



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119329** (13) **C2**

(51) МПК (2019.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2016 02539</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Мур Пол А. (US), Лі Джонатан (US), Чен Франсін Жифен (US), Джонсон Леслі С. (US), Шах Калпана (US), Бонвіні Езіо (US)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>20.08.2014</b>	(73) Власник(и):	<b>МАКРОДЖЕНИКС, ІНК., 9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America (US)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>10.06.2019</b>	(74) Представник:	<b>Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>61/869,528, 61/907,691, 13198859</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	<b>WO 2012162067 A2, 29.11.2012 WO 2012018687 A1, 09.02.2012 WO 2006113665 A2, 26.10.2006 US 2007004909 A1, 04.01.2007 US 2004082039 A1, 29.04.2004 US 2003229208 A1, 11.12.2003 US 2012184716 A1, 19.07.2012 US 2002193571 A1, 19.12.2002 US 2010174053 A1, 08.07.2010 US 2010196372 A1, 05.08.2010 US 2012289418 A1, 15.11.2012</b>
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>23.08.2013, 22.11.2013, 20.12.2013</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>US, US, EP</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>11.07.2016, Бюл.№ 13</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.06.2019, Бюл.№ 11</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/US2014/051793, 20.08.2014</b>		

## (54) БІСПЕЦИФІЧНЕ ДІАТІЛО, ЯКЕ ЗДАТНЕ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З grA33 І CD3, ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ

### (57) Реферат:

Винахід стосується біспецифічних діатіл, які містять два поліпептидних ланцюги, і які характеризуються наявністю щонайменше одного сайту зв'язування, специфічного відносно епітопа CD3, і одного сайту зв'язування, специфічного відносно епітопа grA33, біспецифічних діатіл, які містять домен Fc імуноглобуліну і складаються з трьох поліпептидних ланцюгів, і які характеризуються наявністю щонайменше одного сайту зв'язування, специфічного відносно епітопа grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного відносно епітопа CD3, фармацевтичної композиції, що містить такі біспецифічні діатіла або такі біспецифічні Fc-діатіла, та способу застосування таких діатіл у лікуванні злоякісної пухлини та інших захворювань і станів, опосередкованих grA33.

UA 119329 C2



Посилання на родинні заявки

Дана заявка претендує на пріоритет відповідно до заявок на видачу патентів США №№ 61/869528 (поданої 23 серпня 2013 р.; на стадії розгляду) і 61/907691 (поданої 22 листопада 2013 р.; на стадії розгляду), і заявкою на видачу Європейського патенту № 13198859 (поданої 20 грудня 2013 р.), кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

Посилання на перелік послідовностей

Дана заявка містить у собі один або декілька переліків послідовностей відповідно до 37 C.F.R. 1. 821 et seq., які розкриті як на паперовому, так і на машинозчитуваному носії, і чиї паперові та машинозчитувані розкриття повністю включені в даний документ за допомогою посилання.

Область техніки, до якої відноситься даний винахід

Даний винахід відноситься до біспецифічних моновалентних діатіл, які містять два поліпептидних ланцюги й які характеризуються наявністю одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного для епітопу CD3 (тобто "grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло"). Даний винахід також відноситься до біспецифічних моновалентних діатіл, які містять домен Fc імуноглобуліну ("біспецифічні моновалентні Fc-діатіла") і складається з трьох поліпептидних ланцюгів й які характеризуються наявністю одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу CD3 (тобто "grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне Fc-діатіло"). Біспецифічні моновалентні діатіла та біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу здатні одночасно зв'язуватися з grA33 і CD3. Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, які містять такі біспецифічні моновалентні діатіла або такі біспецифічні моновалентні Fc-діатіла. Даний винахід додатково відноситься до способів застосування таких діатіл у лікуванні злоякісної пухлини та інших захворювань і станів.

Попередній рівень техніки даного винаходу

I. grA33

Колоректальний рак належить до числа найпоширеніших злоякісних пухлин у західному світі й є провідною причиною смертельних наслідків, викликаних злоякісними пухлинами (Silverberg, E. et al. (1989) "Cancer Statistics, 1989", CA Cancer J Clin. 39(1):3-20). Однією потенційно застосовною мішенню для раку товстої кишки є трансмембранний глікопротеїн A33 з молекулярною масою 43 кДа (grA33) ((Heath, J.K. et al. (1997) "The Human A33 Antigen Is A Transmembrane Glycoprotein And A Novel Member Of The Immunoglobulin Superfamily", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 94(2):469-474; Ritter, G. et al. (1997) "Characterization Of Posttranslational Modifications Of Human A33 Antigen, A Novel Palmitoylated Surface Glycoprotein Of Human Gastrointestinal Epithelium", Biochem. Biophys. Res. Commun. 236(3):682-686). grA33 був вперше відкритий шляхом одержання моноклональних мишачих антитіл проти клітинної лінії ASPC1, що походить з карциноми підшлункової залози людини. Виявили, що одне антитіло (MAb A33) реагувало з білком клітинної поверхні з молекулярною масою 43 кДа, що у зв'язку з цим позначили як "grA33" (Wong, N.A. et al. (2006) "EpCAM and grA33 Are Markers Of Barrett's Metaplasia", J. Clin. Pathol. 59(3):260-263).

grA33 являє собою трансмембранний білок сімейства адгезивних молекул, що забезпечують міжклітинний контакт; Abud, H.E. et al. (2000) "The Murine A33 Antigen Is Expressed At Two Distinct Sites During Development, The ICM Of The Blastocyst and The Intestinal Epithelium", Mech. Dev. 98(1-2):111-114; Barendswaard, E.C. et al. (1998) "Rapid and Specific Targeting Of Monoclonal Antibody A33 To A Colon Cancer Xenograft In Nude Mice", Int. J. Oncol. 12(1):45-53; Panjideh, H. et al. (2008) "Biodistribution and Efficacy Of [131I]A33scFv:CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer", Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Незважаючи на те, що функціональна значимість антигена A33 ще не з'ясована, було показано, що він опосередковує відновлення слизової товстої кишки у тваринній моделі коліту та рівномірно експресується в >95 % всіх колоректальних карцином. Експресія A33 є рівномірною протягом всіх стадій захворювання, а також при будь-якому ступені гістологічної диференціації, й антиген не секретується або не виділяється в кровоток виявляємим чином (Infante, J.R. et al. (2013) "Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer", Eur. J. Cancer. 49(6):1169-1175; Panjideh, H. et al. (2008) "Biodistribution And Efficacy Of [131I]A33scFv:CDy, A Recombinant Antibody-Enzyme Protein For Colon Cancer", Int. J. Oncol. 32(4):925-930). Навпроти, було ідентифіковано тільки декілька випадків експресії не віднесеного до шлунково-кишкового тракту антигена A33 (Johnstone, C.N. et al. (2000) "Characterization Of Mouse A33 Antigen, A Definitive Marker For Basolateral Surfaces Of Intestinal Epithelial Cells", Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.

279(3):G500-G510).

У зв'язку з тим, що експресія антигена A33 у високому ступені обмежена, дослідники вивчали можливість лікування опосередкованих A33 злоякісних пухлин за допомогою антитіл (Infante, J.R. et al. (2013) "Safety, Pharmacokinetics And Pharmacodynamics Of The Anti-A33 Fully-Human Monoclonal Antibody, KRN330, In Patients With Advanced Colorectal Cancer", *Eur. J. Cancer*. 49(6):1169-1175; Ackerman, M.E. et al. (2008) "A33 Antigen Displays Persistent Surface Expression", *Cancer Immunol. Immunother.* 57(7):1017-1027; Barendswaard, E.C. et al. (2001) "Relative Therapeutic Efficacy Of (125)I-And (131)I-Labeled Monoclonal Antibody A33 In A Human Colon Cancer Xenograft", *J. Nucl. Med.* 42(8):1251-1256; Carrasquillo, J.A. et al. (2011) "(124)I-hu33 Antibody PET Of Colorectal Cancer", *J. Nucl. Med.* 52(8):1173-1180; Chong, G. et al. (2005) "Phase I Trial Of 131I-Hu33 In Patients With Advanced Colorectal Carcinoma", *Clin. Cancer Res.* 11(13):4818-4826; Deckert, P.M. et al. (2000) "Pharmacokinetics And Microdistribution Of Polyethylene Glycol-Modified Humanized A33 Antibody Targeting Colon Cancer Xenografts", *Int. J. Cancer*. 87(3):382-390; Johnston, A.P. et al. (2012) "Targeting Cancer Cells: Controlling The Binding And Internalization Of Antibody-Functionalized Capsules" *ACS Nano*. 6(8):6667-6674; Koppe, M.J. et al. (2005) "Radioimmunotherapy And Colorectal Cancer", *Br. J. Surg. Mar*;92(3):264-276; Sakamoto, J. et al. (2006) "A Phase I Radioimmunolocalization Trial Of Humanized Monoclonal Antibody Hu33 In Patients With Gastric Carcinoma", *Cancer Sci.* 97(11):1248-1254; Scott, A.M. et al. (2005) "A Phase I Trial Of Humanized Monoclonal Antibody A33 In Patients With Colorectal Carcinoma: Biodistribution, Pharmacokinetics, And Quantitative Tumor Uptake", *Clin. Cancer Res.* 11(13):4810-4817; Tschmelitsch, J. et al. (1997) "Enhanced Antitumor Activity Of Combination Radioimmunotherapy (<sup>131</sup>I-Labeled Monoclonal Antibody A33) With Chemotherapy (Fluorouracil)", *Cancer Res.* 57(11):2181-2186). Аналогічно фрагменти таких антитіл також були досліджені у відношенні їх потенційної терапевтичної ролі (Coelho, V. et al. (2007) "Design, Construction, And In Vitro Analysis Of A33scFv:CDy, A Recombinant Fusion Protein For Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy In Colon Cancer", *Int. J. Oncol.* 31(4):951-957).

## II. CD3

CD3 являє собою Т-клітинний корецептор, що складається з чотирьох різних ланцюгів (Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) "Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling", *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(4):a005140; pages 1-14; Chetty, R. et al. (1994) "CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice", *J. Pathol.* 173:303-307).

У ссавців комплекс CD3 містить ланцюг CD3 $\gamma$ , ланцюг CD3 $\delta$  і два ланцюги CD3 $\epsilon$ . Зазначені ланцюги зв'язуються з молекулою, відомою як Т-клітинний рецептор (TCR), для створення сигналу активації в Т-лімфоцитах. При відсутності CD3 не відбувається правильне складання TCR, і вони розпадаються (Thomas, S. et al. (2010) "Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer", *Immunology* 129(2):170-177). CD3 виявлений зв'язаним із мембранами всіх зрілих Т-клітин і практично ні з яким іншим типом клітин (див. Janeway, C.A. et al. (2005) *B: Immunobiology: The Immune System In Health And Disease*, " 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214-216; Sun, Z. J. et al. (2001) "Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 $\epsilon$ : $\gamma$  Heterodimer", *Cell* 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) "Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex", *Immunity*. 2006 Feb.;24(2):133-139).

## III. Біспецифічні діатіла

Здатність інтактного, немодифікованого антитіла (наприклад, IgG) зв'язувати епітоп антигена залежить від присутності варіабельних доменів на легких і важких ланцюгах імуноглобуліну (тобто доменів VL і VH, відповідно). Конструкція діатіла заснована на одноланцюговому конструкті Fv (scFv) (див., наприклад, Holliger et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448; патентну публікацію США № 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) *FEBS Lett.* 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", *Protein Eng. Des. Sel.* 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", *Protein Engineering* 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", *Abstract 3P-683, J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000)

"Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Взаємодія легкого ланцюга антитіла і важкого ланцюга антитіла та, зокрема, взаємодія його доменів VL і VH формує один із сайтів зв'язування з епітопом антитіла. Навпроти, конструкт scFv містить домен VL і VH антитіла, що міститься в одному поліпептидному ланцюзі, причому в домені відділені гнучким лінкером, довжина якого достатня для забезпечення можливості самоскладання двох доменів у функціональний сайт зв'язування з епітопом. Якщо самоскладання доменів VL і VH стає неможливим внаслідок недостатньої довжини лінкера (менше ніж приблизно 12 амінокислотних залишків), два конструкти scFv взаємодіють один із одним із утворенням бівалентної молекули, в якій VL одного ланцюга асоціюються з VH іншого (розглянуте в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies", Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

Природні антитіла здатні зв'язуватись тільки з одним видом епітопів (тобто є моноспецифічними), хоча вони можуть зв'язуватись з множинними копіями цього виду (тобто проявляючи бівалентність або мультивалентність). У відомому рівні техніки повідомлялося про здатності виробляти діатіла, які відрізняються від таких природних антитіл тим, що вони здатні зв'язувати два або більше різних видів епітопів (тобто проявляючи біспецифічність або мультиспецифічність на додаток до бівалентності або мультивалентності) (див., наприклад, Holliger et al. (1993) "Diabodies": Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Mertens, N. et al., "New Recombinant Bi-and Trispecific Antibody Derivatives", In: Novel Frontiers In The Production Of Compounds For Biomedical Use, A. VanBroekhoven et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands (2001), pages 195-208; Wu, A. et al. (2001) "Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange", Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) "Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy", Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Забезпечення не моноспецифічними діатілами надає істотну перевагу: здатність колігування та колокалізації клітин, які експресують різні епітопи. Таким чином, бівалентні діатіла характеризуються широким діапазоном застосувань, містячи в собі терапію й імунодіагностику. Бівалентність забезпечує можливість великої гнучкості в конструюванні та розробці діатіла в різних застосуваннях, забезпечуючи підвищену авідність у відношенні мультимірних антигенів, перехресну зшивку різних антигенів і спрямований націлений вплив на конкретні типи клітин на основі присутності обох цільових антигенів. У зв'язку з їхньою підвищеною валентністю низькі швидкості дисоціації та швидке виведення з циркуляції (для діатіл невеликого розміру, що становить ~50 кДа або нижче), відомі в даній області техніки молекули діатіл також продемонстрували конкретне застосування в області візуалізації пухлин (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris", Protein Eng. 10:1221). Особливе значення представляє колігування різних клітин, наприклад, перехресна зшивка цитотоксичних Т-клітин з пухлинними клітинами (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells", Nature 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305).

