССАССАССАССАССАССА<br>САСТГГААААГТГГАССАССАССАССАССАССАССАССА<br>ССАААССАГТТТГТГАССАССАССАССАССАССАССА<br>ССТАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССА<br>ГАСТАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССА<br>ССАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССАССА<br>СССГСССГГАСТГТ |
| 116        | спейсер     | QGQSGS   |

| SEQ ID NO: | ОПИСАНИЕ                         | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|------------|----------------------------------|---|
| 117        | спейсер                          | QGQSGQG   |
| 118        | спейсер                          | QGQSGS  |
| 119        | спейсер                          | QGQSGQG   |
| 120        | Первый полипептид без спейсера   | <p><u>VSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGSGGGLSGRSDDHGGGSE</u><br/> <u>VQLVESGGGLVOPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGK</u><br/> <u>GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS</u><br/> <u>SKNTAYLOMN</u><br/> <u>NLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGG</u><br/> <u>GSGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVT</u><br/> <u>SGNYPNWVQOKPGOAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGK</u><br/> <u>AALTLSGVOPEDAEEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGS</u><br/> QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSP<br/> GKGLEWLGVIWSSGNTDYNT PFTSRLSINKDNSK SQVFFK<br/> MNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLVTVSAA<br/> STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br/> SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICN<br/> VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL<br/> FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV<br/> EVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDNLNGKEYKC<br/> KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQ<br/> VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LKSDGS<br/> FFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSL<br/> SPGK</p> |
| 121        | пустая строка                    |   |
| 122        | scFv к CD3 V16 Комплекс-57 CII06 | <p>QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ<br/> TPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQ<br/> ADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGS<br/> GGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYAMN<br/> WRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR<br/> DDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTR HGNFGNSYVSWFA<br/> YWGQGLVTVSS</p>   |
| 123        | CII06 - тяжелая цепь             | <p>QGQSGSGYLWGCEWNCGGITTGSSGGSGGSGGGLSGRSDD<br/> HGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN</p>  |



| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|--|---|
|               | CRF41-2008-<br>C225v5Fcmt4-<br>h20GG-0011-<br>v16sc-H-N                            | WVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTI<br>TGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSG<br>GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFST<br>YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR<br>FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGNSYV<br>SWFAYWGQGLTVTVSSGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLS<br>ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY<br>NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALT<br>YYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br>LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<br>CDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC<br>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY<br>RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAK<br>GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV<br>ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 124           | Fc Mut 4   | PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP<br>EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYT<br>LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 125           | Тяжелая цепь<br>CII06 -<br>CRF41-2008-<br>C225v5Fcmt4-<br>h20GG-0011-<br>v16sc-H-N | CAAGGCCAGTCTGGATCCGGTTATCTGTGGGGTTGCGAG<br>TGGAATTGCGGAGGGATCACTACAGGCTCGAGCGGTGG<br>CAGCGGTGGCTCTGGTGGTCTGAGCGGCCGTTCCGATGA<br>TCATGGCGGCGGTTCTCAAACGTAGTAACTCAAGAACC<br>AAGCTTCTCCGTCTCCCCTGGGGGAACAGTCACACTTAC<br>CTGCCGAAGTAGTACAGGTGCTGTTACGACCAGTAACTA<br>TGCCAATTGGGTACAACAACGCCTGGTCAGGCTCCGCG<br>CGGATTGATAGGAGGCACGAATAAACGGGCACCCGGTG<br>TCCCGGACAGATTCAGCGGAAGCATACTCGGTAATAAG<br>GCAGCTCTTACTATCACTGGGGCCCAAGCTGATGATGAA   |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|----------|---|
|               |          | AGTGATTATTATTGTGCGCTCTGGTACAGCAACCTCTGG<br>GTGTTTGGGGGTGGCACGAACTTACTGTCTTGGGCGGC<br>GGCGGATCAGGGGGAGGTGGCTCTGGAGGAGGAGGCTC<br>AGAAGTCCAACCTGGTCTGAATCCGGGGGAGGGCTCGTAC<br>AGCCGGGTGGGTCCCTCAAACCTCTCTTGTGCGGCCTCAG<br>GGTTTACCTTCAGTACATACGCGATGAATTGGGTCCGGC<br>AGGCCAGTGGGAAAGGGCTCGAATGGGTAGGACGAATC<br>CGATCAAAATACAACAACCTACGCTACTTATTACGCTGAT<br>TCCGTGAAGGACAGATTACACAATATCCC GCGACGATAGC<br>AAGAATACGGCATACTTCAGATGAATTCTCTTAAACT<br>GAGGATACCGCTGTGTATTACTGCACAAGACATGGTAAT<br>TTTGAAACTCATATGTCTCTTGGTTCGCTTATTGGGGAC<br>AGGGCACGTTGGTTACCGTGTCTAGCGGAGGTGGTGGAT<br>CCCAGGTGCAGCTGAAACAGAGCGGCCCGGGCCTGGTG<br>CAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGC<br>GGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCGTGCATTGGGTGCGC<br>CAGAGCCCGGGCAAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGAT<br>TTGGAGCGGCGGCAACACCGATTATAACACCCCGTTTAC<br>CAGCCGCCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCC<br>AGGTGTTTTTTTAAAATGAACAGCCTGCAAAGCCAGGATA<br>CCGCGATTTATTATTGCGCGCGCGCGCTGACCTATTATG<br>ATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCTGGTGA<br>CCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCC<br>CCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG<br>CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC<br>CGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG<br>GCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC<br>TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA<br>GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA<br>AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC<br>AAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA<br>GCACCTGAATTTGAAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC<br>CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ                                       | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|--|---|
|               |  | CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA<br>AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT<br>GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC<br>AGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG<br>TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG<br>TGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCTCAATCGAG<br>AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC<br>ACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGAC<br>CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT<br>STATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG<br>GGCAGCCGGAGAACAАCTACAAGACCACGCCTCCCGTG<br>CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC<br>ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT<br>CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA<br>CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAАА |
| 126           | Линкер   | (GGGGS) <sub>n</sub>  |
| 127           | Линкер   | GGGSSGGS  |
| 128           | CDR1 VH1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | TYAMN   |
| 129           | CDR2 VH1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | RIRSKYNNYATYYADSVKD   |
| 130           | CDR3 VH1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | HG NFGNSYVSWFAY   |
| 131           | CDR1 VL1                                       | RSSTGAVTTSNYAN  |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ  | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|---|---|
|               | Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)                            |   |
| 132           | CDR2 VL1<br>Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)                | GTNKRAP   |
| 133           | CDR3 VL1<br>Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)                | ALWYSNLWV   |
| 134           | Домен VH1<br>Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)               | EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSTYAMNWVRQ<br>ASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN<br>TAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQ<br>GTLVTVSS  |
| 135           | Домен VL1<br>Комплекс-57<br>CII06<br>(контроль)               | QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ<br>TPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQ<br>ADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL   |
| 136           | Комплекс-57<br>Первый<br>полипептид с<br>концевым<br>лизинном | QGQSGSGYLWGCEWNCGGITGSSGGSGGSGGLSGRSDD<br>HGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYAN<br>WVQQTPGQAPRGLIGGTNKRAPGVPDRFSGSILGNKAALTI<br>TGAQADDESDYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSG<br>GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFST<br>YAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDR<br>FTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNFGNSYV<br>SWFAYWGQGTLVTVSSGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSL<br>ITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVWSSGNTDY<br>NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALT<br>YYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG<br>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG<br>LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<br>CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ  | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|---|--|
|               |   | <p>VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPC<u>EEQY</u>GSTY<br/> RCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK<br/> GQPREPQVYTLPPSR<u>KE</u>MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE<br/> WESNGQPENNYKTTPPV<u>LK</u>SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG<br/> NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>   |
| 137           | <p>Первый<br/> полипептидн<br/> ый комплекс-<br/> 67 с концевым<br/> лизином</p>                                    | <p>[GQSGSVSTTCWWDPPCTPNTGSSGGSGGGSGGLSGRSDDH<br/> <u>GGGSEVOLVESGGGLVOPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWW</u><br/> <u>ROAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTA</u><br/> <u>YLOMNNLKTEDTAVYYCVRHGNGNSYISYWAYWGOGLTVTVS</u><br/> <u>SGGGGSGGGGSGGGGSOTVVTOEPSLTVSPGGTVLTCGSST</u><br/> <u>GAVTSGNYPNWVOOKPGOAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSL</u><br/> <u>LGGKAALTLSGVOPEDAEEYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLG</u><br/> GGGSQVQLKQSGPLVQPSQLSITCTVSGFSLTNYGVHW<br/> VRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKS<br/> QVFFKMNSLQSQDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTV<br/> TVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV<br/> TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT<br/> QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG<br/> GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW<br/> YVDGVEVHNAKTKPC<u>EEQY</u>GSTYRCVSVLTVLHQDWLNG<br/> KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKE<br/> MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV<br/> LKSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY<br/> TQKSLSLSPGK</p> |
| 138           | пустая строка   |  |
| 139           | <p>Комплекс-67<br/> Полинуклеоти<br/> д,<br/> кодирующий<br/> 1<sup>ый</sup><br/> полипептид<br/> без концевого</p> | <p>CAAGGACAATCTGGCTCTGTGTCCACCACCTGTTGGTGG<br/> GACCCTCCATGCACACCTAATACCGGCAGCTCTGGTGGC<br/> TCTGGCGGAAGCGGAGGACTGTCTGGCAGATCCGATGAT<br/> CACGGCGGAGGATCTGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGT<br/> GGCGGACTGGTTCAGCCTGGCGGATCTCTGAAACTGAGC<br/> TGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAACAAATACGCCATG<br/> AACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTTGAATG</p>   |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|----------|---|
|               | лизина   | GGTCGCCAGAATCAGAAGCAAGTACAACAАСТАТGССА<br>ССТАСТАСGССGACAGCGTGAAGGACAGATTACСATCA<br>GCCGGGACGACAGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATG<br>ААСААСТGAAAACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGT<br>GTGCGGCACGGCAACTTCGGCAACAGCTACATCAGCTAC<br>TGGGCCTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTTCT<br>AGTGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGTGGAAGTGGCGG<br>CGGAGGTTCTCAACAGTGGTCACCCAAGAGCCTAGCCT<br>GACCGTTTCTCCTGGCGGAACCGTGACACTGACATGCGG<br>ATCTTCTACAGGCGCCGTGACCAGCGGCAACTACCCTAA<br>TTGGGTGCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCTCCTAGAGGAC<br>TGATCGGCGGCACAAAGTTTCTGGCTCCCGGAACACCAG<br>CCAGATTСAGCGGTTCTCTGCTCGGAGGAAAGGCCGCTC<br>TGACACTTTCTGGCGTGCAGCCTGAGGATGAGGCCGAGT<br>АСТАТTGCGTGCTGTGGTACAGCAACAGATGGGTGTTСG<br>GCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGAGGTGGCGGT<br>AGCCAGGTCCAGCTGAAACAATCTGGACCCGGACTCGTG<br>CAGCCAAGCCAGAGCCTGTCTATCACCTGTACCGTGTCC<br>GGCTTCAGCCTGACCAATTACGGCGTGCACTGGGTTCGA<br>CAATCTCCCGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGAGTGATT<br>TGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCCATTСACC<br>AGCAGACTGAGCATCAACAAGGACAACAGCAAGTCCCA<br>GGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCCAGGATAC<br>CGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCTACTATGA<br>CTACGAGTTTGCCTACTGGGGACAGGGAACCCTCGTGAC<br>AGTGTCTGCTGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCC<br>АСТGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTGGAACAGC<br>CGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTACTTTCCCGAGCC<br>AGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGACATCTGG<br>CGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCGGCCT<br>GТАCTCTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCAGCAGCTC<br>TCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAA<br>GCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCA |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|--|---|
|               |  | AGAGCTGCGATAAGACACACACCTGTCCTCCATGTCCTG<br>CTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTTCTGTTCCC<br>TCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCC<br>TGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGA<br>TCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGACGGCGTGGA<br>AGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCAGGAAACAGT<br>ACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGC<br>TGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGC<br>AAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAA<br>ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCA<br>GGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGAGATGACCA<br>AGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCT<br>ACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGAC<br>AGCCCGAGAACAАCTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGA<br>AGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCG<br>TGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAAACGTGTTTCAGC<br>TGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC<br>CAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC |
| 140           | 3 <sup>ий</sup><br>полипептид<br>с С-концевым<br>лизином<br>Комплекс-67<br>Комплекс-57                                 | DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV<br>VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYR<br>CVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG<br>QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE<br>SNGQPENNYDTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNV<br>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK   |
| 141           | Полинуклеоти<br>д,<br>кодирующий<br>3 <sup>ий</sup><br>полипептид<br>без кодона,<br>кодирующего<br>С-концевой<br>лизин | GATAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAA<br>CTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGC<br>СТАAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTG<br>ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGATCCCGAA<br>GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCAC<br>AACGCCAAGACAАAGCCCTGCGAGGAACAGTACGGCAG<br>CACCTACAGATGCGTGTCCGTGCTGACAGTGCTGCACCA<br>GGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGT<br>CCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCA   |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ  | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|---|--|
|               | Комплекс-67<br>Комплекс-57  | GCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGAGAACCCCAGGTGTAC<br>АСАСТGCCTCCAAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCA<br>GGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCC<br>GATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGA<br>GAACAАСТАСGACACCACACCTCCAGTGCTGGACAGCG<br>ACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCGACCTGACCGTGGACA<br>AGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTСAGCTGCAGC<br>GTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAA<br>GTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGC   |
| 142           | Комплекс-57<br>Полинуклеоти<br>д,<br>кодирующий<br>1 <sup>ый</sup><br>полипептид<br>(без кодона<br>для С-<br>концевого<br>лизина) | САAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAG<br>TGGAATTGTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGG<br>AAGCGGAGGATCTGGTGGACTGTCTGGCAGATCCGATG<br>ATCATGGCGGGCGGATCCCAGACCGTGGTCACACAAGAG<br>CCTAGCTTCTCCGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTG<br>ACATGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAAC<br>TACGCCAATTGGGTGCAGCAGACCCCTGGACAGGCTCCT<br>AGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGG<br>CGTCCCAGATAGATTCAGCGGCTCTATCCTGGGCAACAA<br>GGCCGCACTGACAATCACAGGCGCCCAGGCCGATGACG<br>AGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGT<br>GGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGGCG<br>GAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGTGGA<br>TCTGAAGTGCAGCTGGTGGAACTCTGGCGGAGGACTTGTT<br>CAGCCAGGCGGCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCC<br>GGCTTCACCTTTAGCACCTACGCCATGAACTGGGTCCGA<br>CAGGCCTCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTСGGACGGAT<br>CAGAAGCAAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCG<br>ACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGAC<br>AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAA<br>AACCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGACACG<br>GCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACT<br>GGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCG |



| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|----------|--|
|               |          | GAGGTTCTCAGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGAC<br>TGGTGCAGCCTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTACCG<br>TGTCCGGCTTCTCCCTGACCAATTACGGCGTGC ACTGGG<br>TTCGACAATCCCCAGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGA<br>GTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCC<br>ATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACAAGGACAACAGCA<br>AGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCC<br>AGGATACCGCCATCTATTA CTGCGCTCGGGCCCTGACCT<br>ACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACCC<br>TCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCG<br>TTTTCCCACTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTG<br>GAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTA CTTTC<br>CCGAGCCAGTGACCGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTG<br>ACATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCT<br>AGCGGCCTGTA CTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCC<br>AGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTG<br>AACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT<br>GGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCTGTCTCTCC<br>ATGTCCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTT<br>CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC<br>AGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCC<br>CACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTCGAC<br>GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGA<br>GGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCT<br>GACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTA<br>TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGA<br>GAACCCCAAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGA<br>GATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA<br>GGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG<br>CAATGGACAGCCCGAGAACA ACTACAAGACAACCCCTC<br>CTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCA<br>AGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAAC |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ                                       | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|--|--|
|               |  | GTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC<br>CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGC |
| 143           | CDR3 VH1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | HGFGNSYVSWFAY  |
| 144           | CDR1 VL1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | GSSTGAVTSGYYPN   |
| 145           | CDR1 VL1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | RSSGAVTTSNYAN  |
| 146           | CDR3 VL1<br>Комплекс-57<br>CI106<br>(контроль) | ALWYSNRWV  |
| 147           | Маскирующи<br>й фрагмент к<br>CD3              | VYYCGGNESLCGERR  |
| 148           | Маскирующи<br>й фрагмент к<br>CD3              | WYSGGCEAFCGILSS  |
| 149           | Маскирующи<br>й фрагмент к<br>CD3              | FMCQQRMWGNEFCHQ  |
| 150           | Маскирующи                                     | YSLWGCEWGC DRGLY   |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ   | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|--|--|
|               | й фрагмент к CD3   |  |
| 151           | Маскирующие<br>й фрагмент к CD3  | YSACEMFGEVECCFC  |
| 152           | Маскирующие<br>й фрагмент к CD3  | GYSGGCEFRQYQLYS  |
| 153           | Маскирующие<br>й фрагмент к CD3  | KFCHCGYYCRVCTLK  |
| 154           | Маскирующие<br>й фрагмент к CD3  | LGCNNLWGNEFCHPV  |
| 155           | Маскирующие<br>й фрагмент к CD3  | GHPCWGNESYCHTHS  |
| 156           | CM   | ALAHGLF  |
| 157           | CM   | APRSALAHGLF  |
| 158           | CM   | ISSGLLSGRSNI   |
| 159           | CM   | LSGRSNI  |
| 160           | Полинуклеотид комплекса-57, кодирующий 1 <sup>ый</sup> полипептид (с кодоном для С-концевого лизина) | CAAGGACAATCTGGATCCGGCTATCTGTGGGGCTGCGAG<br>TGGAATTGTGGCGGCATCACAACAGGCTCTAGCGGCGG<br>AAGCGGAGGATCTGGTGGACTGTCTGGCAGATCCGATG<br>ATCATGGCGGCGGATCCCAGACCGTGGTCACACAAGAG<br>CCTAGCTTCTCCGTGTCTCCTGGCGGCACAGTGACCCTG<br>ACATGCAGATCTTCTACAGGCGCCGTGACCACCAGCAAC<br>TACGCCAATTGGGTGCAGCAGACCCCTGGACAGGCTCCT<br>AGAGGACTGATCGGCGGCACCAACAAAAGAGCCCCTGG<br>CGTCCCAGATAGATTCAGCGGCTCTATCCTGGGCAACAA<br>GGCCGCACTGACAATCACAGGCGCCCAGGCCGATGACG<br>AGAGCGATTACTATTGCGCCCTGTGGTACAGCAACCTGT |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ   |
|---------------|----------|--|
|               |          | GGGTTTTCGGCGGAGGCACCAAGCTGACAGTTCTTGCGC<br>GAGGCGGAAGTGGTGGTGGCGGATCTGGTGGCGGTGGA<br>TCTGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTTGTT<br>CAGCCAGGCGGCTCTCTGAAGCTGTCTTGTGCCGCCTCC<br>GGCTTACCTTTAGCACCTACGCCATGAACTGGGTCCGA<br>CAGGCCTCTGGCAAAGGCCTGGAATGGGTCTGGACGGAT<br>CAGAAGCAAGTACAACAATTACGCCACCTACTACGCCG<br>ACAGCGTGAAGGACAGATTCACCATCAGCCGGGACGAC<br>AGCAAGAACACCGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGAA<br>AACCGAGGACACCGCCGTGTAATACTGCACCAGACACG<br>GCAACTTCGGCAACAGCTATGTGTCTTGGTTTGCCTACT<br>GGGGCCAGGGCACACTGGTCACAGTTAGTTCTGGCGGCG<br>GAGGTTCTCAGGTGCAGCTGAAACAGTCTGGCCCTGGAC<br>TGGTGCAGCCTAGCCAGTCTCTGAGCATCACCTGTACCG<br>TGTCCGGCTTCTCCCTGACCAATTACGGCGTGCCTGGG<br>TTCGACAATCCCCAGGCAAGGGACTCGAATGGCTGGGA<br>GTGATTTGGAGCGGCGGCAACACCGACTACAACACCCC<br>ATTCACCAGCAGACTGTCCATCAACAAGGACAACAGCA<br>AGTCCCAGGTGTTCTTCAAGATGAACTCCCTGCAGAGCC<br>AGGATACCGCCATCTATTACTGCGCTCGGGCCCTGACCT<br>ACTATGACTACGAGTTCGCCTATTGGGGACAGGGAACCC<br>TCGTGACAGTGTCTGCCGCTAGCACAAAGGGCCCTAGCG<br>TTTTCCCCTGGCTCCCAGCAGCAAGTCTACATCCGGTG<br>GAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGATTAATTTT<br>CCGAGCCAGTGACCGTGTCTTGAATAGCGGAGCACTG<br>ACATCTGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCT<br>AGCGGCCTGTAATACTCTGTCCAGCGTTGTGACAGTGCCC<br>AGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTG<br>AACCAACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT<br>GGAACCCAAGAGCTGCGATAAGACACACACCTGTCTCTCC<br>ATGTCTCTGCTCCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTTCCGTGTTT<br>CTGTTCCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGC<br>AGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCC |

| SEQ<br>ID NO: | ОПИСАНИЕ | ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ  |
|---------------|----------|---|
|               |          | CACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGAC<br>GGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCTTGCGA<br>GGAACAGTACGGCAGCACCTACAGATGCGTGTCCGTGCT<br>GACAGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGT<br>ACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTA<br>TCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGA<br>GAACCCCAAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCGGAAAGA<br>GATGACCAAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAA<br>GGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAG<br>CAATGGACAGCCCGAGAACAACCTACAAGACAACCCCTC<br>CTGTGCTGAAGTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCA<br>AGCTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAAC<br>GTGTTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC<br>CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAA |

\* \* \*

[0270] Настоящее изобретение не ограничивается описанными в данном документе аспектами. Фактически, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и сопровождающих графических материалов. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

[0271] Все ссылки (например, публикации, или патенты, или патентные заявки), процитированные в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная ссылка (например, публикация, или патент, или патентная заявка) была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

Некоторые аспекты находятся в рамках следующей формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий
  - (a) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает первую мишень, (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, который содержит (i) второй переменный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывает вторую мишень, (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;при этом MM1 представляет собой пептид, препятствующий связыванию первого нацеливающегося домена с первой мишенью, а MM2 представляет собой пептид, препятствующий связыванию второго нацеливающегося домена со второй мишенью.
2. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 1, в котором первая мишень представляет собой Т-клеточный антигенный полипептид, и вторая мишень представляет собой поверхностный антиген раковой клетки.
3. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 1, в котором первая мишень представляет собой поверхностный антиген раковой клетки, вторая мишень представляет собой Т-клеточный антигенный полипептид.
4. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-3, в котором Т-клеточный антигенный полипептид представляет собой эписилон-цепь CD3.
5. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-4, в котором первый полипептид дополнительно содержит домен CH1 тяжелой цепи между нацеливающимся на поверхностный антиген раковой клетки доменом VH2 и мономерным Fc-доменом.
6. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-5, в котором первый полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR1) иммуноглобулина между доменом CH1 и первым мономерным Fc-доменом.
7. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 6, в котором

первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу:

MM1-CM1-scFv-VH2-CH1-HR1-Fc1, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

8. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-7, в котором второй полипептид дополнительно содержит константный домен CL1 легкой цепи.

9. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 8, в котором второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM2-CM2-VL2-CL1.

10. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-9, в котором третий полипептид дополнительно содержит шарнирную область (HR2) иммуноглобулина.

11. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-10, в котором третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: HR2-Fc2.

12. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 6 или п. 10, в котором первый полипептид HR1 и второй полипептид HR2 содержат одну и ту же аминокислотную последовательность.

13. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 6 или п. 10, в котором первый полипептид HR1 и второй полипептид HR2 содержат разные аминокислотные последовательности.

14. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-13, в котором первый, второй и/или третий полипептиды содержат один или несколько линкеров.

15. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 14, содержащий линкер в одном или нескольких из следующих местоположений:

(a) между MM1 и CM1;

(b) между MM2 и CM2;

(b) между переменными доменами тяжелой и легкой цепей scFv;

(c) между переменным доменом тяжелой цепи и доменом CH1;

(d) между доменом CH1 и шарнирной областью;

(e) между шарнирной областью и Fc-доменом;

(g) между CM2 и переменным доменом легкой цепи;

(h) между переменным доменом легкой цепи и CL;

(i) между доменом CH1 и вторым Fc-доменом;

(j) между доменом CN1 и шарнирной областью и/или

(k) между шарнирной областью и вторым Fc-доменом.

16. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 14 или п. 15, в котором линкер(-ы) содержит(-ат) от около 1 до около 20 аминокислот.

17. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-16, в котором MM1 связан с CM1 через линкер L1.

18. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-16, в котором MM2 связан с CM2 через линкер L2.

19. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 17 или п. 18, причем активируемый биспецифический полипептидный комплекс содержит и L1, и L2.

20. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по п. 19, в котором MM2 связан с CM2 через линкер L3, а CM2 связан с scFv через линкер L4.

21. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 14-20, в котором аминокислотные последовательности L1, L2, L3 и/или L4 являются одинаковыми.

22. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 14-20, в котором аминокислотная последовательность по меньшей мере одного из L1, L2, L3 и/или L4 отличается.

23. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-22, в котором аминокислотная последовательность CM1 и аминокислотная последовательность CM2 являются одинаковыми.

24. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-22, в котором аминокислотная последовательность CM1 и аминокислотная последовательность CM2 являются разными.

25. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-25, в котором каждый из CM1 и CM2 содержит субстрат для протеазы, которая присутствует в микроокружении опухоли.

26. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-25, в котором каждый CM1 и CM2 независимо содержит субстрат для одной и той же протеазы.

27. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-25, в котором CM1 и CM2 содержат субстраты для разных протеаз.

28. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 23-27, в котором каждый CM1 и CM2 независимо содержит субстрат для протеазы, выбранной из группы протеаз, представленных в таблице 3.

29. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 23-27,



в котором по меньшей мере один из CM1 и CM1 содержит субстрат для протеазы, выбранной из группы, состоящей из серинпротеазы или матриксной металлопептидазы (ММР).

30. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-29, в котором CM1 и/или CM2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:73-111 или SEQ ID NO:156-159.

31. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-30, в котором MM1 и/или MM2 содержит от около 5 аминокислот до около 40 аминокислот.

32. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 15-31, в котором каждый линкер независимо выбран из группы, состоящей из

(i) линкера на основе глицина и серина, выбранного из группы, состоящей из (GS)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число от 1 до 10, (GGS)<sub>n</sub>, где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, (GGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:40), (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:126), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, при этом n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, (GSSGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO:41), где n представляет собой целое число, равное по меньшей мере 1, 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), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:50), GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:51), GGGGS (SEQ ID NO:52), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:53), GGGS (SEQ ID NO:54), GGSGGGGS (SEQ ID NO:55), GGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:56), GSSGGSGGSG (SEQ ID NO:57), GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:58), GGSSGGS (SEQ ID NO:127) и GS; и (ii) линкера, содержащего глицин, 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), PKSCDKTHTCPPCPPELLG (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).

33. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-32, в котором первый полипептид содержит шарнир (шарнир 1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:34.

34. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-33, в котором второй полипептид содержит шарнир (шарнир 2), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:35.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая активируемый биспецифический

- полипептидный комплекс по любому из пп. 1-34 и фармацевтически приемлемый носитель.
36. Композиция, содержащая воду и активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-34.
37. Композиция по п. 36, содержащая 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или до 99% воды.
38. Набор, содержащий фармацевтическую композицию по п. 35 или композицию по п. 36.
39. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидные последовательности, которые кодируют первый полипептид, второй полипептид и/или третий полипептид активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-34.
40. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидные последовательности, которые кодируют первый полипептид активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-34.
41. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидные последовательности, которые кодируют второй полипептид активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-34.
42. Нуклеиновая кислота, содержащая нуклеотидные последовательности, которые кодируют третий полипептид активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-34.
43. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 39-42.
44. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 43.
45. Способ получения активируемого биспецифического полипептидного комплекса, включающий
- (а) культивирование клетки-хозяина по п. 44 в жидкой культуральной среде в условиях, достаточных для продуцирования активируемого НВРС; и
- (b) выделение активируемого НВРС.
46. Способ лечения заболевания у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества активируемого биспецифического полипептидного комплекса по любому из пп. 1-34 или фармацевтической композиции по п. 35 или п. 36 субъекту.
47. Способ по п. 46, в котором субъект представляет собой человека.
48. Способ по п. 46 или п. 47, в котором заболевание представляет собой рак.
49. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс по любому из пп. 1-34, или фармацевтическая композиция по п. 35, или композиция по п. 36 для применения в ингибировании роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.
50. Применение активируемого биспецифического полипептидного комплекса по

любому из пп. 1-34, или фармацевтической композиции по п. 35, или композиции по п. 36 в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

51. Активируемый биспецифический полипептидный комплекс, содержащий

(а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), при этом scFv содержит первый вариабельный домен тяжелой цепи (VH1) и первый вариабельный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют нацеливающийся на Т-клеточный антиген домен, который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1) и (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1); (iv) второй вариабельный домен тяжелой цепи (VH2), (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1), (vi) домен CH1 тяжелой цепи и (vii) шарнирную область иммуноглобулина между доменом CH1 и Fc1;

(b) второй полипептид, содержащий (i) второй вариабельный домен легкой цепи (VL2), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки в паре с VH2, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2) и (iv) константный домен CL1 легкой цепи; и

(c) третий полипептид, содержащий второй мономерный Fc-домен (Fc2) и шарнирную область (HR2) иммуноглобулина, при этом третий полипептид не содержит вариабельный домен иммуноглобулина, и

при этом первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1;

второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM2-CM2-VL2-CL1; и

третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь.

52. Активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий

(а) первый полипептид, содержащий нацеливающийся на поверхностный антиген раковой клетки домен, содержащий (i) одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1) и (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1); (iv) вариабельный домен тяжелой цепи (VH2), (v) первый мономерный Fc-домен (Fc1), (vi) домен CH1 тяжелой цепи и (vii) шарнирную область иммуноглобулина между доменом CH1 и первым мономерным Fc-доменом;

(b) второй полипептид, содержащий (i) вариабельный домен легкой цепи (VL2), который

специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид в паре с VH2 первого полипептида, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2) и (iv) константный домен CL1 легкой цепи; и

(с) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и шарнирную область иммуноглобулина;

при этом первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1;

второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM2-CM2-VL2-CL1; и

третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь, и при этом третий полипептид не содержит варибельный домен иммуноглобулина.