Домени зв'язування з епітопом діатіла також можуть бути спрямовані на поверхневу детермінанту будь-якої імунної ефektorної клітини, такої як CD3, CD16, CD32 або CD64, які експресуються на Т-лімфоцитах, клітинах - природних кілерах (NK) або інших мононуклеарних клітинах. У багатьох дослідженнях також виявили, що зв'язування діатіла з детермінантами ефektorних клітин, наприклад, рецепторами Fcγ (FcγR), активує ефektorну клітину (Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody", Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins", Cancer Res. 59:2909-2916; міжнародні патентні публікації №№ WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068).

Як правило, активація ефektorних клітин запускається зв'язуванням антигена, зв'язаного антитілом, з ефektorною клітиною за допомогою взаємодії Fc-FcγR; таким чином, у зв'язку з цим, молекули діатіл відповідно до даного винаходу можуть проявляти Ig-подібну функціональність, незалежно від того, чи містять вони домен Fc (наприклад, відповідно до результатів будь-якого аналізу ефektorної функції, відомої в даній області техніки або представленій як приклад у даному документі (наприклад, аналізу ADCC)). Шляхом перехресної зшивки пухлинних й ефektorних клітин діатіло не тільки приводить ефektorну клітину в просторову близькість щодо пухлинних клітин, але приводить до ефективного лізису пухлинних клітин (див., наприклад, Cao et al. (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics", Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Проте, перераховані вище переваги зіштовхуються з істотною вартістю. Утворення таких не моноспецифічних діатіл вимагає успішного складання двох або більше окремих і різних поліпептидів (тобто таке утворення вимагає, щоб діатіла утворювалися за допомогою гетеродимеризації різних видів поліпептидних ланцюгів). Цей факт контрастує з моноспецифічними діатілами, які утворюються за допомогою гомодимеризації ідентичних поліпептидних ланцюгів. Оскільки необхідно надати щонайменше два несхожих поліпептиди (тобто два види поліпептидів) для утворення не моноспецифічного діатіла, і оскільки гомодимеризація таких поліпептидів призводить до неактивних молекул (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588), одержання таких поліпептидів повинно здійснюватися таким шляхом, який запобіжить утворенню ковалентних зв'язків між поліпептидами того самого виду (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588). У зв'язку з цим у даній області техніки розкриті нековалентне зв'язування таких поліпептидів (див., наприклад, Olafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications", Prot. Engr. Des. Sel. 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Region", Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System", Protein Eng. 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Проте, у даній області техніки встановлено, що біспецифічні моновалентні діатіла, що складаються з нековалентно зв'язаних поліпептидів, є нестабільними та легко дисоціюються до нефункціональних мономерів (див. наприклад, Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity", J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672).

Через таку проблему, у даній області техніки домоглися успіху в розробці стабільних, ковалентно зв'язаних гетеродимерних не моноспецифічних діатіл (див., наприклад, міжнародні патентні публікації №№ WO 2006/113665; WO/2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO/2012/162068; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And In Vivo B-Cell Depletion", J. Molec. Biol. 399(3):436-449; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ3 Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold", Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma", Blood 117(17):4542-4551; патентні публікації США №№ 2012/0294796 і 2013/0149236). Такі підходи передбачають конструювання одного або декількох цистеїнових залишків у кожному з використовуваних видів поліпептидів. Наприклад, було показано, що додавання цистеїнового залишку до С-кінця таких конструктів забезпечує утворення дисульфідного зв'язку між поліпептидними ланцюгами, стабілізуючи отриманий гетеродимер, не створюючи перешкоди для характеристик зв'язування бівалентної молекули.

Були описані діатіла та інші імуноглобуліни, що приблизно характеризуються специфічністю у відношенні будь-якого або обох із gpA33 і CD3 (див., наприклад, патентні публікації США №№ 2012/0014957; 2012/0034160; 2012/0087858; 2012/0189541; 2012/0195900; 2012/0201746; 2012/0237442; 2012/0263722; 2012/0258108 і 2012/0276608).

Незважаючи на такий успіх, одержання стабільних, функціональних гетеродимерних, не моноспецифічних діатіл може бути додатково вдосконалене шляхом ретельного розгляду та розміщення використовуваних доменів у поліпептидних ланцюгах. Таким чином, даний винахід відноситься до надання специфічних поліпептидів, які детально розроблені для одержання за

допомогою зв'язування ковалентним зв'язком, гетеродимерних діатіл і гетеродимерних Fc-діатіл, які здатні одночасно зв'язувати grA33 і CD3.

Коротке розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до "grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл".

Відповідно до конкретних варіантів здійснення діатіла відповідно до даного винаходу додатково містять домен Fc-області імуноглобуліну (тобто "домен Fc") ("grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла") або альбумінсполучний домен ("ABD") ("grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла з ABD") для збільшення періоду напівжиття *in vivo*. grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла відповідно до даного винаходу і grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу містять два різних поліпептидних ланцюги, які асоціюються один із одним гетеродимерним чином з утворенням одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу CD3. Таким чином, grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла та grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу є моновалентними в тому розумінні, що вони здатні зв'язуватися тільки з однією копією епітопу grA33 і тільки з однією копією епітопу CD3, але є біспецифічними в тому розумінні, що одне діатіло здатне зв'язуватися одночасно з епітопом grA33 і з епітопом CD3.

grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла відповідно до даного винаходу складаються з двох поліпептидних ланцюгів ("першого" та "другого" поліпептидного ланцюга), які ковалентно зв'язані один із одним, наприклад, за допомогою зв'язування дисульфідним містком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу складаються з трьох поліпептидних ланцюгів ("першого", "другого" та "третього" поліпептидного ланцюга), причому перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і перший та третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним. Біспецифічні моновалентні діатіла та біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу здатні одночасно зв'язуватися з grA33 і CD3. Даний винахід відноситься до таких grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл і grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл і до фармацевтичних композицій, які містять такі біспецифічні моновалентні діатіла або такі біспецифічні моновалентні Fc-діатіла. Даний винахід додатково відноситься до способів застосування таких діатіл у лікуванні злоякісної пухлини та інших захворювань і станів.

Зокрема, відповідно до даного винаходу передбачене біспецифічне моновалентне діатіло, причому біспецифічне моновалентне діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом grA33 і з епітопом CD3, причому біспецифічне моновалентне діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, причому перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і при цьому:

A. перший поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до C-кінця:

i. домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5); і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VH<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:27); причому субдомени (1A) і (1B) відділений один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:1);

ii. домен 2, причому домен 2 являє собою K-спіральний домен (SEQ ID NO:4) або E-спіральний домен (SEQ ID NO:3), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:2);

B. другий поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до C-кінця:

i. домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VL<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:26), і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25), причому субдомени (1A) і (1B) відділений один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:1);

ii. домен 2, причому домен 2 являє собою E-спіральний домен (SEQ ID NO:3) або K-спіральний домен (SEQ ID NO:4), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:2); і причому домен 2 першого поліпептидного ланцюга та домен 2 другого поліпептидного ланцюга не являють собою обидва E-спіральних домена або обидва K-спіральних домена;

і при цьому:

(а) домен VL першого поліпептидного ланцюга та домен VH другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і

(б) домен VH першого поліпептидного ланцюга та домен VL другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом grA33.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачений варіант здійснення описаного вище

біспецифічного моновалентного діатіла, в якому перший поліпептидний ланцюг або другий поліпептидний ланцюг містить альбумінзв'язуючий домен (SEQ ID NO:34), з'єднаний на С-кінці з доменом 2 або на N-кінці з доменом 1А за допомогою лінкера 3 (SEQ ID NO:32).

Відповідно до даного винаходу додатково передбачене біспецифічне моновалентне Fc-діатіло, причому біспецифічне моновалентне Fc-діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом grA33 і з епітопом CD3, і має домен Fc IgG, причому біспецифічне моновалентне Fc-діатіло містить перший поліпептидний ланцюг, другий поліпептидний ланцюг і третій поліпептидний ланцюг, причому перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і перший та третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і при цьому:

А. перший поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, який містить субдомен (1А), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VL<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:26), і субдомен (1В), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25), причому субдомени (1А) і (1В) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:1);

ii. домен 2, причому домен 2 являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:3) або К-спіральний домен (SEQ ID NO:4), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:2); і

iii. домен 3, який містить субдомен (3А), що містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) (SEQ ID NO:39) і субдомен (3В), що містить поліпептидну частину домена Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG; причому домени 3 і 2 відділені один від одного спейсерним пептидом (лінкером 5) (GGG);

В. другий поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, який містить субдомен (1А), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5), і субдомен (1В), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VH<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:27); причому субдомени (1А) і (1В) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:1);

ii. домен 2, причому домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:4) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO:3), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:2); і причому домен 2 першого поліпептидного ланцюга та домен 2 другого поліпептидного ланцюга не являють собою обидва Е-спіральних домена або обидва К-спіральних домена; і

С. третій поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця, домен 3, який містить:

(1) субдомен (3А), що містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) (SEQ ID NO:39); і

(2) субдомен (3В), що містить поліпептидну частину домена Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліни IgG;

і при цьому:

(a) поліпептидні частини доменів Fc IgG першого та третього поліпептидного ланцюга утворюють домен Fc IgG;

(b) домен VL першого поліпептидного ланцюга та домен VH другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і

(c) домен VH першого поліпептидного ланцюга та домен VL другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом grA33.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачене біспецифічне моновалентне Fc-діатіло, причому біспецифічне моновалентне Fc-діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом grA33 і з епітопом CD3 і має домен Fc IgG, причому біспецифічне моновалентне Fc-діатіло містить перший поліпептидний ланцюг, другий поліпептидний ланцюг і третій поліпептидний ланцюг, причому перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і перший та третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і при цьому:

А. перший поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 3, який містить субдомен (3А), що містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) (SEQ ID NO:39) і субдомен (3В), що містить поліпептидну частину домена Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG;

ii. домен 1, який містить субдомен (1А), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VL<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:26), і субдомен (1В), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25), причому субдомени (1А) і (1В) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:1);

причому домени 1 і 3 відділені один від одного спейсерним пептидом (лінкером 4) (SEQ ID



NO:38);

iii. домен 2, причому домен 2 являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO:3) або К-спіральний домен (SEQ ID NO:4), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:2); і

5 В. другий поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця:

i. домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5); і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:27); причому субдомени (1A) і (1B) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO:1);

10 ii. домен 2, причому домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO:4) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO:3), причому домен 2 відділений від домена 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO:2); і причому домен 2 першого поліпептидного ланцюга та домен 2 другого поліпептидного ланцюга не являють собою обидва Е-спіральних домена або обидва К-спіральних домена; і

15 С. третій поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця, домен 3, який містить:

(1) субдомен (3A), що містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) (SEQ ID NO:39); і

(2) субдомен (3B), що містить поліпептидну частину домена Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG;

20 і при цьому:

(a) поліпептидні частини доменів Fc IgG першого та третього поліпептидного ланцюга утворюють домен Fc IgG;

(b) домен VL першого поліпептидного ланцюга та домен VH другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і

25 (c) домен VH першого поліпептидного ланцюга та домен VL другого поліпептидного ланцюга утворюють антигензв'язуючий домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом gpA33.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачені варіанти здійснення кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, у яких субдомен (3B) першого поліпептидного ланцюга містить послідовність, відмінну від послідовності субдомени (3B) третього поліпептидного ланцюга.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачені варіанти здійснення описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, у яких субдомен (3B) першого поліпептидного ланцюга характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:40, і субдомен (3B) третього поліпептидного ланцюга характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:41.

35 Відповідно до даного винаходу додатково передбачені варіанти здійснення описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, у яких субдомен (3B) першого поліпептидного ланцюга характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:41, і субдомен (3B) третього поліпептидного ланцюга характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:40.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачені варіанти здійснення описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, у яких домен 3 першого поліпептидного ланцюга та/або домен 3 третього поліпептидного ланцюга містить варіантну послідовність CH2-CH3, що проявляє змінене зв'язування з рецептором Fcγ.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачені варіанти здійснення кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл або кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, у яких домен 2 першого поліпептидного ланцюга містить Е-спіраль (SEQ ID NO:3), і домен 2 другого поліпептидного ланцюга містить К-спіраль (SEQ ID NO:4).

Відповідно до даного винаходу додатково передбачені варіанти здійснення кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл або кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, у яких домен 2 першого поліпептидного ланцюга містить К-спіраль (SEQ ID NO:4), і домен 2 другого поліпептидного ланцюга містить Е-спіраль (SEQ ID NO:3).

Відповідно до даного винаходу додатково передбачене біспецифічне моновалентне діатіло, причому біспецифічне моновалентне діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD3 і з епітопом gpA33, причому біспецифічне моновалентне діатіло містить наступне:

(1) перший поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:28, і другий поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:30; або

60 (2) перший поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:35, і другий поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю

SEQ ID NO:30;

причому перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним дисульфідним зв'язком.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачене біспецифічне моновалентне Fc-діатіло, причому біспецифічне моновалентне Fc-діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD3 і з епітопом grA33 і має домен Fc IgG, причому біспецифічне моновалентне Fc-діатіло містить наступне:

(1) перший поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:42, другий поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:44, і третій поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:46; або

(2) перший поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:48, другий поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:28, і третій поліпептидний ланцюг, що характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:46;

причому перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним першим дисульфідним зв'язком, і перший та третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним другим дисульфідним зв'язком.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачена фармацевтична композиція, яка містить кожне з описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл або кожне з описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл; і фізіологічно прийнятний носій.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачене застосування описаної вище фармацевтичної композиції в лікуванні злоякісної пухлини, що характеризується експресією grA33, і, головним чином, таке застосування, при якому злоякісна пухлина являє собою колоректальний рак, рак товстої кишки, рак шлунку або рак підшлункової залози.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачена клітина, яка експресує поліпептидний ланцюг кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних діатіл або кожного з описаних вище біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, а також полінуклеотид, що кодує такий експресований поліпептид.