53. Активируемый гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий

(а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv), который специфически связывает поверхностный антиген раковой клетки, (ii) первый маскирующий фрагмент (MM1) и (iii) первый расщепляемый фрагмент (CM1) и варибельный домен тяжелой цепи (VH2), (iv) первый мономерный Fc-домен (Fc1), (v) домен CH1 тяжелой цепи и шарнирную область иммуноглобулина между доменом CH1 и (vii) первым мономерным Fc-доменом;

(b) второй полипептид, содержащий (i) варибельный домен легкой цепи (VL2), который специфически связывает Т-клеточный антигенный полипептид в паре с VH2 первого полипептида, (ii) второй маскирующий фрагмент (MM2), (iii) второй расщепляемый фрагмент (CM2) и (iv) константный домен CL1 легкой цепи; и

(с) третий полипептид, состоящий из второго мономерного Fc-домена (Fc2) и шарнирной области иммуноглобулина;

при этом первый полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM1-CM1-scFv1-VH2-CH1-HR1-Fc1;

второй полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: MM2-CM2-VL2-CL1; и

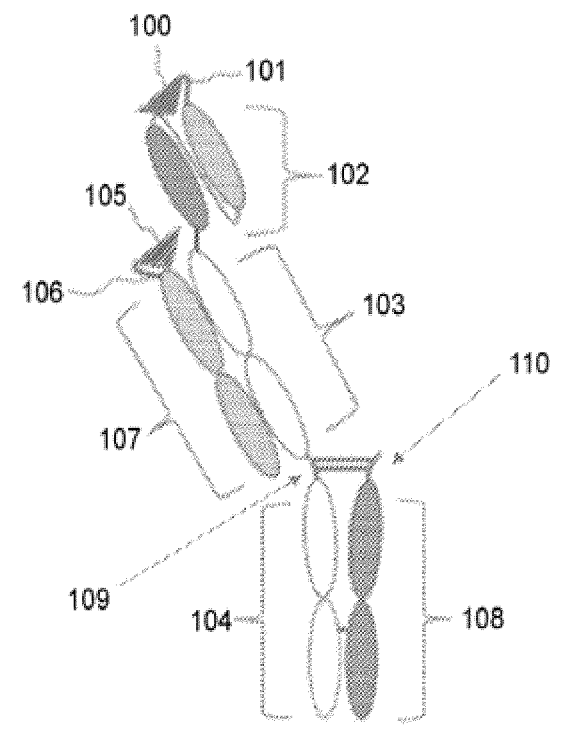
третий полипептид характеризуется структурным расположением от аминоконца к карбоксиконцу: HR2-Fc2, при этом каждый знак «-» независимо представляет собой прямую или непрямую связь, и при этом третий полипептид не содержит варибельный домен иммуноглобулина.

54. Гетеромультимерный биспецифический полипептидный комплекс (НВРС), содержащий

(а) первый полипептид, содержащий (i) одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), содержащий первый переменный домен тяжелой цепи (VH1) и первый переменный домен легкой цепи (VL1), при этом VH1 и VL1 вместе образуют первый нацеливающийся домен, который специфически связывает первую мишень, (ii) второй переменный домен тяжелой цепи (VH2) и (iii) первый мономерный Fc-домен (Fc1);

(b) второй полипептид, который содержит второй переменный домен легкой цепи (VL2), при этом VH2 и VL2 вместе образуют второй нацеливающийся домен, который специфически связывает вторую мишень; и

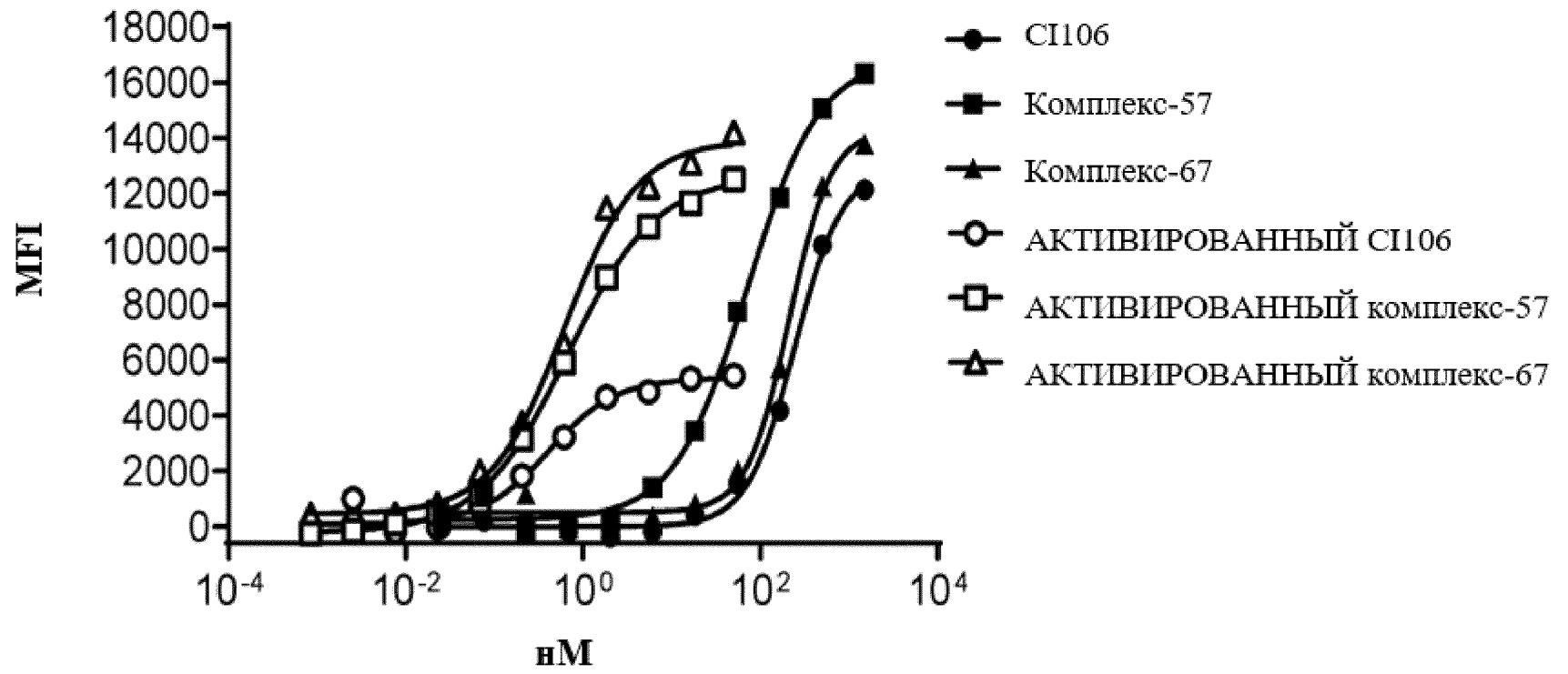
(c) третий полипептид, который содержит второй мономерный Fc-домен (Fc2) и не содержит переменный домен иммуноглобулина.