Відповідно до даного винаходу додатково передбачена клітина, яка експресує антитіло або його поліпептидну частину або фрагмент, причому антитіло зв'язується з grA33, і при цьому антитіло або його поліпептидна частина або фрагмент містить:

(1) CDR1 (SEQ ID NO:14), CDR2 (SEQ ID NO:15) і CDR3 (SEQ ID NO:16) легкого ланцюга антитіла до grA33 людини;

(2) CDR1 (SEQ ID NO:18), CDR2 (SEQ ID NO:19) і CDR3 (SEQ ID NO:20) важкого ланцюга антитіла до grA33 людини; або

(3) як (1), так і (2).

Короткий опис графічних матеріалів

На фігурі 1 проілюстровані структури першого та другого поліпептидних ланцюгів двохланцюгового grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла відповідно до даного винаходу.

На фігурах 2A і 2B проілюстровані структури двох версій першого, другого та третього поліпептидних ланцюгів трьохланцюгового grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного Fc-діатіла відповідно до даного винаходу (версія 1, фігура 2A; версія 2, фігура 2B).

На фігурі 3 продемонстровано, що діатіла відповідно до даного винаходу здатні одночасно зв'язуватися з CD3 і з grA33.

На фігурі 4 проілюстрована здатність діатіл відповідно до даного винаходу лікувати злоякісну пухлину. Клітини колоректального раку або клітини раку підшлункової залози інкубували у присутності grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла ("DART-1") і або PBMC людини (E:T=25:1), або активованих Т-клітин людини (E:T=10:1), і вимірювали цитотоксичність (фігура 4A (клітини колоректального раку Colon CSC), фігура 4B (клітини колоректального раку Colo205), і фігура 4C (клітини раку підшлункової залози ASPC-1)).

На фігурах 5A-5F показано, що активація Т-клітин CD8 відбувалася у присутності біспецифічного моновалентного діатіла до CD3 ("DART-1") тільки у присутності злоякісної клітини (фігури 5A-5C: CD8 Т-клітини + клітини colo205 (фігура 5A), Т-клітини CD8 + клітини ASPC-1 (фігура 5B), Т-клітини CD8 окремо (фігура 5C); фігури 5D-5F: Т-клітини CD4 + клітини colo205 (фігура 5D), Т-клітини CD4+ клітини ASPC-1 (фігура 5E), Т-клітини CD8 окремо (фігура 5F)).

На фігурах 6A-6D показано, що grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла (DART-1 і DART-2) опосередкували еквівалентну цитотоксичність відносно клітин колоректальної аденокарциноми SW948 (фігура 6A) і клітин colo205 (фігура 6B) і клітин Colo205-Luc (фігура 6C),

і що жодне діатіло не опосередкувало цитотоксичність grA33-негативної клітинної лінії злоякісної пухлини, HCT116 (фігура 6D).

На фігурах 7A-7D показана здатність grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-2), grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-2 з ABD "w/ABD") і grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc імуноглобуліну IgG (DART-2 з Fc "w/Fc") стимулювати цитотоксичність злоякісних клітин у присутності РВМС людини або яванського макака.

На фігурі 8 продемонстрована *in vivo* здатність grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-1) зменшувати об'єм пухлини в мишачій моделі раку товстої кишки Colo205.

На фігурах 9A-9D показані дані скінтиграфії пухлин у мишей NOD (страждаючих діабетом без ожиріння), scid (з важкою комбінованою імунною недостатністю), гамма (NSG), яким імплантували клітини Colo205 через два дні після одержання інертного носія (фігура 9A) або grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло (DART-1) (фігура 9B), і через 12 днів після одержання інертного носія (фігура 9C) або DART-1 (фігура 9D).

На фігурі 10 продемонстрована *in vivo* здатність grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-1) зменшувати об'єм пухлини в мишачій моделі раку підшлункової залози ASPC-1.

На фігурі 11 показана здатність grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc імуноглобуліну IgG (версія 1DART-2 w/Fc) опосередкувати різке зниження об'єму пухлини в *in vivo* моделі раку товстої кишки.

На фігурі 12 показана здатність grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc імуноглобуліну IgG (версія 1DART-2 w/Fc) опосередкувати зниження об'єму пухлини в *in vivo* моделі раку товстої кишки навіть у вкрай низьких дозах.

На фігурі 13 показана фармакокінетика grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-2) і grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc імуноглобуліну IgG (версія 1DART-2 w/Fc) у яванських макака.

На фігурах 14A-14B показаний аналіз SPR зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc з іммобілізованим CD3 людини й яванського макака. Чорні пунктирні лінії представляють глобальну апроксимацію 1:1 моделі Ленгмюра кривих зв'язування, отриманих при концентраціях DART-2 w/Fc, що становлять 0, 6,25, 12,5, 25, 50 або 100нМ. Дані є репрезентативними для трьох незалежних експериментів.

На фігурах 15A-15B показаний аналіз SPR зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc із захопленням grA33 людини й яванського макака. Чорні пунктирні лінії представляють глобальну апроксимацію 1:1 моделі Ленгмюра кривих зв'язування, отриманих при концентрації версії 1 DART-2 w/Fc, що становить 0, 6,25, 12,5, 25, 50 або 100 нМ. Дані є репрезентативними для трьох незалежних експериментів.

Докладне розкриття даного винаходу

Даний винахід відноситься до біспецифічних моновалентних діатіл, які містять два поліпептидних ланцюги й які характеризуються наявністю одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу CD3 (тобто "grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло"). Даний винахід також відноситься до біспецифічних моновалентних діатіл, які містять домен Fc імуноглобуліну ("біспецифічні моновалентні Fc-діатіла") і складаються з трьох поліпептидних ланцюгів й які характеризуються наявністю одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу CD3 (тобто а "grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне Fc-діатіло"). Біспецифічні моновалентні діатіла та біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу здатні одночасно зв'язуватися з grA33 і CD3. Даний винахід відноситься до фармацевтичних композицій, які містять такі біспецифічні моновалентні діатіла або такі біспецифічні моновалентні Fc-діатіла. Даний винахід додатково відноситься до способів застосування таких діатіл у лікуванні злоякісної пухлини та інших захворювань і станів.

grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла відповідно до даного винаходу складаються з двох поліпептидних ланцюгів, які асоціюються один із одним з утворенням одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу CD3. Окремі поліпептидні ланцюги діатіла ковалентно зв'язані один із одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. Кожний поліпептидний ланцюг містить антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга, антигензв'язуючий домен варіабельного домена важкого ланцюга та домен гетеродимеризації. Проміжний лінкерний пептид (лінкер 1) відокремлює антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга

від антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга. Антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга з утворенням першого функціонального антигензв'язуючого сайту, що є специфічним відносно першого антигена (тобто або grA33, або CD3). Аналогічно, антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга з утворенням другого функціонального антигензв'язуючого сайту, що є специфічним відносно другого антигена (тобто або grA33, або CD3, залежно від ідентичності першого антигена). Таким чином, вибір антигензв'язуючого домена варіабельного домена легкого ланцюга та антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга першого та другого поліпептидного ланцюгів скоординований так, щоб два поліпептидних ланцюги спільно містили антигензв'язуючі домени варіабельних доменів легкого та важкого ланцюга, здатні зв'язуватися з grA33 і CD3.

grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу складаються з першого поліпептидного ланцюга, другого поліпептидного ланцюга та третього поліпептидного ланцюга. Перший та другий поліпептидні ланцюги асоціюються один із одним з утворенням одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу grA33, і одного сайту зв'язування, специфічного у відношенні епітопу CD3. Перший поліпептидний ланцюг і третій поліпептидний ланцюг асоціюються один із одним з утворенням домена Fc імуноглобуліну. Перший та другий поліпептидні ланцюги біспецифічного моновалентного Fc-діатіла ковалентно зв'язані один із одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. Перший та третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах кожного поліпептидного ланцюга. Кожний з першого та другого поліпептидних ланцюгів містить антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга, антигензв'язуючий домен варіабельного домена важкого ланцюга та домен гетеродимеризації. Проміжний лінкерний пептид (лінкер 1) відокремлює антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга від антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга. Антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга з утворенням першого функціонального антигензв'язуючого сайту, що є специфічним відносно першого антигена (тобто або grA33, або CD3). Аналогічно, антигензв'язуючий домен варіабельного домена легкого ланцюга другого поліпептидного ланцюга взаємодіє з антигензв'язуючим доменом варіабельного домена важкого ланцюга першого поліпептидного ланцюга з утворенням другого функціонального антигензв'язуючого сайту, що є специфічним відносно другого антигена (тобто або grA33, або CD3, залежно від ідентичності першого антигена). Таким чином, вибір антигензв'язуючого домена варіабельного домена легкого ланцюга й антигензв'язуючого домена варіабельного домена важкого ланцюга першого та другого поліпептидного ланцюгів скоординований так, щоб два поліпептидних ланцюги спільно містили антигензв'язуючі домени варіабельних доменів легкого та важкого ланцюга, здатні зв'язуватися з grA33 і CD3. Кожний з першого та третього поліпептидних ланцюгів містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) SEQ ID NO:39: і частково або повністю домен CH2 і/або частково або повністю домен CH3 повного домена Fc імуноглобуліну та цистеїновмісний пептид. Деяка частина або весь домен CH2 і/або деяка частина або весь домен CH3 асоціюються з утворенням домена Fc імуноглобуліну біспецифічних моновалентних Fc-діатіл відповідно до даного винаходу. Перший та третій поліпептидні ланцюги біспецифічних моновалентних Fc-діатіл відповідно до даного винаходу ковалентно зв'язані один із одним, наприклад, шляхом зв'язування дисульфідним зв'язком цистеїнових залишків, розташованих у межах цистеїновмісного пептиду поліпептидних ланцюгів.

Утворення гетеродимерів першого та другого поліпептидних ланцюгів біспецифічного моновалентного діатіла або біспецифічного моновалентного Fc-діатіла може керуватися доменами гетеродимеризації. Такі домени містять у собі GVEPKSC (SEQ ID NO:54) (або VEPKSC; SEQ ID NO:55) на одному поліпептидному ланцюзі та GFNRGEC (SEQ ID NO:56) (або FNRGEC; SEQ ID NO:57) на іншому поліпептидному ланцюзі (US2007/0004909). Альтернативно, такі домени можуть бути сконструйовані так, щоб вони містили спіралі протилежних зарядів. Домен гетеродимеризації одного з поліпептидних ланцюгів містить послідовність щонайменше з шести, щонайменше з семи або щонайменше з восьми позитивно заряджених амінокислот, і домен гетеродимеризації іншого поліпептидного ланцюга містить послідовність щонайменше з

шести, щонайменше з семи або щонайменше з восьми негативно заряджених амінокислот. Наприклад, перший або другий домени гетеродимеризації може містити послідовність, що містить вісім позитивно заряджених амінокислот, і інші з доменів гетеродимеризації можуть містити послідовність, що містить вісім негативно заряджених амінокислот. Позитивно заряджена амінокислота може являти собою лізин, аргінін, гістидин і так далі та/або негативно заряджена амінокислота може являти собою глутамінову кислоту, аспарагінову кислоту і так далі. Позитивно заряджена амінокислота переважно являє собою лізин і/або негативно заряджена амінокислота переважно являє собою глутамінову кислоту.

Біспецифічні моновалентні діатіла та біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу сконструйовані так, щоб такі перші та другі поліпептидні ланцюги були ковалентно зв'язані один із одним за допомогою цистеїнових залишків вздовж їхньої довжини. Такі цистеїнові залишки можуть бути введені у проміжний лінкер, який відокремлює домени VL і VH поліпептидів. Альтернативно та більш переважно, другий пептид (лінкер 2) введений у кожний з поліпептидних ланцюгів, наприклад, на аміно-кінці поліпептидних ланцюгів або у положенні, що поміщає лінкер 2 між доменом гетеродимеризації й антигензв'язуючим доменом варіабельного домена легкого ланцюга або варіабельного домена важкого ланцюга.

Як зазначено вище, grA33 експресується клітинами колоректального раку. Антитіла, здатні імуноспецифічно зв'язуватися з grA33, здатні зв'язуватися з такими клітинами. CD3 експресується на Т-клітинах. Таким чином, антитіла, здатні імуноспецифічно зв'язуватися як з grA33, так і з CD3, здатні направляти Т-клітини на клітини колоректального раку та інші злоякісні клітини, які експресують grA33 (наприклад, клітини карциноми товстої кишки, клітини раку підшлункової залози і так далі) і, таким чином, забезпечувати поліпшену терапію для таких злоякісних пухлин.

I. Переважні grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла відповідно до даного винаходу

A. grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла

Відповідно до одного варіанта здійснення даного винаходу передбачені grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла, які складаються з першого поліпептидного ланцюга та другого поліпептидного ланцюга, чиї послідовності дозволяють поліпептидним ланцюгам ковалентно зв'язатися один із одним з утворенням ковалентно-асоційованого комплексу, що здатний одночасно зв'язуватися як з grA33, так і з CD3.

Перший поліпептидний ланцюг переважних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл містить у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з CD3, або з grA33 (тобто або VL<sub>CD3</sub>, або VL<sub>grA33</sub>), перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33 (якщо такий перший поліпептидний ланцюг містить VL<sub>CD3</sub>), або з CD3 (якщо такий перший поліпептидний ланцюг містить VL<sub>grA33</sub>), цистеїновмісний другий проміжний спейсерний пептид (лінкер 2), домен, що стимулює утворення гетеродимера, і C-кінець (фігура 1).

Другий поліпептидний ланцюг переважних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл містить у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33, або з CD3 (тобто або VL<sub>grA33</sub>, або VL<sub>CD3</sub>, залежно від домена VL, вибраного для першого поліпептидного ланцюга діатіла), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного або зв'язуватися з CD3 (якщо такий другий поліпептидний ланцюг містить VL<sub>grA33</sub>), або з CD3 (якщо такий другий поліпептидний ланцюг містить VL<sub>CD3</sub>), цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2), домен, що стимулює утворення гетеродимера, і C-кінець (фігура 1).

Домен VL першого поліпептидного ланцюга переважних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл взаємодіє з доменом VH другого поліпептидного ланцюга переважних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл з утворенням першого функціонального антигензв'язуючого сайту, що є специфічним відносно першого антигена (тобто або CD3, або grA33). Аналогічно, домен VL другого поліпептидного ланцюга взаємодіє з доменом VH першого поліпептидного ланцюга з утворенням другого функціонального антигензв'язуючого сайту, що є специфічним відносно другого антигена (тобто або grA33, або CD3, залежно від ідентичності першого антигена). Таким чином, вибір доменів VL і VH першого та другого поліпептидних ланцюгів скоординований так, щоб два поліпептидних ланцюги переважних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл спільно містили домени VL і VH, здатні зв'язуватися з grA33 і CD3 (тобто вони містять VL<sub>CD3</sub>/VH<sub>CD3</sub> і VL<sub>grA33</sub>/VH<sub>grA33</sub>).

Довжина проміжного лінкерного пептиду (лінкера 1, що відокремлює такі домени VL і VH) найбільш переважно вибрана так, щоб істотно або повністю запобігати зв'язуванню доменів VL і VH поліпептидного ланцюга один із одним. Таким чином, домени VL і VH першого поліпептидного ланцюга істотно або повністю не здатні зв'язуватися один із одним. Аналогічно,

домени VL і VH другого поліпептидного ланцюга істотно або повністю не здатні зв'язуватися один із одним. Переважний проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) характеризується послідовністю (SEQ ID NO:1): GGGSGGGG.

Цистеїновмісний другий проміжний спейсерний пептид (лінкер 2) буде містити 1, 2, 3 або більше цистеїнів. Переважний цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) характеризується послідовністю SEQ ID NO:2: GCGGGG.

Домени, що стимулюють утворення гетеродимера, першого та другого поліпептидів відрізняються один від одного та сконструйовані, щоб асоціюватися один із одним так, щоб стимулювати асоціацію першого та другого поліпептидних ланцюгів. Таким чином, відповідно до переважного варіанта здійснення один із цих поліпептидних ланцюгів буде сконструйований, щоб містити "Е-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:3):

**EVAALKEKEVAALKEKEVAALKEKEVAALKE**

чії залишки будуть формувати негативний заряд при pH 7, тоді як інший з двох поліпептидних ланцюгів буде сконструйований так, щоб містити "К-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:4):

**KVAALKEKEVAALKEKEVAALKEKEVAALKE**

чії залишки будуть формувати позитивний заряд при pH 7. Присутність таких заряджених доменів стимулює асоціацію між першим і другим поліпептидами й, таким чином, сприяє гетеродимеризації. Несуттєво, яка спіраль забезпечується яким ланцюгом, за умови, що спіралі, які використовуються на першому і другому поліпептидних ланцюгах розрізняються так, щоб сприяти гетеродимеризації між такими ланцюгами.

1. gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, "DART-1"

Перший та другий поліпептидні ланцюги переважного gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, позначеного в даному документі як "DART-1", містять поліпептидні домени, які характеризуються наступними послідовностями:

Домен VL антитіла, що зв'язує CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5):

**QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR  
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG**

Антигензв'язуючий домен VL<sub>CD3</sub> містить CDR1 з послідовністю: (SEQ ID NO:6) RSSTGAVTTSNYAN; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:7): GTNKRAP; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:8): ALWYSNLWV.

Домен VH антитіла, що зв'язує CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:9):

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYA  
DSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVVSS**

Антигензв'язуючий домен VH<sub>CD3</sub> містить: CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:10): TYAMN; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:11) RIRSKYNNYATYYADSVKD; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:12): HGNFGNSYVSWFAY.

Домен VL мишачого антитіла, що зв'язує gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:13):

**QIVLTQSPAIMASPGERVMTCSARSSISFMYWYQQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVPVRFSGSG  
SGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGSGTKLELK**

Антигензв'язуючий домен VL<sub>gpA33</sub> містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:14): SARSSISFMY; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:15): DTSNLAS; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:16): QQWSSYPLT.

Домен VH мишачого антитіла, що зв'язує gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:17):

**QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPQGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGK  
FKDKATLTADKSTTAYMELSSLTSDSAVYFCARIYGNNVYFDVWGAGTTTVTVSS**

Антигензв'язуючий домен VH<sub>gpA33</sub> містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:18): GSWMN; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:19): RIYPGDGETNYNGKFKD; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:20): IYGNNVYFDV.

Перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) характеризується послідовністю (SEQ ID NO:1): GGGSGGGG. Цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) характеризується послідовністю SEQ ID NO:2: GCGGGG.

Домен, що стимулює утворення гетеродимера, першого поліпептидного ланцюга являє собою "Е-спіральний" домен (SEQ ID NO:3). Домен, що стимулює утворення гетеродимера, другого поліпептидного ланцюга являє собою "К-спіральний" домен (SEQ ID NO:4).

Таким чином, перший поліпептидний ланцюг DART-1 характеризується послідовністю (SEQ ID NO:21):

**QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR  
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQVQLQQSGPE  
LVKPGASVKISCKASGYTFSGSWMNWVKQRPQGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDKATLTADKSS**

TTAYMELSSSLTSVDSAVYFCARIYGNNVYFDVWGAGTTTVTVSSGGCGGGGEVAALEKEVAALEKEVAA  
LEKEVAALEK

Варто брати до уваги, що залишки 1-110 SEQ ID NO:21 являють собою домен VL антитіла, що зв'язує CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5); залишки 111-118 SEQ ID NO:21 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 119-237 SEQ ID NO:21 являють собою домен VH мишачого антитіла, що зв'язує gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:17), залишки 238-243 SEQ ID NO:21 являють собою цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2) і залишки 244-271 SEQ ID NO:21 являють собою "Е-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:3).

Переважний поліпептид, що кодує перший поліпептидний ланцюг DART-1, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:22):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtcccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgga  
ccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcacaaggggctgatcggggtacaaacaaaagggtccctgg  
accctgcacgggttttctggaagtctgctggcggaagggcgtctgactattaccgggacagggcagagacgaagccgattactattgt  
gctctgtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaacaaactgactgtgctgggaggtggtgagccggcgaggtggacaggtccag  
ctgcagcagctgtggacgtgagctgggaagcctggggcctcagtgaaagatttctgcaaaagcttcaggctacacattcagtggtgcttggatgaa  
ctgggtgaagcagaggcctggagaggtgctgagtggtgagtgagcaggtactaccctggagatggagaaactaactacaatgggaagtttaagg  
acaaggccacactgactgcagacaaatcatccaccacagcctacatggagctcagcagcctgacctctgtggactctgcggtctatttctgtgc  
aagaatctatggaataacgtttacttcgatgtctggggcgagggaccacgggtcaccgtgtctccggaggtatgtggcggtggagaagtgggcc  
gcactggagaaagaggtgctgcttggagaaggaggtcgtgcacttgaaaaggaggtcgcagccctggagaaa

Другий поліпептидний ланцюг DART-1 характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:23):

QIVLTQSPAIMSASPGERVMTCSARSSISFMWYQQKPGSSPRLIYDTSNLASGVPVRFSGSG  
SGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFSGGTKLELKRGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPG  
GSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSL  
YLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEK  
VAALKEKVAALKE

Варто брати до уваги, що залишки 1-107 SEQ ID NO:23 являють собою домен VL мишачого антитіла, що зв'язує gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:13); залишки 108-115 SEQ ID NO:23 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 116-240 SEQ ID NO:23 являють собою домен VH антитіла, що зв'язує CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:9), залишки 241-246 SEQ ID NO:23 являють собою цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2) і залишки 247-274 SEQ ID NO:23 являють собою "К-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:4).

Переважний поліпептид, що кодує другий поліпептидний ланцюг DART-1, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:24):

Caaattgttctacccagatcctcagcaatcatgtctgcactcaggggagaggtcaccatgacctgcagtgccaggtcaagataagtt  
tcatgtactggtaccagcagaagccaggatcctccccagactcctgattatgacacatccaacctggcttggagtcctgttcgctcagtg  
gcagtggtgctgggacctctattctcacaatcagccgaatggaggctgaagatgctgccacttactgccagcagtgagtagttaccaca  
ctcacgttcggttctgggaccaagctggagctgaaacggggtggaggatccggcgagggcgagaggtgcagctggtggagctctggggga  
ggcttggtccagcctggaggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctcaacacatacgctatgaattgggtccgaggtcc  
agggaaggggctggagtggttgcaaggatcaggtccaagtacaacaattatgaacctactatgccgactctgtgaaggatagattcaccat  
ctcaagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggta  
actcggcaattctcagtgcttctgttgggttctattggggacaggggacactggtgactgtgtctccggaggtatgtggcggtggaaaagtggccgc  
actgaaggagaaagttgctgcttgaagagaaggtcgccgacttaaggaaaaggtcgcagccctgaaagag

2. gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, "DART-2"

Перший та другий поліпептидні ланцюги другого переважного gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, позначеного в даному документі як "DART-2", містять поліпептидні домени, що характеризуються наступними послідовностями:

Домен VL антитіла, що зв'язує CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5):

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR  
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLG

Антигензв'язуючий домен VL<sub>CD3</sub> містить CDR1 з послідовністю: (SEQ ID NO:6) RSSTGAVTTSNYAN; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:7): GTNKRAP; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:8): ALWYSNLWV

Домен VH антитіла, що зв'язує CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYA  
DSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVSS

Антигензв'язуючий домен VH<sub>CD3</sub> містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:10): TYAMN; CDR2 з послідовністю: (SEQ ID NO:11): RIRSKYNNYATYYADSVKD; і CDR3 з послідовністю:

(SEQ ID NO:12) HGNGNSYVSWFAY.

Обговорюване вище мишаче антитіло, що зв'язується з gpA33 людини, гуманізували для одержання доменів VL і VH переважного діатіла DART-2. Зазначені гуманізовані домени представлені нижче:

5 Домен VL гуманізованого антитіла, що зв'язує gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:26):

DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGS  
GTEFTLTISLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIK

10 Антигензв'язуючий домен VL<sub>gpA33</sub> містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:14): SARSSISFMY; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:15): DTSNLAG; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:16): QQWSSYPLT.

Домен VH гуманізованого антитіла, що зв'язує gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:27):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNG  
KFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTITVTVSS

15 Антигензв'язуючий домен VH<sub>gpA33</sub> містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:18): GSWMN; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:19): RIYPGDGETNYNGKFKD; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:20): IYGNNVYFDV.

Перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) характеризується послідовністю (SEQ ID NO:1): GGGSGGGG. Цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) характеризується послідовністю SEQ ID NO:2: GCGGGG.

20 Домен, що стимулює утворення гетеродимера, першого поліпептидного ланцюга являє собою "Е-спіральний" домен (SEQ ID NO:3). Домен, що стимулює утворення гетеродимера, другого поліпептидного ланцюга являє собою "К-спіральний" домен (SEQ ID NO:4).

Таким чином, перший поліпептидний ланцюг DART-2 характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:28):

25 QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR  
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQVQLVQSGAE  
VKKPGASVKVSCKASGYTFTGSWMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDRVTITADKST  
STAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNNVYFDVWGQGTITVTVSSGGCGGGGEVAALKEVAALKEVA  
ALEKEVAALKEK

30 Варто брати до уваги, що залишки 1-110 SEQ ID NO:28 являють собою домен VL антитіла, що зв'язує CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5); залишки 111-118 SEQ ID NO:28 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 119-237 SEQ ID NO:28 являють собою домен VH антитіла, що зв'язує gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:27), залишки 238-243 SEQ ID NO:28 являють собою цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2) і  
35 залишки 244-271 SEQ ID NO:28 являють собою "Е-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:3).

Переважний поліпептид, що кодує перший поліпептидний ланцюг DART-2, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:29):

40 caggctgtgtgactcaggagcctcactgaccgtgtcccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgga  
ccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcggggtacaaacaaaagggtccctgg  
acccctgcacggttttctggaagtctgctggcggaaggccgctctgactattaccgggacagggccaggacgaagccgattactattgt  
gctctgtgtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaactgactgtgtggaggtgtgtggtatccggcgagggtggacaggtccag  
ctgtccagagcggggccgaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggtctctgcaaagcatcaggctatacatcagggcagctgg  
45 atgaactgggtgaggcaggctccaggacagggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaaactaactataatggaaag  
ttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggagctgagctccctgcggtctgaagataccgccgtctact  
attgcgctagaattacggaacaatgtctattttgacgtgtggggcagggaacaactgtgactgtctcctccggaggatgtggcggtggaga  
agtgcccgactggagaaagaggtgtgctgttgagaaaggaggtcgctgacttgaaaaggaggtcgagccctggagaaa

Другий поліпептидний ланцюг DART-2 характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:30):

50 DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCSARSSISFMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGS  
GTEFTLTISLEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTKLEIKGGGSGGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSL  
RLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ  
MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAAL  
LKEKVAALKEK

55 Варто брати до уваги, що залишки 1-106 SEQ ID NO:30 являють собою домен VL антитіла, що зв'язує gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:26); залишки 107-114 SEQ ID NO:30 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 115-239 SEQ ID NO:30 являють собою домен VH антитіла, що зв'язує CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25), залишки 240-245  
60 SEQ ID NO:30 являють собою цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2) і залишки 246-273 SEQ ID NO:30 являють собою "К-спіральний" домен, що стимулює утворення



гетеродимера (SEQ ID NO:4).