1/18

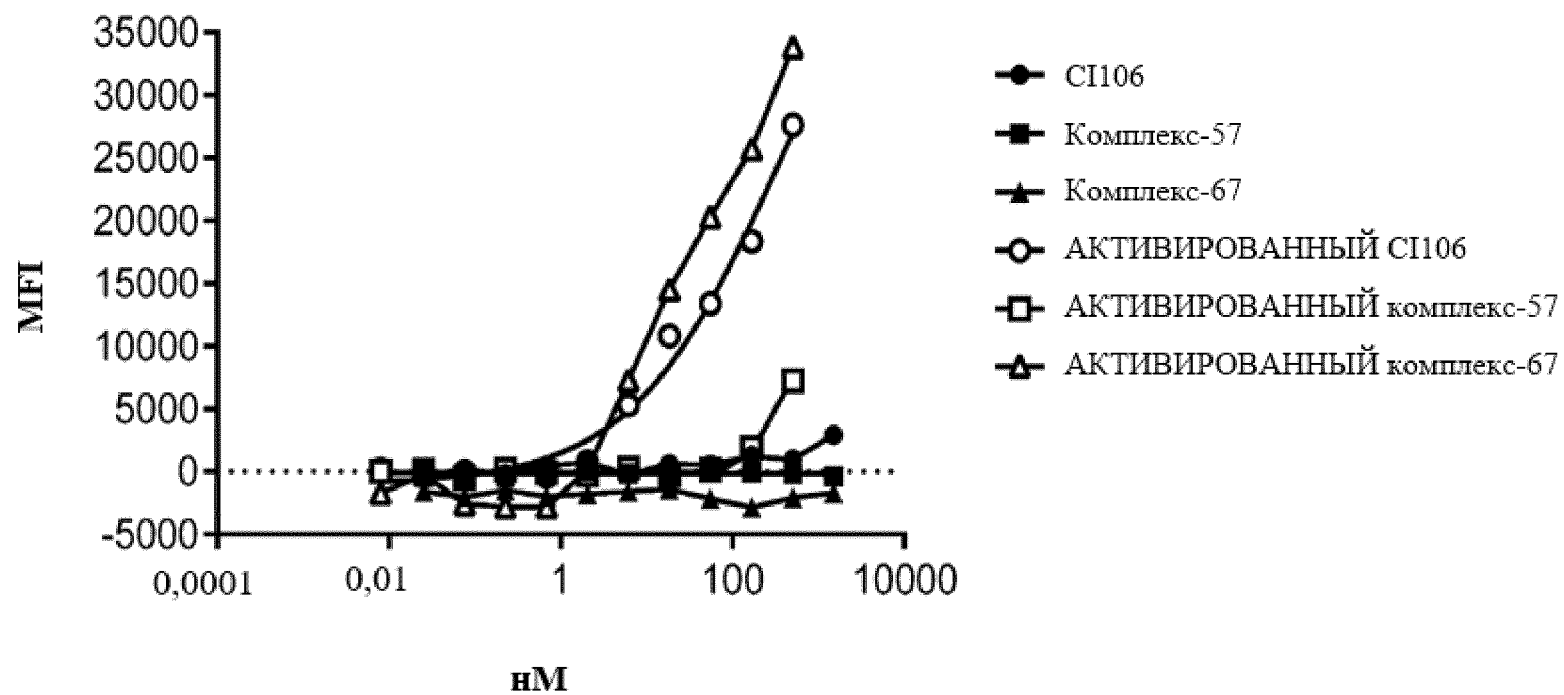
ФИГ. 1

### Связывание клеток HT29 (EGFR)



ФИГ. 2А

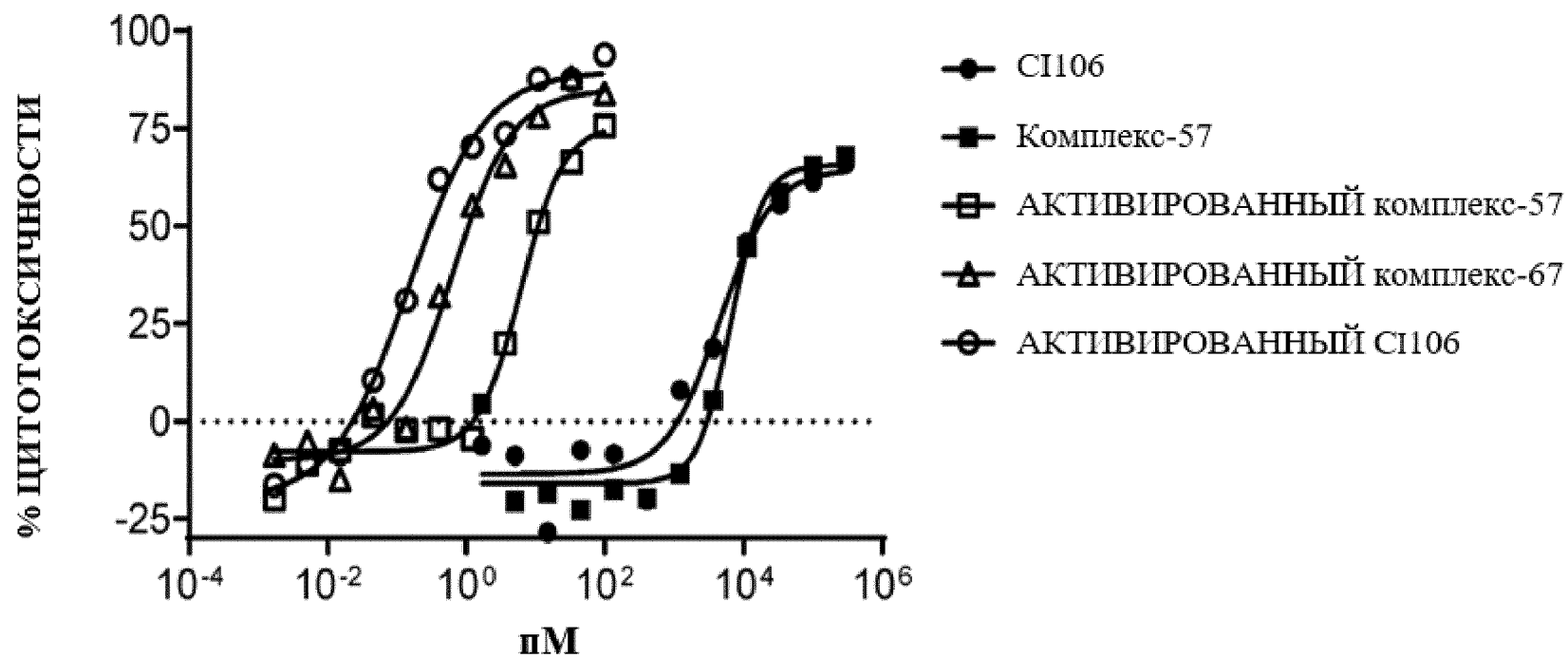
**Связывание клеток  
Jurkat (CD3)**



**ФИГ. 2В**

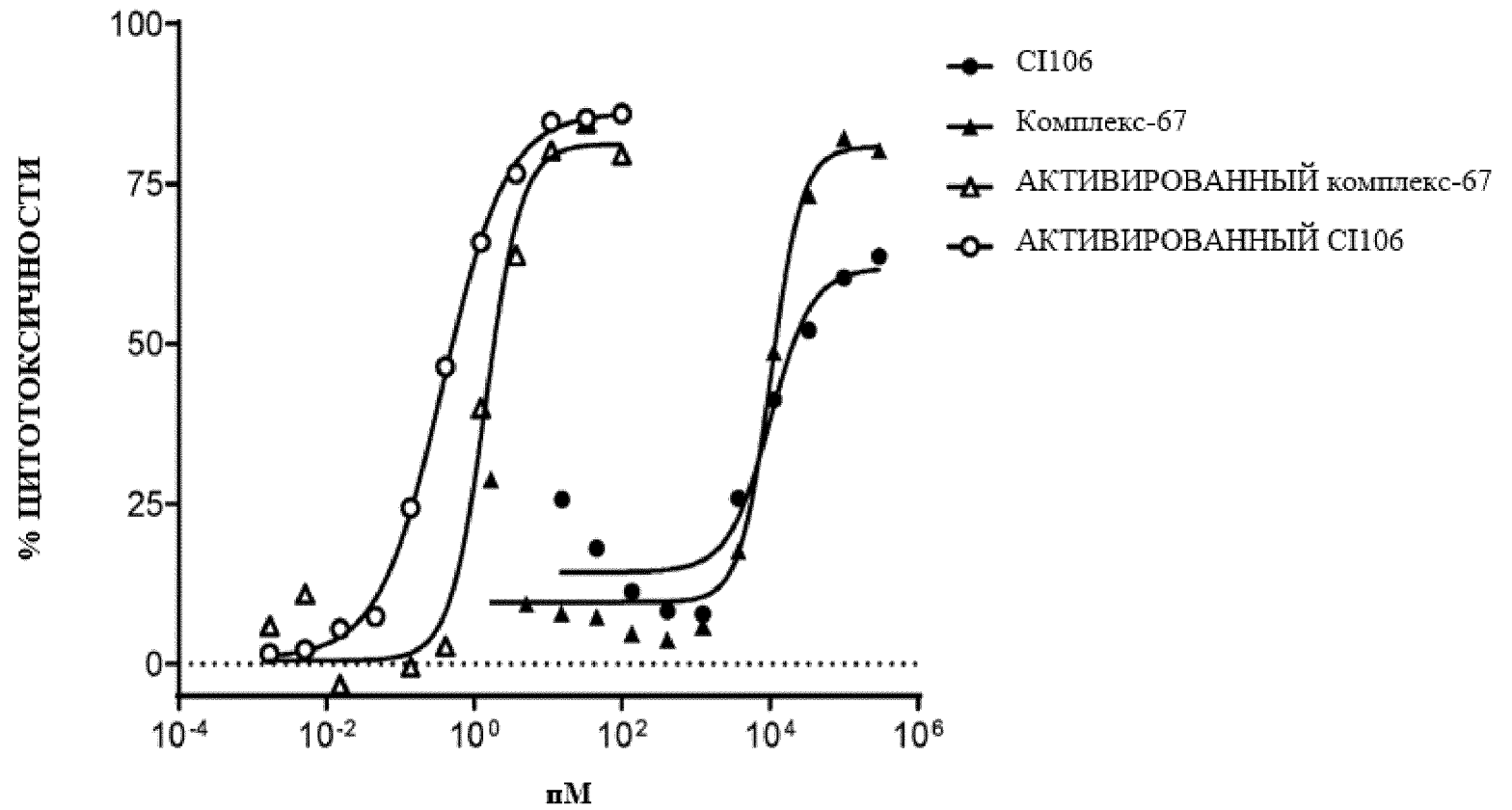


Цитотоксичность в  
отношении HT29



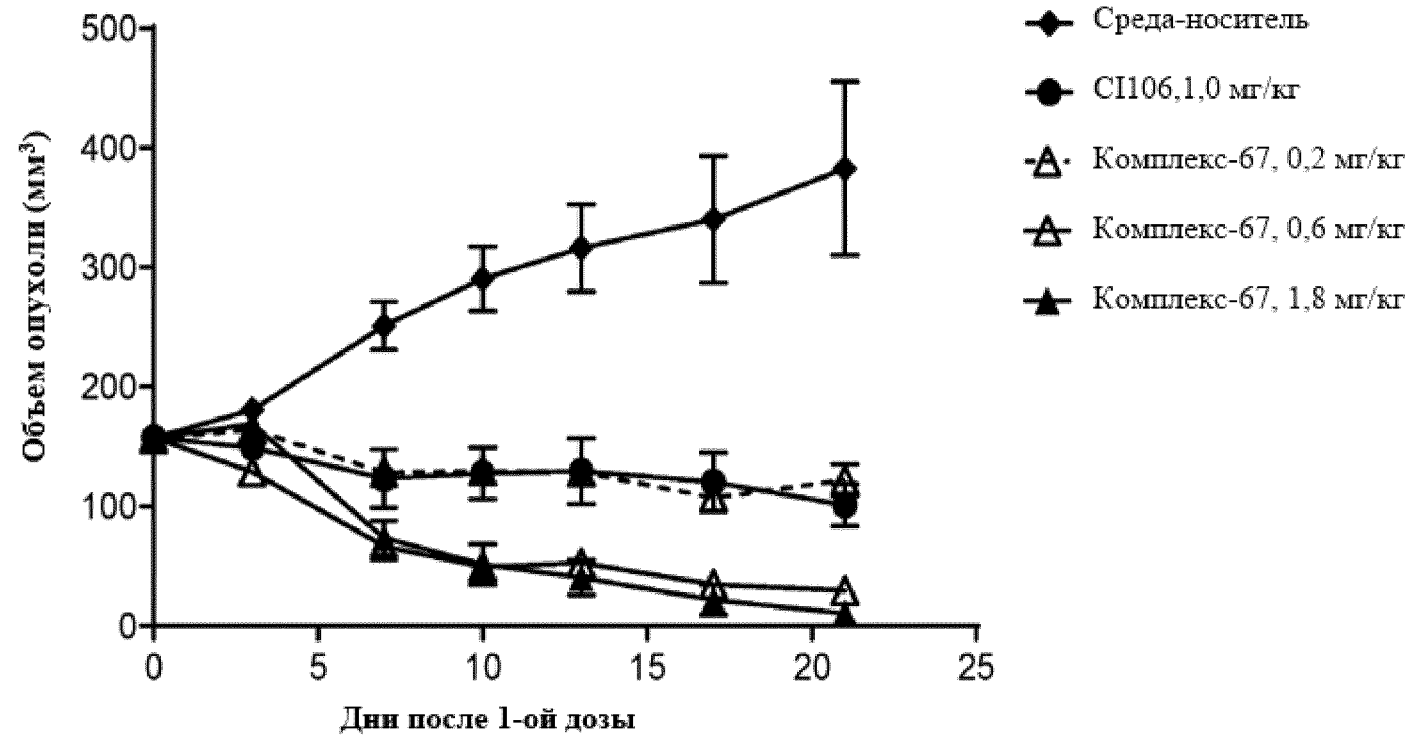
ФИГ. 3А

Цитотоксичность в  
отношении НТ29



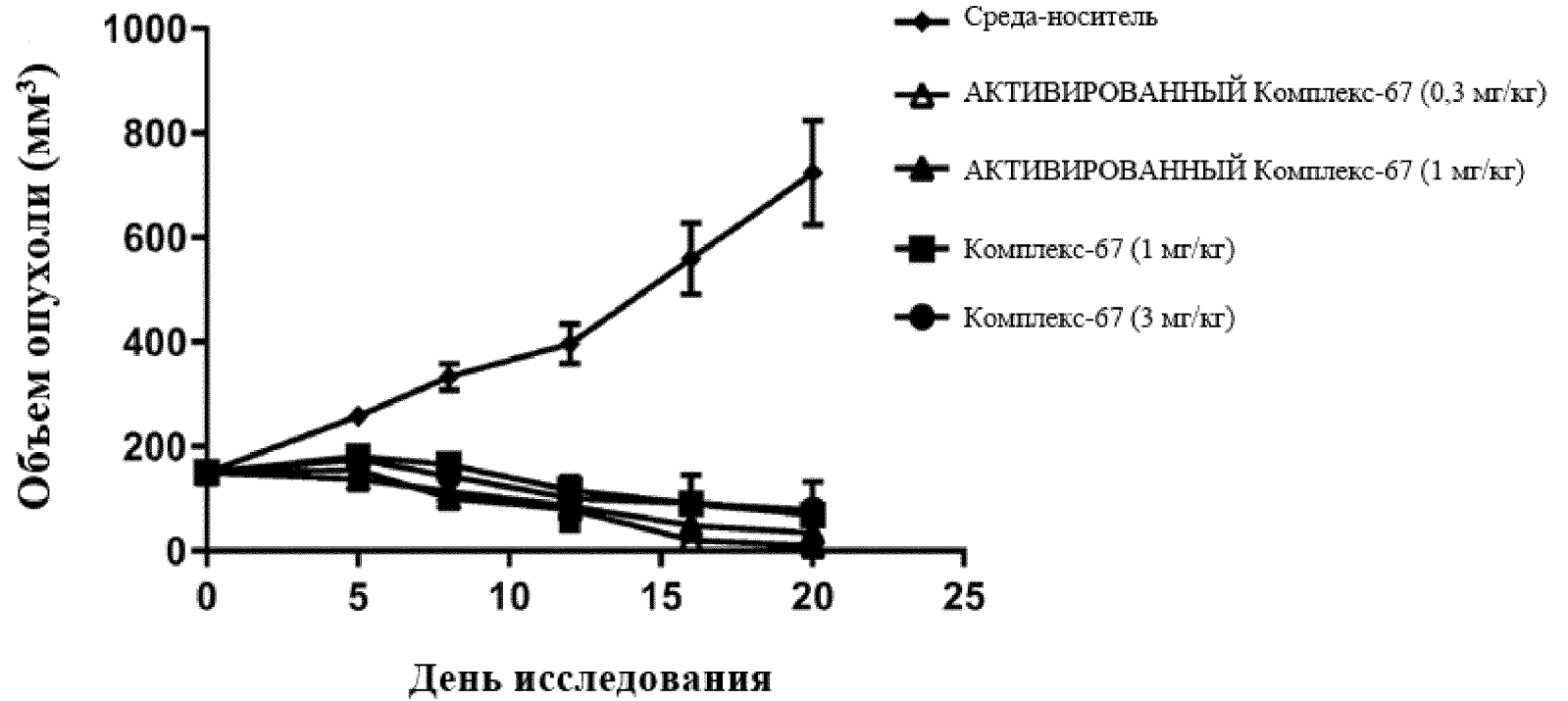
ФИГ. 3В

Вмешательство в  
отношении опухоли НТ29

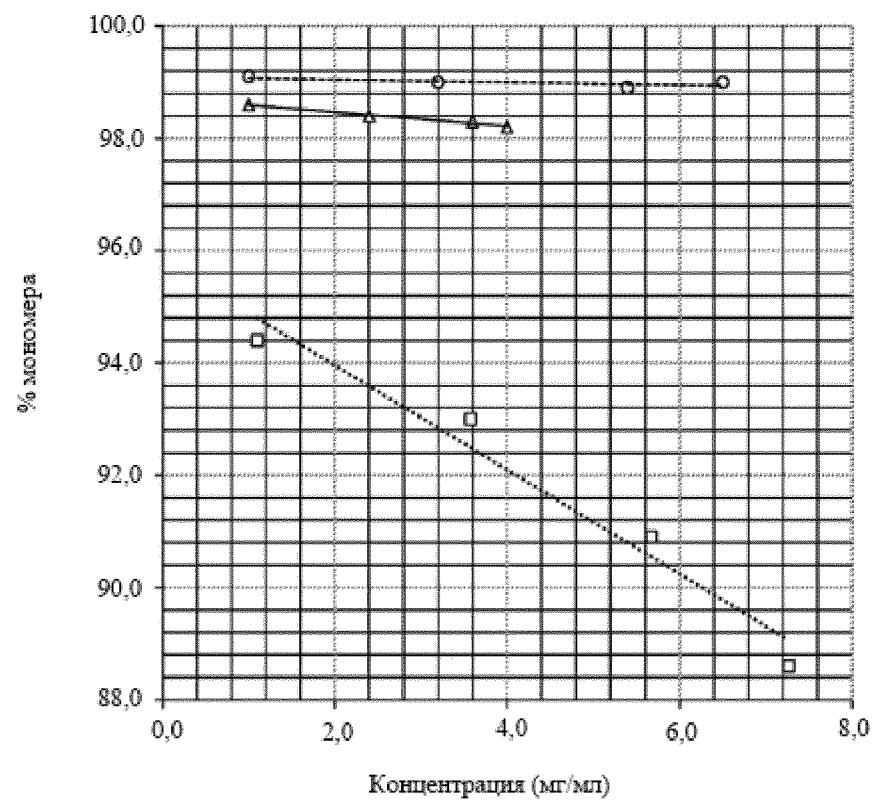


ФИГ. 4

### Вмешательство в отношении опухоли НСТ116

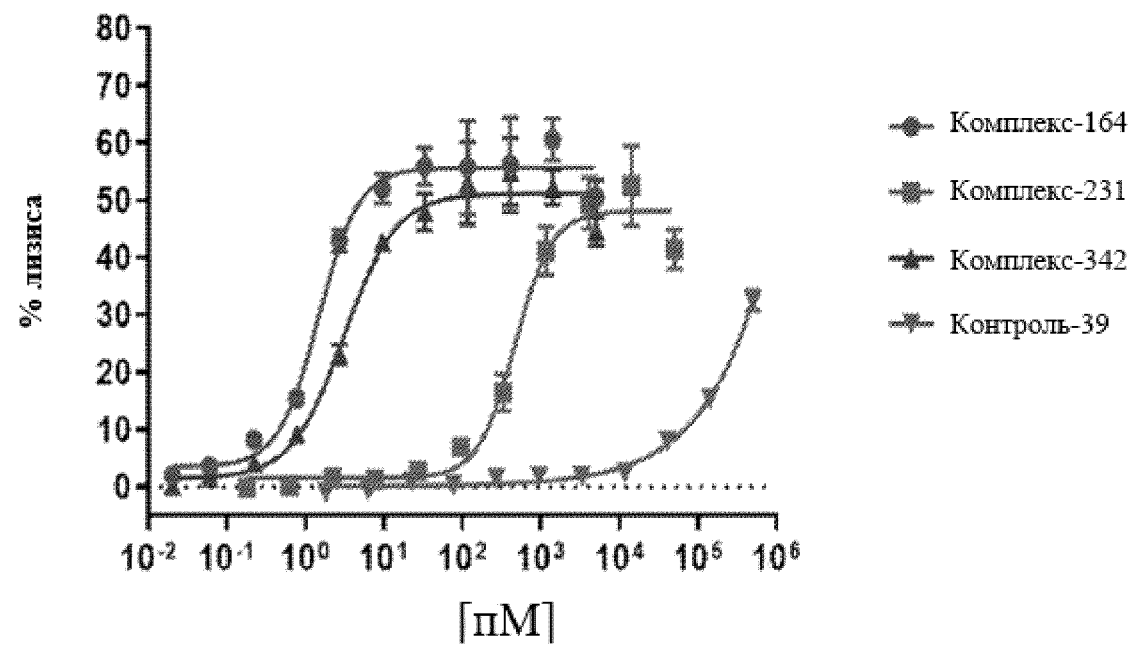