Переважає поліпептидний ланцюг DART-2, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:31):

5 Gacattcagctgactcagctccccccttttctgtccgcatccgtcggagatcagtgactattactgtctgtaggtcctcaatcagcttcat  
gtactggatcagcagaagcccgcaagcacctaagctgctgatctacgacacaagcaacctggcctccgggtgccatctcggttctctgg  
cagtggtcaggaactgagttaccctgacaattagctccctggaggctgaagatgccgctacctactattgccagcagtgaggcagctatcct  
ctgacctcggacaggggactaaactggaaatcaaggggtggaggatccggcgccggaggcaggtgcagctggtggagctggtggagg  
cttggtccagcctggagggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgcccagggtccag  
ggaaggggtggagtggttggaaggatcaggtccaagtacaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagattcaccatct  
10 caagagatgattcaagaactcactgtatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaac  
ttcggcaattctacgtgtcttggttgcttattgggacaggggacactggtgactgtgtctccggaggatgtggcggtgaaaagtgccgcac  
tgaaggagaaggtgtgtcttgaaagagaaggtgcgcgacttaaggaaaaggtgcagccctgaaagag

3. grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить альбумінзв'язуючий домен (ABD) ("DART-2 w/ABD")

15 Відповідно до іншого варіанта здійснення даного винаходу grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло буде містити альбумінзв'язуючий домен ("ABD") (grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло з ABD).

Як розкрито в міжнародній патентній публікації WO 2012/018687, для поліпшення *in vivo* фармакокінетичних властивостей молекул діатіл молекули можуть бути модифіковані так, щоб  
20 вони містили поліпептидну частину білка, що зв'язується з сироватковими білками, на одному або декількох кінцях молекули діатіла. Найбільш переважно, така поліпептидна частина білка, що зв'язується з сироватковими білками, буде вбудована на С-кінці молекули діатіла. Особливо переважна поліпептидна частина білка, що зв'язується з сироватковими білками, для цієї мети являє собою альбумінзв'язуючий домен (ABD) з білка G стрептокока. Альбумінзв'язуючий домен  
25 3 (ABD3) білка G штаму *Streptococcus* G148 є особливо переважним.

Альбумінзв'язуючий домен 3 (ABD3) білка G штаму *Streptococcus* G148 складається з 46 амінокислотних залишків, що утворюють стабільну трьохспіральну структуру, і характеризується широкою альбумінзв'язуючою специфічністю (Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules", J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120).  
30 Альбумін являє собою найпоширеніший білок у плазмі та характеризується періодом напіввиведення, що становить 19 днів у людей. Альбумін містить декілька низькомолекулярних сайтів зв'язування, які дозволяють йому нековалентно зв'язуватися з іншими білками і, тим самим, продовжувати їхні періоди напівжиття в сироватці.

Таким чином, перший поліпептидний ланцюг або другий поліпептидний ланцюг grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить альбумінзв'язуючий домен, містить третій лінкер (лінкер 3), що відокремлює Е-спіраль (або К-спіраль) такого поліпептидного ланцюга від альбумінзв'язуючого домена. Переважна послідовність такого лінкера 3 являє собою GGGG (SEQ ID NO:32) або GGGNS (SEQ ID NO:33). Переважає альбумінзв'язуючий домен (ABD) характеризується наступною амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:34):

40 LAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAAALP

Щоб проілюструвати цей аспект даного винаходу, перший поліпептидний ланцюг описаний вище DART-2 модифікували так, щоб він містив альбумінзв'язуючий домен, приводячи в результаті до утворення grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить ABD, позначеного в даному документі як "DART-2 w/ABD".

45 Перший поліпептидний ланцюг такого DART-2 w/ABD характеризується наступною амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:35):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR  
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGQVQLVQSGAE  
VKKPGASVKVSKASGYFTGSMNWVRQAPGQGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDRVITADKST  
50 STAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVYFDVWGGGTTVTVSSGGCGGGEVAALEKEVALEKEVA  
ALEKEVAALEKGGGSLAQAKEAAIRELDKYGVSDYYKNLIDNAKSAEGVKALIDEILAAALP

Варто брати до уваги, що залишки 1-271 SEQ ID NO:35 є ідентичними залишкам 1-271 DART-2 і, таким чином, представляють, у напрямку від N-кінця до С-кінця, домен VL антитіла, що зв'язує CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5); перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); домен VH антитіла, що зв'язує grA33 (VH<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:27), цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2), "Е-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:3), і С-кінець. Залишки 272-275 являють собою лінкер 3 (SEQ ID NO:32), і залишки 276-321 являють собою альбумінзв'язуючий домен (SEQ ID NO:34).

60 Переважає поліпептидний ланцюг DART-2 w/ABD, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:36):

caggctgtggtgactcaggagccttcactgaccgtgtccccaggcggaactgtgaccctgacatgcagatccagcacaggcgagtgga  
ccacatctaactacgccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaaggggctgatcggggtacaaacaaaagggctccctgg  
acccctgcacggttttctggaagtctgctggcggaaggccgctctgactattaccgggacagggcgaggacgaagccgattactattgt  
gctctgtgtatagcaatctgtgggtgtcgggggtggcacaactgactgtgctgggaggggggtgatccggcgaggtggacaggtcca  
5 gctgttcagagcggggccgaagtcaaaaaacccggagcaagcgtgaaggtctcctgcaaagcatcaggctatacattacaggcagctg  
gatgaactgggtgaggcaggctccaggacagggactggagtgatcgggcgatctaccctggagacggcgaaactaactataatggaaa  
gttcaaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtagccgctcatatggagctgagctccctcggtctgaagataccgctgta  
ctattgcgctagaatttacggaacaatgtctattttgacgtgtggggcagggacaactgtgactgtctcctccggaggatgtggcggtggag  
aagtggccgcactggagaaagaggtgctgctttggagaaggaggtcgctgcactgaaaaggaggtcgagccctggagaaagggcgcg  
10 ggtctctggcccaggcaaaagaggcagccatccgcgaactggataaatatggcgtgagcgattattataagaacctgattgacaacgcaaa  
atccgcggaaggcgtaagcactgattgatgaattctggccgacctgcct

Другий поліпептидний ланцюг DART-2 w/ABD є таким самим, як обговорюваний вище другий поліпептидний ланцюг DART-2 (SEQ ID NO:30).

В. grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла, які містять домен Fc IgG ("DART-2 w/Fc")

15 Відповідно до додаткового варіанта здійснення даний винахід передбачає grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла, що містять домен Fc IgG. Відповідно, такі діатіла в даному документі називаються "grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла". Домен Fc Fc-діатілу відповідно до даного винаходу може являти собою або повну область Fc (наприклад, повну область Fc IgG) або тільки фрагмент повної області Fc. Хоча домен Fc біспецифічних моновалентних Fc-діатілу відповідно до даного винаходу може мати здатність зв'язуватися з одним або декількома рецепторами Fc (наприклад, FcγR), більше переважно такий домен Fc буде викликати знижене зв'язування з FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) або FcγRIIIB (CD16b) (щодо зв'язування, що проявляється областю Fc дикого типу) або буде істотно усувати здатність такого домена Fc зв'язуватися з таким(и) рецептором(ами). Домен Fc біспецифічних моновалентних Fc-діатілу відповідно до даного винаходу може містити в собі частково або повністю домен CH2 і/або частково або повністю домен CH3 повної області Fc або може містити варіантну послідовність CH2 і/або варіантну послідовність CH3 (яка може містити в собі, наприклад, одну або декілька вставок і/або одну або декілька делецій відносно доменів CH2 або CH3 повної області Fc). Домен Fc біспецифічних моновалентних Fc-діатілу відповідно до даного винаходу може містити не стосовні до Fc поліпептидні частини, або може містити частини не повних областей Fc, що зустрічаються у природі, або може містити орієнтації доменів CH2 і/або CH3, які не зустрічаються у природі (такі як, наприклад, два домена CH2 або два домена CH3, або, у напрямку від N-кінця до C-кінця, домен CH3, з'єднаний з доменом CH2, і так далі).

35 Відповідно до першого варіанта здійснення, позначеного як "версія 1" і показаного на фігурі 2A, перший поліпептидний ланцюг ілюстративного grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного Fc-діатіла буде містити у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33, або з CD3 (тобто або VL<sub>grA33</sub>, або VL<sub>CD3</sub>), проміжний спейсерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33 (якщо такий перший поліпептидний ланцюг містить VL<sub>CD3</sub>), або з CD3 (якщо такий перший поліпептидний ланцюг містить VL<sub>grA33</sub>), цистеїновмісний другий проміжний спейсерний пептид (лінкер 2), домен, що стимулює утворення гетеродимера, спейсерний пептид (лінкер 5), цистеїновмісний пептид (пептид 1), домен Fc IgG (переважно, всі або частина доменів CH2 і CH3 області Fc антитіла), і C-кінець.

45 Відповідно до другого варіанта здійснення, позначеного як "версія 2" і показаного на фігурі 2B, перший поліпептидний ланцюг ілюстративного grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного Fc-діатіла буде містити у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, цистеїновмісний пептид (пептид 1), домен Fc IgG (переважно, всі або частина доменів CH2 і CH3 області Fc антитіла), проміжний спейсерний пептид (лінкер 4); домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33, або з CD3 (тобто або VL<sub>grA33</sub>, або VL<sub>CD3</sub>), проміжний спейсерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33 (якщо такий перший поліпептидний ланцюг містить VL<sub>CD3</sub>), або з CD3 (якщо такий перший поліпептидний ланцюг містить VL<sub>grA33</sub>), цистеїновмісний другий проміжний спейсерний пептид (лінкер 2), домен, що стимулює утворення гетеродимера, і C-кінець.

55 Переважно, відповідно до будь-якого варіанта здійснення домен Fc першого поліпептидного ланцюга буде викликати знижене зв'язування з FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) або FcγRIIIB (CD16b) (щодо зв'язування, що проявляється областю Fc дикого типу) або буде істотно усувати здатність такого домена Fc зв'язуватися з таким(и) рецептором(ами). Варіанти та мутантні форми Fc, здатні опосередкувати таке змінене зв'язування, добре відомі в даній області техніки та містять у собі амінокислотні заміни у

положеннях 234 і 235, заміну в положенні 265 або заміну в положенні 297 (див., наприклад, патент США № 5624821, включений у даний документ за допомогою посилання). Відповідно до переважного варіанта здійснення домен CH2 і CH3 містить у собі заміну в положенні 234 на аланін й у положенні 235 на аланін.

Другий поліпептидний ланцюг таких ілюстративних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл (версії 1 і версії 2) буде містити у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з grA33, або з CD3 (тобто або VL<sub>grA33</sub>, або VL<sub>CD3</sub>, залежно від домена VL, вибраного для першого поліпептидного ланцюга діатіла), проміжний лінкерний пептид (лінкер 1), домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися або з CD3 (якщо такий другий поліпептидний ланцюг містить VL<sub>grA33</sub>), або з CD3 (якщо такий другий поліпептидний ланцюг містить VL<sub>CD3</sub>), цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2), домен, що стимулює утворення гетеродимера (переважно K-спіральний домен), і C-кінець.

Ілюстративні grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла (версія 1 і версія 2) будуть додатково містити третій поліпептидний ланцюг, що буде містити у напрямку від N-кінця до C-кінця, N-кінець, цистеїновмісний пептид (пептид 1), домен Fc IgG (переважно, всі або частину доменів CH2 і CH3 області Fc антитіла), що характеризується таким самим ізотипом, що й домен Fc першого поліпептидного ланцюга, і C-кінець. Домен Fc третього поліпептидного ланцюга переважно буде викликати зниження зв'язування з FcγRIIa (CD64), FcγRIIIa (CD32A), FcγRIIb (CD32B), FcγRIIIa (CD16a) або FcγRIIb (CD16b) (щодо зв'язування, що проявляється областю Fc дикого типу) або буде істотно усувати здатність такого домена Fc зв'язуватися з таким(и) рецептором(ами), як обговорювалося вище, стосовно першого поліпептидного ланцюга ілюстративних grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл.

Необов'язково присутній проміжний спейсерний пептид (лінкер 4) буде переважно містити амінокислотну послідовність (SEQ ID NO:37): APSSS і більш переважно характеризується амінокислотою послідовністю (SEQ ID NO:38): APSSSPME.

Цистеїновмісний пептид (пептид 1) першого та третього поліпептидного ланцюгів і можуть складатися з однієї й тієї самої амінокислотної послідовності або з різних амінокислотних послідовностей і будуть містити 1, 2, 3 або більше цистеїнових залишків. Особливо переважний пептид 1 характеризується амінокислотою послідовністю (SEQ ID NO:39): DKTHTCPPCP.

Проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) переважно характеризується послідовністю SEQ ID NO:1, описаною вище. Цистеїновмісний другий проміжний спейсерний пептид (лінкер 2) переважно характеризується послідовністю SEQ ID NO:2, описаною вище.

Домен, що стимулює утворення гетеродимера, перших і другий поліпептидних ланцюгів grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл буде переважно являти собою описаний вище E-спіральний домен (SEQ ID NO:3) і K-спіральний домен (SEQ ID NO:4), і буде вибраний так, щоб один із таких поліпептидних ланцюгів містив E-спіральний домен, тоді як інший містив K-спіральний домен, як обговорювалося вище.

Переважний спейсерний пептид (лінкер 5) характеризується послідовністю GGG.

Домени CH2 і/або CH3 першого та третього поліпептидів необов'язково повинні бути ідентичними та переважно модифіковані так, щоб сприяти утворенню комплексу між двома поліпептидами. Наприклад, амінокислотна заміна (переважно заміна на амінокислоту, що містить об'ємну бічну групу, що утворює "виступ", наприклад, триптофан) може бути введена в домен CH2 або CH3 так, щоб стеричний вплив запобігав взаємодії з аналогічно мутованим доменом і змушувало мутований домен утворювати пари з доменом, у якому була сконструйована комплементарна мутація, або мутація, що забезпечує розміщення, тобто "западина" (наприклад, заміна на гліцин). Такі набори мутацій можна сконструювати у будь-якій парі поліпептидів, що містять молекулу біспецифічного моновалентного Fc-діатіла, і, крім того, сконструювати у будь-якій частині поліпептидних ланцюгів зазначеної пари. Способи білкової інженерії, щоб сприяти гетеродимеризації замість гомодимеризації, добре відомі в даній області техніки, зокрема, відносно інженерії імунoglobulinopodobних молекул, і передбачені в даному документі (див., наприклад, Ridgway et al. (1996) "'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization", Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) "Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library", J. Mol. Biol. 270: 26-35, і Xie et al. (2005) "A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis", J. Immunol. Methods 296:95-101; кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання). Переважно, що "виступ" конструюють у доменах CH2-CH3 першого поліпептидного ланцюга, а "западину" конструюють у доменах CH2-CH3 третього поліпептидного ланцюга. Таким чином, "виступ" буде сприяти в запобіганні гомодимеризації першого поліпептидного ланцюга за допомогою своїх

доменів CH2 і/або CH3. Оскільки третій поліпептидний ланцюг переважно містить заміну, що забезпечує утворення "западини", вона буде гетеродимеризуватись з першим поліпептидним ланцюгом, а також гомодимеризуватись сама з собою. Переважний виступ створюється шляхом модифікації домена Fc нативної області Fc IgG так, щоб вона містила модифікацію T366W.

5 Переважна западина створюється шляхом модифікації домена Fc нативної області Fc IgG, щоб вона містила модифікацію T366S, L368A і Y407V. Для сприяння в очищенні гомодимера третього поліпептидного ланцюга від кінцевого біспецифічного моновалентного Fc-діатіла, що містить перший, другий і третій поліпептидні ланцюги, сайт зв'язування з білком А доменів CH2 і CH3 третього поліпептидного ланцюга переважно піддають мутації за допомогою

10 амінокислотної заміни у положенні 435 (H435R). Для сприяння в очищенні третій поліпептидний ланцюг гомодимера третього поліпептидного ланцюга від кінцевого біспецифічного моновалентного Fc-діатіла, що містить перший, другий і третій поліпептидні ланцюги, сайт зв'язування з білком А доменів CH2 і CH3 третього поліпептидного ланцюга переважно піддають мутації за допомогою амінокислотної заміни. Таким чином, гомодимер третього

15 поліпептидного ланцюга не буде зв'язуватись з білком А, тоді як біспецифічне моновалентне Fc-діатіло буде зберігати свою здатність зв'язувати білок А через сайт зв'язування з білком А на першому поліпептидному ланцюзі.

Переважаюча послідовність для доменів CH2 і CH3 домена Fc антитіла, що присутній у першому поліпептидному ланцюзі, являє собою (SEQ ID NO:40):

20 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLWCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSV  
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Переважаюча послідовність для доменів CH2 і CH3 домена Fc антитіла, що присутній у третьому поліпептидному ланцюзі, являє собою (SEQ ID NO:41):

25 APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE  
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN  
QVSLSCAVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCSV  
MHEALHNRYTQKSLSLSPGK

#### 30 1. Версія 1 DART-2 w/Fc

Перший, другий і третій поліпептидні ланцюги переважного gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного Fc-діатіла, позначеного в даному документі як "версія 1 DART-2 w/Fc", містять поліпептидні домени, що характеризуються наступними послідовностями:

Перший поліпептидний ланцюг такої версії 1 DART-2 w/Fc характеризується наступною

35 амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:42):

DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSARSSISFYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGVPSRFSGSGSGS  
GTEFTLTISSELEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGQGTLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSL  
RLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQ  
MNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGCGGGGEVAALEKEVALEKEVA  
40 LEKEVALEKEGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK  
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG  
QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSPDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY  
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Варто брати до уваги, що залишки 1-106 SEQ ID NO:42 являють собою домен VL антитіла, що зв'язує gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:26); залишки 107-114 SEQ ID NO:42 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 115-239 SEQ ID NO:42 являють собою домен VH антитіла, що зв'язує CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25); залишки 240-245 SEQ ID NO:42 являють собою цистеїномісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2); залишки 246-273 SEQ ID NO:42 являють собою "Е-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:3); залишки 274-276 являють собою спейсерний пептид GGG (лінкер 5); залишки 277-286 являють собою пептид 1 (SEQ ID NO:39), залишки 277-503 являють собою

50 послідовність для доменів CH2 і CH3 домена Fc антитіла (SEQ ID NO:40).

Переважаючий полінуклеотид, що кодує перший поліпептидний ланцюг версії 1 DART-2 w/Fc, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:43):

55 gacattcagctgactcagctcccccctctttctgtccgcacccgtcgagatcgagtgactattactgtctgtctaggtcctcaatcagcttcag  
tactggtatcagcagaagcccggaagcacctaagctgtgatctacgacacaagcaacctggcctccggggtgccatctcgggtctctggc  
agtgggtcaggaactgagttaccctgacaattagctccctggaggctgaagatgccgtacactattgccagcagtgaggcagctatcctct  
gacctcggacaggggactaaactggaaatcaaggggtggaggatccggcgccggaggcgaggtgcagctgggtggagtctgggggaggct  
tggtccagcctggagggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcaccttcagcacatacgctatgaattgggtccgccaggctccaggg  
60 aaggggctggagtgggttgaaggatcagggtccaagtagaacaattatgcaacctactatgccgactctgtgaaggatagattcaccatctca

agagatgattcaaagaactcactgtatctgc aaatgaacagcctgaaaaccgaggacacggccgtgtattactgtgtgagacacggtaacttc  
ggcaattcttactgtcttggttgcttattggggacaggggacactggtgactgtgtctccggaggatgtggcgggtggagaagtggccgcactg  
gagaaagaggttgctgtcttgagaaaggaggtcgtgcactgaaaaaggaggtcgagccctggagaaagcgggcggggacaaaactca  
cacatgccaccgctgccagcacctgaagcgcggggggaccgtcagctcttctctccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctccc  
ggacccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgca  
taatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaat  
ggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgag  
aaccaagggtgacaccctgccccatccccgggaggagatgaccaaacgaaccaggtcagcgtgtggtgcttgcttgtaaaaggcttctatcccag  
cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcaggagagagaacaactacaagacacgcgtctccgtgctggaactccgacgcgtctcttc  
ctctacagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctcgcacaaccacta  
cacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

Другий поліпептидний ланцюг такої версії 1 DART-2 w/Fc характеризується наступною амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:44):

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPAR  
FSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGQVQLVQSGAE  
VKKPGASVKVSCKASGYTFTGSMWNWVRQAPGGGLEWIGRIYPGDGETNYNGKFKDRVITADKST  
STAYMELSSLRSEDTAVYYCARIYGNVYFDVWGQGTTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVA  
ALKEKVAALKE

Варто брати до уваги, що залишки 1-110 SEQ ID NO:44 являють собою домен VL антитіла, що зв'язує CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:5); залишки 111-118 SEQ ID NO:44 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 119-237 SEQ ID NO:44 являють собою домен VH антитіла, що зв'язує gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO:27), залишки 238-243 SEQ ID NO:44 являють собою цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2) і залишки 244-271 SEQ ID NO:44 являють собою "К-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:4).

Переважний полінуклеотид, що кодує другий поліпептидний ланцюг версії 1 DART-2 w/Fc, характеризується послідовністю (SEQ ID NO:45):

caggctgtggtgactcaggagccttactgaccgtgtcccaaggcggaactgtgacctgacatgcagatccagcacaggcgagtgaccacatctaactacccaattgggtgcagcagaagccaggacaggcaccaggggcctgatcggggtacaaacaaaagggtccctggaccctgcacggttttctggaagtctgctgggcggaaggccgctctgactattaccgggacaggcgaggacgaagccgattactattgtgctctgtggtatagcaatctgtgggtgttcgggggtggcacaaaactgactgtgctggagggggtggatccggcgagggtggacaggtccagctgtccagagcgggggcggaagtcaaaaaaccggagcaagcgtgaaggctctcctgcaaagcatcaggctatacatttacaggcagctgatgaactgggtgaggcaggctccaggacagggactggagtggatcgggcgcatctaccctggagacggcgaaactaactataatggaaagtcaagaccgagtgaccatcacagccgataagtctactagtaccgcctacatggagctgagctccctcggtctgaagataccgccgtctactattgcgctagaatttacggaacaatgtctatttgacgtgtggggcagggaacaactgtgactgtctcctcggaggatgtggcggtggaaagtggccgcactgaaggagaaaagtgtgctgttgaaagagaaggctgcgcgcacttaaggaaaaggctgcagccctgaaagag

Третій поліпептидний ланцюг такої версії 1DART-2 w/Fc характеризується наступною амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:46):

DKTHTCPPCPAEEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFFLVSKLTVDKSRW  
QQGNVFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK

Варто брати до уваги, що залишки 1-10 SEQ ID NO:46 являють собою пептид 1 (SEQ ID NO:39) і залишки 11-227 являють собою домени CH2 і CH3 домена Fc антитіла (SEQ ID NO:41).

Переважний полінуклеотид, що кодує третій поліпептидний ланцюг версії 1 DART-2 w/Fc, характеризується наступною послідовністю (SEQ ID NO:47):

Gacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaagccgcgggggaccgtcagcttctcttcccccaaaacccaagga  
caccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgctgggtggcagctgagccagaaaccctgaggtcaagttcaactggtagctgga  
cggcgtggaggtgcataatgcaagacaaagccgctggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcctgca  
ccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaacaaagccctccagcccccgcgagaaaacctctccaaagcca  
aagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgagttgcgagtc  
aaaggcttctatccagcgacatgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgctggac  
tccgacggctccttctctcgtcagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcagggaacgtcttctcatgtccgtgatgcatgagg  
ctctgcacaaccctacacgcgaagagcctctccctctcctgataa

## 2. Версія 2 DART-2 w/Fc

Перший, другий і третій поліпептидні ланцюги другого переважного grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного Fc-діатіла, позначеного в даному документі як "версія 2 DART-2 w/Fc", містять поліпептидні домени, що характеризуються наступними послідовностями. Серед інших відмінностей, версія 1 DART-2 w/Fc відрізняється від версії 2 DART-2 w/Fc у розташуванні послідовностей CH2 і CH3 першого поліпептидного ланцюга; зазначені послідовності

розташовані на C-кінці щодо послідовностей VL і VH версії 1 DART-2 w/Fc, тоді як вони розташовані на N-кінці щодо послідовностей VL і VH версії 2 DART-2 w/Fc.

Перший поліпептидний ланцюг такої версії 2 DART-2 w/Fc характеризується наступною амінокислотною послідовністю (SEQ ID NO:48):

5 DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSREEMTKNQVSLVWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW  
QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAPSSSPMEDIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSARSSIS  
10 FMYWYQQKPGKAPKLLIYDTSNLAGSVPSRFSGSGSGTEFTLTISLSLEAEDAATYYCQQWSSYPLTF  
GGGTLKLEIKGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWWVRQAPGKGLEW  
VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY  
WGQGTLLTVTSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE

Варто брати до уваги, що залишки 1-10 SEQ ID NO:48 являють собою пептид 1 (SEQ ID NO:39); залишки 11-227 SEQ ID NO:48 являють собою послідовність для доменів CH2 і CH3 домена Fc антитіла (SEQ ID NO:40); залишки 228-235 SEQ ID NO:48 являють собою проміжний спейсерний пептид (лінкер 4) (SEQ ID NO:38); залишки 236-341 SEQ ID NO:48 являють собою домен VL антитіла, що зв'язує grA33 (VL<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO:26); залишки 342-349 SEQ ID NO:48 являють собою перший проміжний спейсерний пептид (лінкер 1) (SEQ ID NO:1); залишки 350-474 SEQ ID NO:48 являють собою домен VH антитіла, що зв'язує CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO:25); 20 залишки 475-480 SEQ ID NO:48 являють собою цистеїновмісний спейсерний пептид (лінкер 2) (SEQ ID NO:2); і залишки 481-508 SEQ ID NO:48 являють собою "К-спіральний" домен, що стимулює утворення гетеродимера (SEQ ID NO:4).

Другий поліпептидний ланцюг такої версії 2 DART-2 w/Fc характеризується амінокислотною послідовністю першого поліпептидного ланцюга DART-2 (тобто SEQ ID NO:28) (описаною вище).

Третій поліпептидний ланцюг такої версії 2 DART-2 w/Fc характеризується амінокислотною послідовністю SEQ ID NO:46 (описаною вище).

Фармацевтичні композиції

Композиції відповідно до даного винаходу містять у собі композиції нерозфасованого 30 лікарського засобу, придатні у виробництві фармацевтичних композицій (наприклад, неочищені або нестерильні композиції) і фармацевтичних композицій (тобто композицій, які є підходящими для введення суб'єкту або пацієнту), які можна використовувати в одержанні стандартних лікарських форм. Такі композиції містять профілактично або терапевтично ефективну кількість grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл або grA33 x CD3 біспецифічних 35 моновалентних Fc-діатіл, розкритих у даному документі, і додатковий терапевтичний засіб і фармацевтично прийнятний носій. Композиції відповідно до даного винаходу переважно містять профілактично або терапевтично ефективну кількість однієї або декількох молекул відповідно до даного винаходу та фармацевтично прийнятний носій.