ФИГ. 5

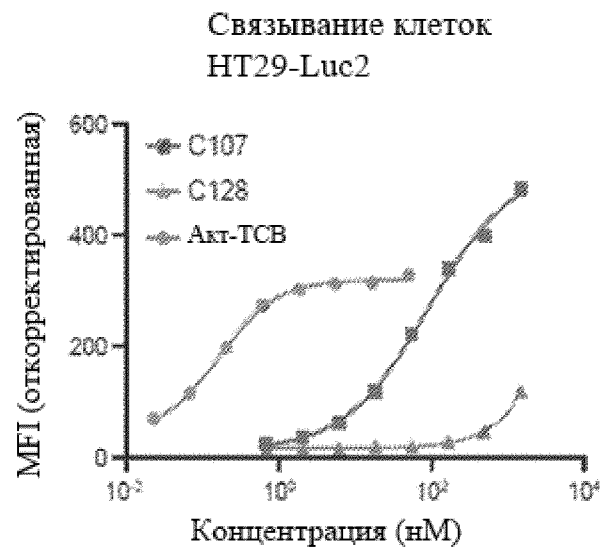


- Комплекс-67
- △ Комплекс-57
- СИ106
- Линейная зависимость (Комплекс-67)
- Линейная зависимость (Комплекс-57)
- ..... Линейная зависимость (СИ106)

ФИГ. 6

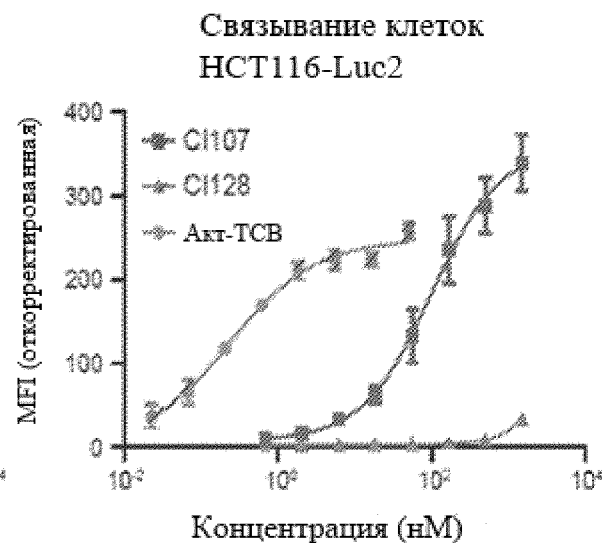


ФИГ. 7



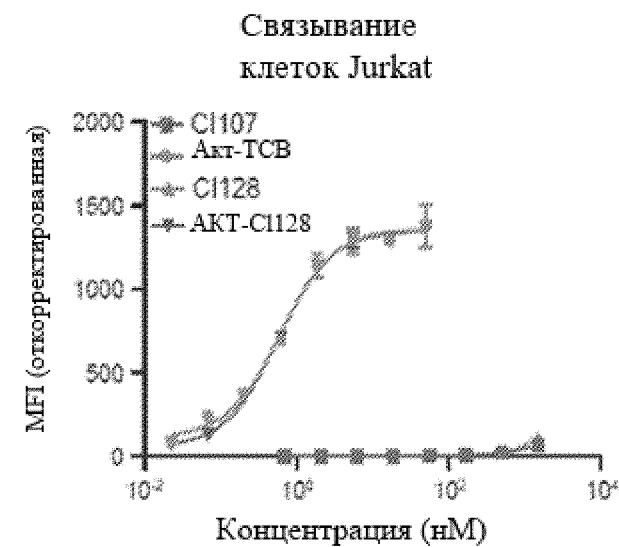
| Образец | Kd (нМ) |
|---------|---------|
| C1107   | 91,28   |
| Акт-ТСВ | 0,17    |
| C1128   | н.о.    |

ФИГ. 8А



| Образец | Kd (нМ) |
|---------|---------|
| C1107   | 98,19   |
| Акт-ТСВ | 0,23    |
| C1128   | н.о.    |