Відповідно до даного винаходу також передбачені фармацевтичні композиції, що містять 40 такі grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла або grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла та друге терапевтичне антитіло (наприклад, специфічне до антигена злоякісної пухлини моноклональне антитіло), що є специфічним відносно конкретного антигена, зв'язаного із злоякісною пухлиною, і фармацевтично прийнятний носій.

Відповідно до конкретного варіанта здійснення термін "фармацевтично прийнятний" означає схвалений регуляторним органом федерального уряду або уряду штату або перерахований у 45 Фармакопеї США або іншій загальноновизнаній фармакопеї для застосування у тварин і більш конкретно в людей. Термін "носій" відноситься до розріджувача, ад'юванта (наприклад, ад'юванта Фрейнда (повного та неповного), допоміжної речовини або інертного носія, з яким вводять терапевтичний засіб. Такі фармацевтичні носії можуть являти собою стерильні рідини, 50 такі як вода й олії, містячи в собі олії мінерального, тваринного, рослинного або синтетичного походження, такі як арахісова олія, соєва олія, мінеральна олія, кунжутна олія та подібне. Вода являє собою переважний носій, якщо фармацевтичну композицію вводять внутрішньовенно. Сольові розчини та водні розчини декстрози й розчини гліцерину також можна використовувати як рідкі носії, зокрема, для ін'єкційних розчинів. Підходящі фармацевтичні допоміжні речовини 55 містять у собі крохмаль, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, борошно, крейду, силікагель, стеарат натрію, гліцерин моностеарат, тальк, хлорид натрію, сухе знежирене молоко, гліцерин, пропілен, гліколь, воду, етанол і подібне. Композиція при необхідності також може містити незначні кількості змочувальних засобів або емульгаторів, або рН буферних засобів. Зазначені композиції можуть приймати форму розчинів, суспензій, емульсій, таблеток, 60 драже, капсул, порошків, складів уповільненого вивільнення та подібного.

Як правило, інгредієнти композицій відповідно до даного винаходу поставляються або окремо, або змішаними разом у стандартній лікарській формі, наприклад, у вигляді сухого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично запаяному контейнері, такому як ампула або саше з вказівкою кількості активного засобу. Якщо композиція призначена для введення за допомогою інфузії, вона може продаватися з інфузійним флаконом, що містить стерильну воду або сольовий розчин фармацевтичного ступеня чистоти. Якщо композиція призначена для введення за допомогою ін'єкції, ампула з стерильною водою для ін'єкцій або сольовим розчином може бути надана для того, щоб інгредієнти можна було змішати перед введенням.

Композиції відповідно до даного винаходу можуть бути введені до складу у вигляді нейтральних або сольових форм. Фармацевтично прийнятні солі містять у собі без обмеження солі, утворені такими аніонами, як аніони, що походять з соляної, ортофосфорної, оцтової, щавлевої, винної кислот і так далі, і солі, утворені катіонами, такими як катіони, що походять з натрію, калію, амонію, кальцію, гідроксидів заліза, ізопропіламіну, триетиламіну, 2-етиламіноетанолу, гістидину, прокаїну і так далі.

Відповідно до даного винаходу також передбачені фармацевтичний пакет або набір, що містить один або декілька контейнерів, заповнених такими розкритими grA33 x CD3 біспецифічними моновалентними діатілами або grA33 x CD3 біспецифічними моновалентними Fc-діатілами (окремо або з додатковим(и) терапевтичним(и) засобом(ами)), і таким фармацевтично прийнятним носієм. Крім того, один або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів, придатних для лікування захворювання, також можуть бути включені у фармацевтичний пакет або набір. Відповідно до даного винаходу також передбачений фармацевтичний пакет або набір, що містить один або декілька контейнерів, заповнених одним або декількома інгредієнтами фармацевтичних композицій відповідно до даного винаходу. Необов'язково такий(і) контейнер(и) може супроводжувати повідомлення у формі, передбаченої державним органом, що регулює виробництво, застосування або продаж фармацевтичних засобів або біологічних продуктів, причому зазначене повідомлення відображає дозвіл відповідним органом виробництва, застосування або продажу для введення людям.

Відповідно до даного винаходу передбачені набори, які можна використовувати в описаних вище способах. Відповідно до одного варіанта здійснення набір містить одну або декілька молекул відповідно до даного винаходу. Відповідно до іншого варіанта здійснення набір додатково містить один або декілька інших профілактичних або терапевтичних засобів, придатних для лікування злоякісної пухлини, в одному або декількох контейнерах. Відповідно до іншого варіанта здійснення набір додатково містить одне або декілька антитіл, які зв'язують один або декілька антигенів, асоційованих із злоякісною пухлиною. Відповідно до певних варіантів здійснення інший профілактичний або терапевтичний засіб являє собою хіміотерапевтичний засіб. Відповідно до інших варіантів здійснення профілактичний або терапевтичний засіб являє собою біологічний або гормональний терапевтичний засіб.

Застосування композицій відповідно до даного винаходу  
grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла або grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу характеризуються здатністю здійснювати лікування будь-якого захворювання або стану, пов'язаного з експресією grA33 або що характеризується його експресією. Таким чином, без обмеження фармацевтичні композиції, що містять такі молекули, можна використовувати в діагностиці або лікуванні злоякісних пухлин товстої кишки, колоректальних злоякісних пухлин і злоякісних пухлин підшлункової залози.

#### Способи введення

Композиції відповідно до даного винаходу можуть бути передбачені для лікування, профілактики та зменшення інтенсивності одного або декількох симптомів, пов'язаних із захворюванням, порушенням або інфекцією, шляхом введення суб'єкту ефективної кількості фармацевтичної композиції відповідно до даного винаходу. Відповідно до переважного аспекту такі композиції є по суті очищеними (тобто по суті не містять речовин, які обмежують її дію або роблять небажані побічні ефекти). Відповідно до конкретного варіанта здійснення суб'єкт являє собою тварину, краще ссавця, такого ссавця, що не відноситься до приматів (наприклад, корова, кінь, кішка, собака, гризун і так далі) або примат (наприклад, мавпа, така як, яванський макак, людина і так далі). Відповідно до переважного варіанта здійснення суб'єкт являє собою людину.

Відомі різні системи доставки та їх можна використовувати для введення композицій відповідно до даного винаходу, наприклад, інкапсулювання в ліпосомах, мікрочастинки, мікрокапсули, рекомбінантні клітини, здатні експресувати антитіло, або злитий білок, опосередкований рецептором ендцитоз (див., наприклад, Wu et al. (1987) "Receptor-Mediated In

Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System", J. Biol. Chem. 262:4429-4432), конструкція з нуклеїнової кислоти у вигляді частини ретровірусного або іншого вектора і так далі.

Способи введення grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл або grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл відповідно до даного винаходу містять у собі без обмеження парентеральне введення (наприклад, інтрадермальне, внутрішньом'язове, інтраперитонеальне, внутрішньовенне та підшкірне), епідуральне та мукозальне введення (наприклад, інтраназальний і пероральний шляхи). Відповідно до конкретного варіанта здійснення молекули відповідно до даного винаходу вводять внутрішньом'язово, внутрішньовенно або підшкірно. Композиції можна вводити будь-яким зручним шляхом, наприклад, за допомогою інфузії або болюсної ін'єкції, шляхом поглинання через епітеліальні або шкірно-слизові оболонки (наприклад, слизову ротової порожнини, слизову прямої кишки та кишечника і так далі) і можна вводити разом із іншими біологічно активними засобами. Введення може бути системним або місцевим. Крім того, пульмонарне введення також можна використовувати, наприклад, за допомогою застосування інгалятора або небулайзера та складу з аерозольним засобом. Див., наприклад, патенти США №№ 6019968; 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540 і 4880078 та міжнародні патентні публікації згідно з РСТ №№ WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346 і WO 99/66903, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

Відповідно до даного винаходу також передбачено, що grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла або grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу запаковані в такий герметично запаяний контейнер, як ампула або саше, з вказівкою кількості таких молекул. Відповідно до одного варіанта здійснення grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла або grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу поставляють у вигляді сухого стерилізованого ліофілізованого порошку або безводного концентрату в герметично запаяному контейнері та його можна розвести, наприклад, водою або сольовим розчином до відповідної концентрації для введення суб'єкту. grA33 x CD3 діатіла або grA33 x CD3 Fc-діатіла відповідно до даного винаходу переважно поставляють у вигляді сухого стерильного ліофілізованого порошку в герметично запаяному контейнері в стандартному дозуванні, що становить щонайменше 5 мкг, більше переважно щонайменше 10 мкг, щонайменше 15 мкг, щонайменше 25 мкг, щонайменше 50 мкг, щонайменше 100 мкг або щонайменше 200 мкг.

Ліофілізовані grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла або grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу необхідно зберігати при температурі від 2 до 8 °C в їхньому оригінальному контейнері та молекули необхідно вводити не пізніше ніж через 12 годин, переважно не пізніше ніж через 6 годин, не пізніше ніж через 5 годин, не пізніше ніж через 3 години або не пізніше ніж через 1 годину після їхнього розведення. Відповідно до альтернативного варіанта здійснення grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла або grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу поставляють у рідкій формі в герметично запаяному контейнері з вказівкою кількості та концентрації молекули, злитого білка або кон'югованої молекули. Рідку форму таких біспецифічних моновалентних діатіл або біспецифічних моновалентних Fc-діатіл переважно поставляють у герметично запаяному контейнері, в якому молекули перебувають у концентрації, що становить щонайменше 1 мкг/мл, більше переважно щонайменше 2,5 мкг/мл, щонайменше 5 мкг/мл, щонайменше 10 мкг/мл, щонайменше 50 мкг/мл або щонайменше 100 мкг/мл.

Кількість grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл або grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл відповідно до даного винаходу, що буде ефективною у лікуванні, профілактиці або зменшенні інтенсивності одного або декількох пов'язаних із порушенням симптомів, можна визначити за допомогою стандартних клінічних технік. Точна доза, застосовувана в складі, також буде залежати від шляху введення та серйозності стану, і повинна визначатися відповідно до рішення лікаря та всіх відповідних обставин пацієнта. Ефективні дози можна екстраполювати з кривої залежності від дози з in vitro тестових систем або тестових систем - тваринних моделей.

Для grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл або grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл, передбачених даним винаходом, введене пацієнту дозування становить, як правило, щонайменше приблизно 0,01 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,05 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,1 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,2 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,5 мкг/кг, щонайменше приблизно 1 мкг/кг, щонайменше приблизно 2 мкг/кг, щонайменше приблизно 3 мкг/кг, щонайменше приблизно 5 мкг/кг, щонайменше приблизно 10 мкг/кг, щонайменше приблизно 20 мкг/кг, щонайменше приблизно 30 мкг/кг, щонайменше приблизно



50 мкг/кг, щонайменше приблизно 0,1 мг/кг, щонайменше приблизно 0,15 мг/кг маси тіла суб'єкта або більше.

Дозування та частоту введення біспецифічних моновалентних діатіл або біспецифічних моновалентних Fc-діатіл відповідно до даного винаходу можна знизити або змінити шляхом посилення поглинання та проникнення біспецифічних моновалентних Fc-діатіл у тканині за допомогою таких модифікацій, як, наприклад, ліпідизація.

Відповідно до одного варіанта здійснення дозування, що вводять пацієнту, grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл або grA33 x CD3 Fc біспецифічних моновалентних діатіл відповідно до даного винаходу можна розрахувати для застосування в якості монотерапії. Відповідно до іншого варіанта здійснення біспецифічні моновалентні діатіла або біспецифічні моновалентні Fc-діатіла відповідно до даного винаходу використовують у комбінації з іншими терапевтичними композиціями, і дозування, що вводять пацієнту, є нижче, ніж при використанні таких біспецифічних моновалентних діатіл або біспецифічних моновалентних Fc-діатіл в якості монотерапії.

Відповідно до конкретного варіанта здійснення може бути необхідним введення фармацевтичних композицій відповідно до даного винаходу місцево у потребує лікування область; цього можна досягти, наприклад, без обмеження за допомогою місцевої інфузії, ін'єкції або за допомогою імплантата, причому зазначений імплантат виготовлений з пористого, непористого або желатиноподібного матеріалу, містачи в собі такі мембрани, як мембрани Sialastic, або волокна. При введенні молекули відповідно до даного винаходу переважно необхідно приділити увагу застосуванню матеріалів, які не абсорбують молекулу.

Відповідно до іншого варіанта здійснення композиції можуть бути доставлені у везикулі, зокрема ліпосомі (див. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery", Science 249:1527-1533); Treat et al., в Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 3 17-327; див., головним чином, там же).