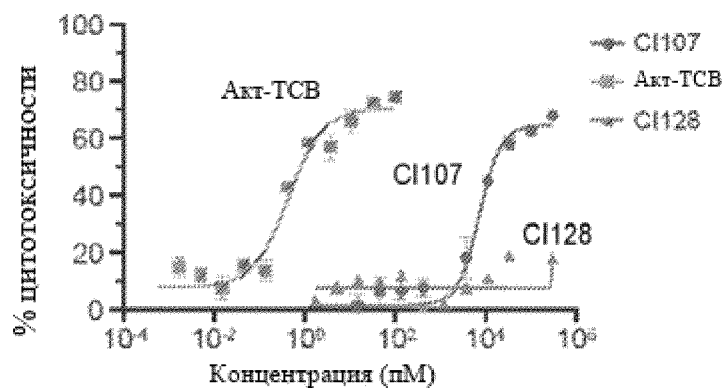
ФИГ. 8В



| Образец   | Kd (нМ) |
|-----------|---------|
| C1107     | н.о.    |
| Акт-ТСВ   | 0,62    |
| C1128     | н.о.    |
| АКТ-C1128 | 0,57    |

ФИГ. 8С

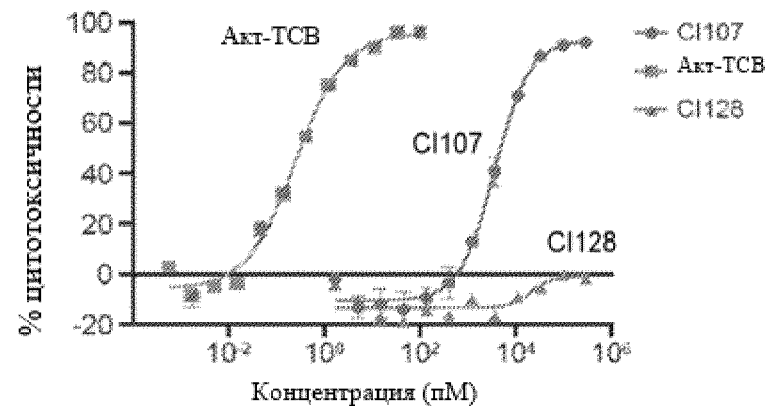
Цитотоксичность в отношении клеток  
HCT116-Luc2



| Образец | EC50 (nM) |
|---------|-----------|
| CI107   | 7297      |
| Акт-ТСВ | 0,44      |

ФИГ. 9А

Цитотоксичность в отношении  
клеток HT29-Luc2

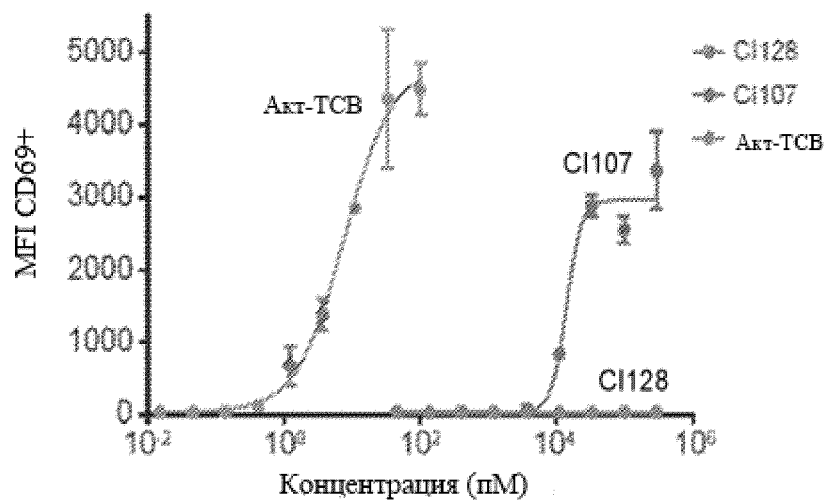


| Образец | EC50 (nM) |
|---------|-----------|
| CI107   | 3678      |
| Акт-ТСВ | 0,25      |

ФИГ. 9В



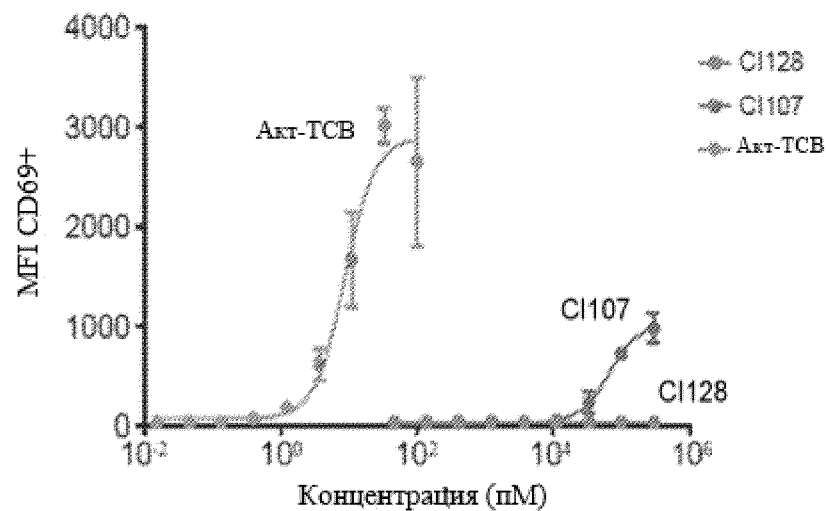
Активация Т-клеток НСТ116-  
Luc2



| Образец | EC50 (пМ) |
|---------|-----------|
| CI107   | 14178     |
| Акт-ТСВ | 7.65      |

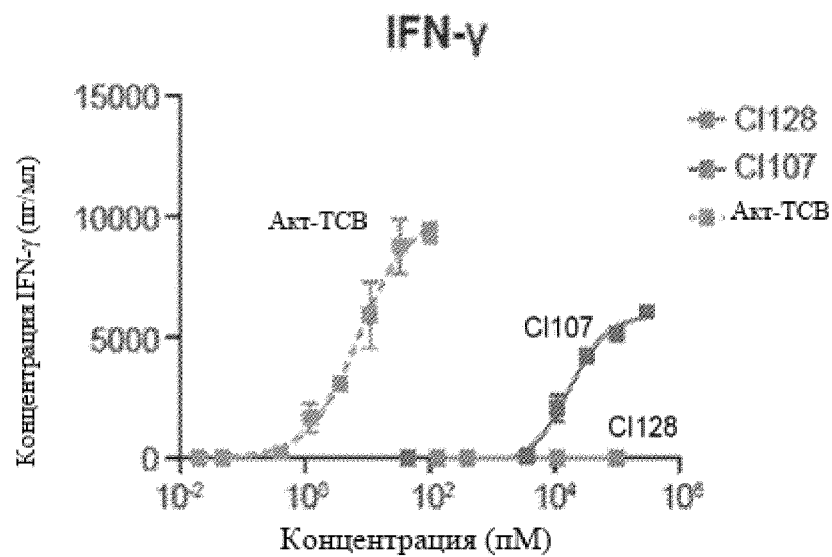
ФИГ. 9С

Активация Т-клеток НТ29-  
Luc2

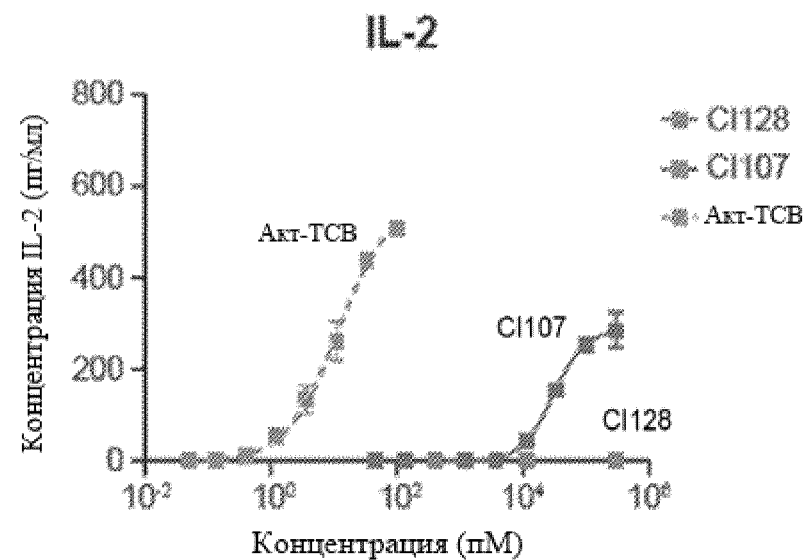


| Образец | EC50 (пМ) |
|---------|-----------|
| CI107   | 65971     |
| Акт-ТСВ | 8.75      |

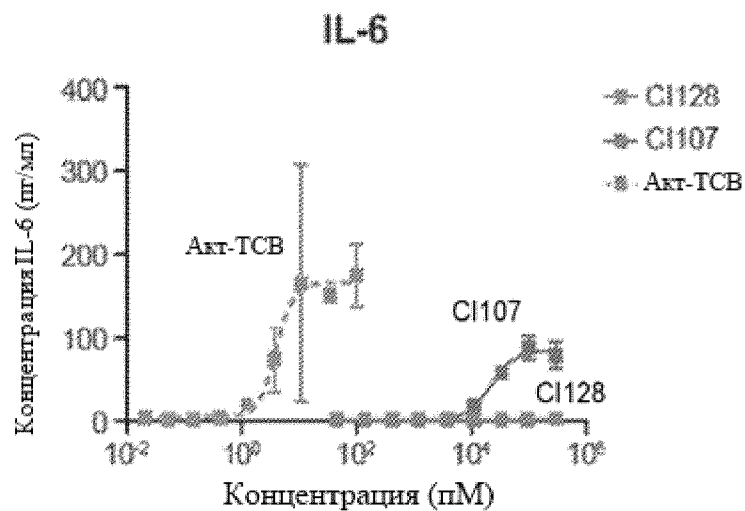
ФИГ. 9D



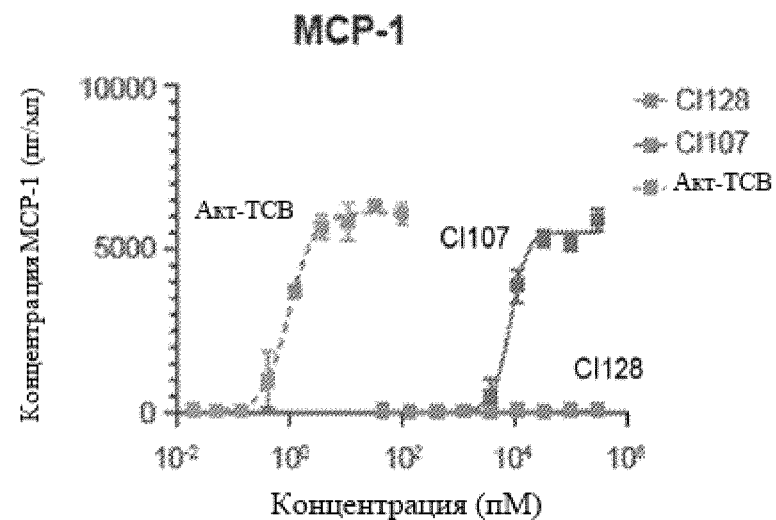
ФИГ. 10А



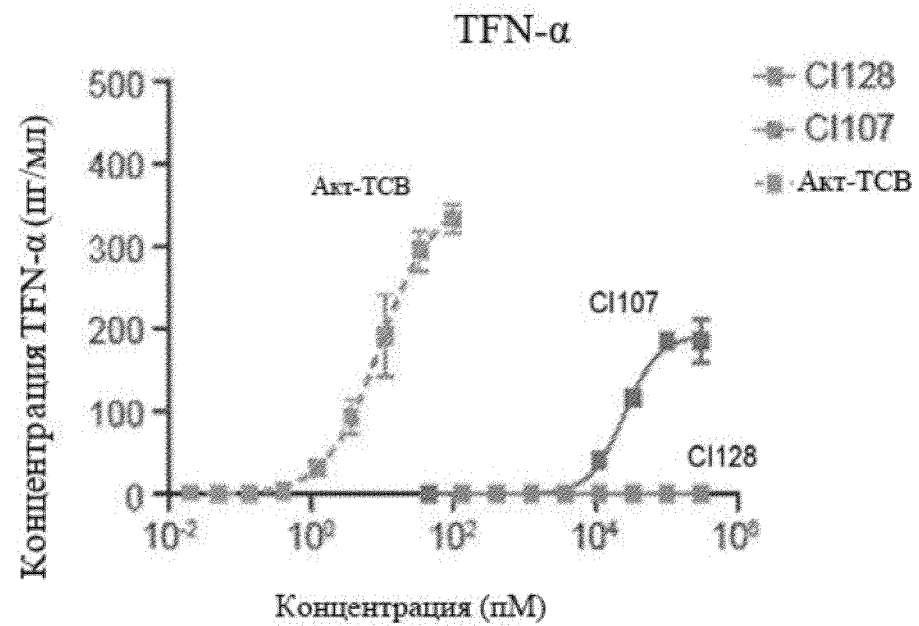
ФИГ. 10В



ФИГ. 10С



ФИГ. 10D

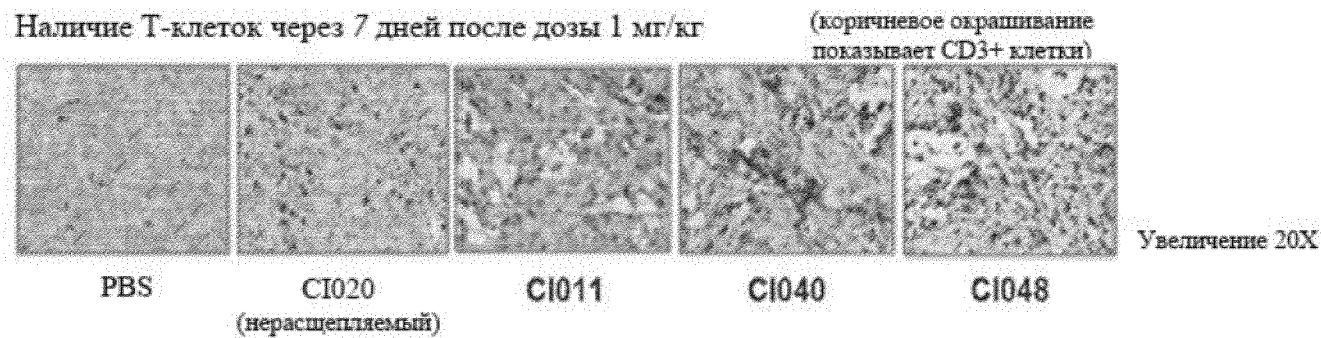


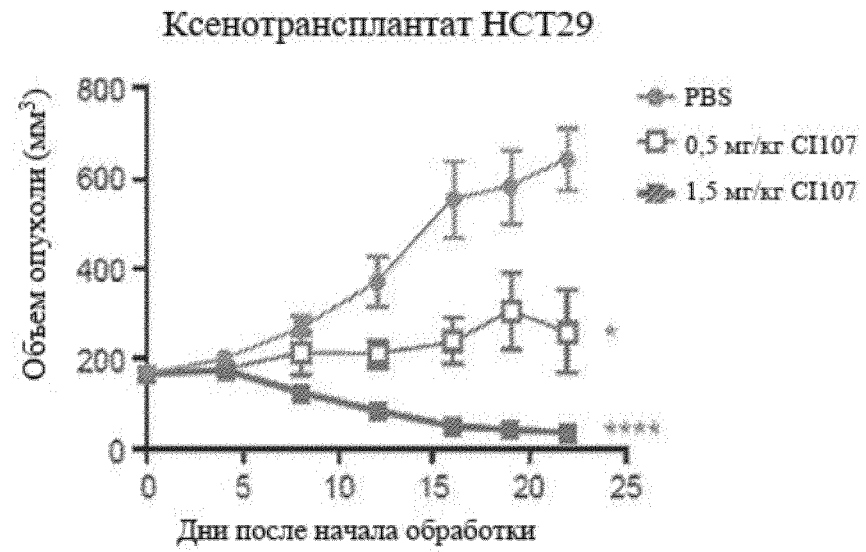
ФИГ. 10Е

ФИГ. 11А

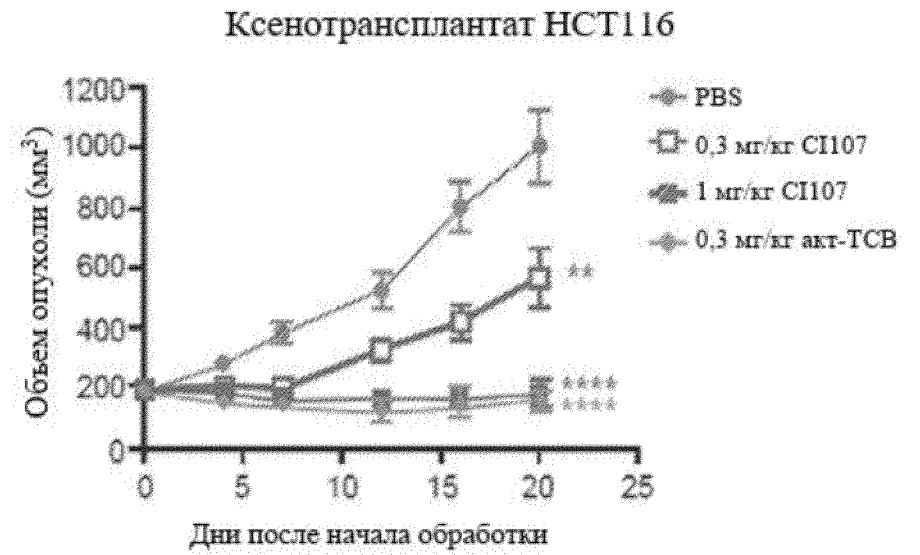


ФИГ. 11В



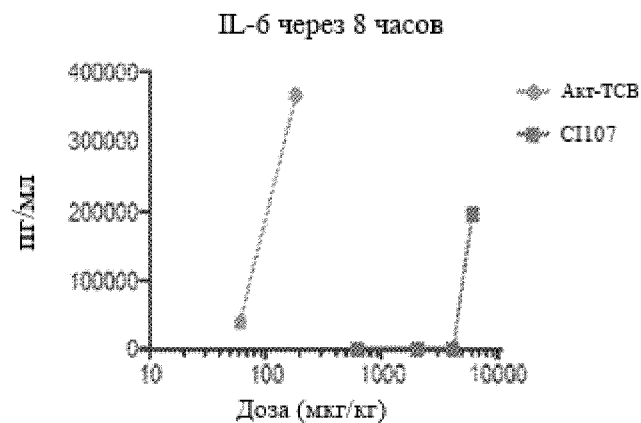


ФИГ. 12А

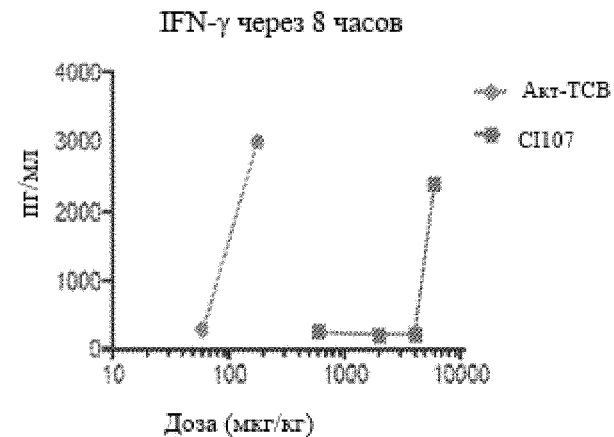


ФИГ. 12В

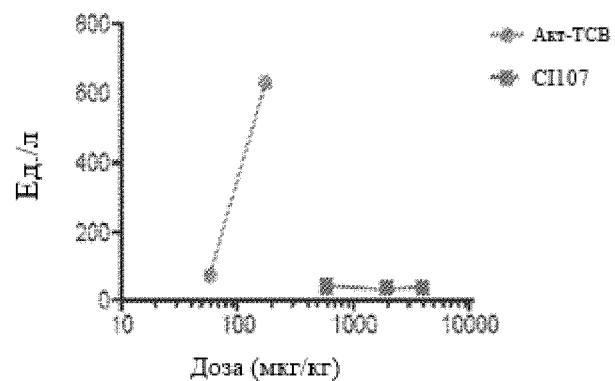
ФИГ. 13А



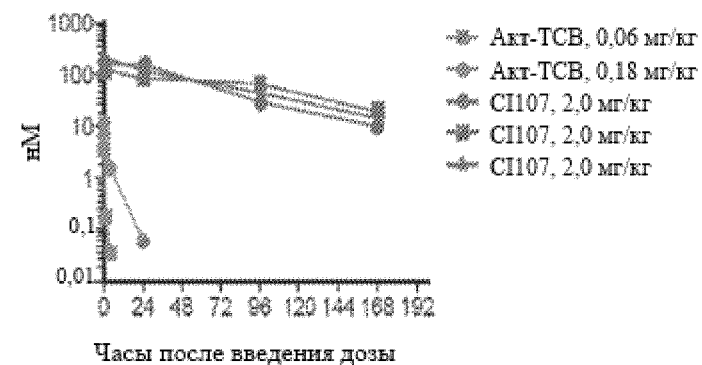
ФИГ. 13В



AST через 48 часов



Концентрации в плазме



ФИГ. 13С

ФИГ. 13D