Відповідно до іншого варіанта здійснення композиції можуть бути доставлені в системі контрольованого або уповільненого вивільнення. Будь-яку техніку, відому фахівцю в даній області техніки, можна використовувати для одержання складів уповільненого вивільнення, що містять одну або декілька молекул відповідно до даного винаходу. див., наприклад, патент США № 4526938; міжнародні патентні публікації згідно з PCT №№ WO 91/05548; WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratatumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained- Release Gel", Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long- Circulating Emulsions", PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372- 397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853- 854; i Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759- 760, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання. Відповідно до одного варіанта здійснення насос можна використовувати в системі контрольованого вивільнення (див. Langer, раніше; Sefton, (1987) "Implantable Pumps", CRC Crit. Rev. Biomed. Eng. 14:201-240; Buchwald et al. (1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis", Surgery 88:507-516; i Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery", N. Engl. J. Med. 321:574-579). Відповідно до іншого варіанта здійснення полімерні матеріали можна використовувати для досягнення контрольованого вивільнення антитіл (див., наприклад, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate", Science 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization", Ann. Neurol. 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits", J. Neurosurg. 7(1):105-112; патенти США №№ 5679377; 5916597; 5912015; 5989463; 5128326; міжнародні патентні публікації згідно з PCT №№ WO 99/15154 i WO 99/20253). Приклади полімерів, що використовують у складах уповільненого вивільнення, містять у собі без обмеження полімер 2-гідроксіетилметакрилату, полімер метилметакрилату, полімер акрилової кислоти, співполімер етилену та вінілацетату, полімер метакрилової кислоти, полігліколіди (PLG), поліангідриди, полімер N-вінілпіролідону, полімер вінілового спирту, поліакриламід, поліетиленгліколь, полілактиди (PLA), співполімер лактидів i гліколідів (PLGA) i поліортоєфіри. Відповідно до іншого варіанта здійснення систему контрольованого вивільнення

можна розмістити поблизу до терапевтичної мішені (наприклад, легені), таким чином, буде необхідна тільки частка системної дози (див., наприклад, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, раніше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Відповідно до іншого варіанта здійснення полімерні композиції, придатні як імплантати контрольованого вивільнення, використовуються згідно з Dunn із співавт. (див. патент США № 5945155). Зазначений конкретний спосіб заснований на терапевтичному ефекті *in situ* контрольованого вивільнення біоактивного матеріалу з полімерної системи. Імплантація, як правило, відбувається у будь-якому місці в організмі пацієнта, що потребує терапевтичного лікування. Відповідно до іншого варіанта здійснення використовують не полімерну систему вповільненої доставки, за допомогою якої не полімерний імплантат в організмі суб'єкта використовується як система доставки лікарського засобу. При імплантації в організм органічний розчинник імплантата буде розсіюватися, диспергуватися або вилугуватись з композиції в навколишню тканинну рідину, і не полімерний матеріал буде поступово коагулювати або осаджуватись з утворенням твердої, мікропористої матриці (див. патент США № 5888533).

Системи контрольованого вивільнення обговорюються в огляді Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery", *Science* 249:1527-1533). Будь-яку техніку, відому фахівцю в даній області техніки, можна використовувати для одержання складів уповільненого вивільнення, що містять один або декілька терапевтичних засобів відповідно до даного винаходу. Див., наприклад, патент США № 4526938; міжнародні патентні публікації №№ WO 91/05548 і WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained- Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39:179- 189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long- Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372- 397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application", *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853- 854; і Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery", *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759- 760, кожна з яких повністю включена в даний документ за допомогою посилання.

Відповідно до конкретного варіанта здійснення у випадку, якщо композиція відповідно до даного винаходу являє собою нуклеїнову кислоту, що кодує біспецифічне моновалентне діатіло або біспецифічне моновалентне Fc-діатіло відповідно до даного винаходу, нуклеїнова кислота може бути введена *in vivo* для стимуляції експресії кодованого нею біспецифічного моновалентного діатіла або біспецифічного моновалентного Fc-діатіла, шляхом конструювання її у вигляді частини відповідного нуклеїновокислотного експресійного вектора та введення її так, щоб вона стала внутрішньоклітинною, наприклад, шляхом застосування ретровірусного вектора (див. патент США № 4980286), або шляхом прямої ін'єкції, або шляхом використання бомбардування мікрочастинками (наприклад, генної гармати; Biolistic, Dupont), або покриття ліпідами, або рецепторами клітинної поверхні, або засобами трансфекції, або шляхом введення її, з'єднаної з гомеобокс-подібним пептидом, що, як відомо, проникає в ядро (див., наприклад, Joliot et al. (1991) "Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:1864-1868) і так далі. Альтернативно, нуклеїнова кислота може бути введена внутрішньоклітинно та вбудована в ДНК клітини-хазяїна для експресії шляхом гомологічної рекомбінації.

Лікування суб'єкта за допомогою терапевтично або профілактично ефективної кількості grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл або grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл відповідно до даного винаходу може містити в собі однократне лікування або переважно може містити в собі серію лікувань. Відповідно до переважного прикладу суб'єкт одержує лікування за допомогою молекул відповідно до даного винаходу один раз на тиждень приблизно 1-10 тижнів, переважно 2-8 тижнів, більше переважно приблизно 3-7 тижнів і навіть більше переважно протягом приблизно 4, 5 або 6 тижнів. Відповідно до інших варіантів здійснення фармацевтичні композиції відповідно до даного винаходу вводять один раз на день, два рази на день або три рази на день. Відповідно до інших варіантів здійснення фармацевтичні композиції вводять один раз на тиждень, два рази на тиждень, один раз на два тижні, один раз на місяць, кожні шість тижнів, один раз на два місяці, двічі на рік або один раз на рік. Також варто розуміти, що ефективне дозування молекул, які використовують для лікування, може збільшуватися або зменшуватися протягом курсу конкретного лікування.

Представивши опис даного винаходу загалом, він стане більше зрозумілим з посиланням на наступні приклади, які представлені для ілюстрації та не передбачено, що вони обмежують даний винахід, якщо не зазначено інше.

#### Приклад 1

Характеристики моноклонального антитіла до grA33 людини

Мишаче моноклональне антитіло, здатне специфічно зв'язуватися з grA33 людини, піддавали химеризації та гуманізації. Ланцюги VL і VH вихідного мишачого антитіла характеризуються послідовностями SEQ ID NO:13 і 17, відповідно. Ланцюги VL і VH гуманізованого антитіла характеризуються послідовностями SEQ ID NO:26 і 27, відповідно.

5 Антигензв'язуючий домен  $VL_{grA33}$  містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:14): SARSSISFMY; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:15): DTSNLAS; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:16): QQWSSYPLT.

10 Антигензв'язуючий домен  $VH_{grA33}$  містить CDR1 з послідовністю (SEQ ID NO:18): GSWMN; CDR2 з послідовністю (SEQ ID NO:19): RIYPGDGETNYNGKFKD; і CDR3 з послідовністю (SEQ ID NO:20): IYGNNVYFDV.

У таблиці 1 показаний ефект таких змін на кінетику зв'язування.

Таблиця 1

Антитіло	KD	ka	kd
Мишаче mAb 1	2,3 нМ	$3,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^{-4}$
Химерне mAb 1	2,4 нМ	$5,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-3}$
Гуманізоване mAb 1	3,4 нМ	$5,6 \times 10^5$	$1,9 \times 10^{-3}$

15 Дані показують, що модифікації, які призводять до гуманізації доменів VL і VH антитіла, не впливають на кінетику зв'язування з grA33.

#### Приклад 2

Конструкція grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл і Fc-діатіл і контрольних діатіл

20 У таблиці 2 міститься перелік послідовностей поліпептидних ланцюгів переважних grA33 x CD3 діатіл і grA33 x CD3 Fc-діатіл, які експресували й очищали. Виявили, що діатіла здатні одночасно зв'язуватися з grA33 і CD3, судячи з виявлення такого одночасного зв'язування ілюстративними grA33 x CD3 біспецифічними моновалентними діатілами, DART-1 і DART-2, і ілюстративним grA33 x CD3 біспецифічним моновалентним Fc-діатілом (DART-2 w/Fc). Крім того, одержали контрольне біспецифічне моновалентне діатіло ("контрольне DART"), що було біспецифічним моновалентним у відношенні CD3 і FITC, і було виявлено, що воно здатне

25 одночасно зв'язуватися з CD3 і FITC.

Таблиця 2

Діатіло	Поліпептиди - замісники (у напрямку від N-кінця до C-кінця)
grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло (DART-1)	SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:23
grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло (DART-2)	SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:30
grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-2 w/ABD), містить альбумінзв'язуючий домен (ABD) для збільшення періоду напівжиття in vivo	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:30
grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить версію 1 домена Fc IgG (версія 1 DART-2 w/Fc), містить домен Fc для збільшення періоду напівжиття in vivo	SEQ ID NO:42 SEQ ID NO:44 SEQ ID NO:46
grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить версію 2 домена Fc IgG (версія 2 DART-2 w/Fc), містить домен Fc для збільшення періоду напівжиття in vivo	SEQ ID NO:48 SEQ ID NO:28 SEQ ID NO:46

30 grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні діатіла являють собою гетеродимери, що складаються з двох поліпептидних ланцюгів (один ланцюг кожної перерахованої послідовності), і grA33 x CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла являють собою гетеродимери, що складаються з трьох поліпептидних ланцюгів (один ланцюг кожної перерахованої амінокислотної послідовності). Способи утворення біспецифічних моновалентних діатіл представлені в міжнародних патентних публікаціях №№ WO 2006/113665, WO 2008/157379, WO

2010/080538, WO 2012/018687, WO 2012/162068 і WO 2012/162067.

Було виявлено, що контрольне CD3 х FITC біспецифічне моновалентне діатіло здатне одночасно зв'язуватися з CD3 і з FITC. Було виявлено, що описані вище grA33 х CD3 біспецифічні моновалентні діатіла і grA33 х CD3 біспецифічні моновалентні Fc-діатіла здатні одночасно зв'язуватися з grA33 і з CD3. Щоб продемонструвати таке одночасне зв'язування, grA33 х CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1 інкубували у присутності розчинного фрагмента CD3, що був іммобілізований на твердій підкладці. Виявлення зв'язування оцінювали за допомогою здатності іммобілізованих антитіл додатково зв'язувати grA33. Результати підтверджують здатність описаних вище grA33 х CD3 біспецифічних моновалентних діатіл і grA33 х CD3 біспецифічних моновалентних Fc-діатіл опосередковувати одночасне зв'язування з grA33 і CD3 (фігура 3).

#### Приклад 3

grA33 х CD3 біспецифічні моновалентні діатіла є цитотоксичними відносно злоякісних клітин

Здатність grA33 х CD3 біспецифічних моновалентних діатіл відповідно до даного винаходу лікувати злоякісну пухлину проілюстрували шляхом інкубації клітин колоректального раку або клітин раку підшлункової залози у присутності grA33 х CD3 біспецифічного моновалентного DART-1 і або PBMC людини (E:T=25:1), або активованих Т-клітин людини (E:T=10:1). grA33 х CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1 виявило сильну здатність до переспрямованого цитолізу з концентраціями, що вимагають досягнення 50 % максимальної активності (EC<sub>50</sub>) у діапазоні від суб-нг/мл до приблизно 1 нг/мл. Навпроти, цитотоксичність не спостерігалася при використанні grA33-негативних клітинних ліній злоякісної пухлини (наприклад, HCT116). Результати дослідження показані на фігурі 4А (клітини колоректального раку, подібні з стовбурними (клітини Colon CSC), на фігурі 4В (клітини колоректального раку Colo205) і на фігурі 4С (клітини раку підшлункової залози ASPC-1). Результати узагальнено представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Цільова клітинна лінія	EC <sub>50</sub> grA33 х CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (нг/мл)	Ефектор:мішень (E:T)	Максимальний спостережуваний цитоліз у %
Colon CSLC	0,9015	25:1	38
Colo205	0,5853	10:1	35
ASPC-1	1,142	10:1	25

#### Приклад 4

Т-клітинна активація у присутності grA33 х CD3 біспецифічних моновалентних діатіл

Для того, щоб додатково показати здатність діатіл відповідно до даного винаходу лікувати злоякісну пухлину, дрімаючі Т-клітини людини інкубували з grA33 х CD3 біспецифічними моновалентними DART-1 у присутності або при відсутності злоякісних клітин (colo205 або ASPC-1). Для одержання характеристик Т-клітинної активації під час опосередкованого grA33 х CD3 біспецифічним моновалентним діатілом (DART-1) процесу переспрямованого цитолізу, Т-клітини з аналізів переспрямованого цитолізу офарблювали відносно маркера Т-клітинної активації CD25 й аналізували за допомогою FACS. CD25 піддавався позитивній регуляції в CD8 (фігури 5А-5В) і CD4 (фігури 5D-5Е) Т-клітинах залежним від дози чином, вказуючи на те, що grA33 х CD3 біспецифічні моновалентні діатіла індукували Т-клітинну активацію у процесі переспрямованого цитолізу. Навпроти, при відсутності клітин-мішеней не спостерігалася активація CD8 (фігура 5С) або CD4 (фігура 5F) Т-клітин, що вказує на те, що grA33 х CD3 діатіла не активують Т-клітини при відсутності клітин-мішеней. Аналогічно, CD8 або CD4 Т-клітини не були активовані при інкубації з клітинами-мішенями та контрольним біспецифічним моновалентним діатілом (контрольним DART) (фігури 5А-5В і фігури 5D-5F, відповідно), що вказує на необхідність перехресної зшивки Т-клітини та клітини-мішені з grA33 х CD3 біспецифічними моновалентними діатілами.

#### Приклад 5

Еквівалентність grA33 х CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-1), що характеризується послідовностями мишачого варіабельного домена антитіла до grA33 людини, і grA33 х CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-2), що характеризується

послідовностями гуманізованого варіабельного домена антитіла до gpA33 людини

Як обговорювалося вище, gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1 містить домени VL<sub>gpA33</sub> і VH<sub>gpA33</sub> мишачого моноклонального антитіла, тоді як gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-2 містить гуманізований домен VL<sub>gpA33</sub> і гуманізований домен VH<sub>gpA33</sub> того самого мишачого антитіла. Щоб продемонструвати здатність гуманізованих доменів VL<sub>gpA33</sub> і VH<sub>gpA33</sub> стимулювати націлювання Т-клітин на експресуючі gpA33 злоякісні клітини, злоякісні клітини, які експресують gpA33, інкубували у присутності дрімаючих Т-клітин (аналіз LDH; E:T=10:1) у присутності або DART-1, DART-2, або контрольного біспецифічного моновалентного діатіла (контрольного DART). Результати даного аналізу (показаного на фігурах 6A-6D) показали, що DART-1 і DART-2 опосередковували еквівалентну цитотоксичність відносно клітин колоректальної аденокарциноми SW948 (фігура 6A) і клітин Colo205 (фігура 6B). Як DART-1, так і DART-2 опосередковували цитотоксичність експресуючої люциферазу клітинної лінії Colo205, що була стабільно трансфектована з геном люциферази світлячка (luc2) (Colo205-Luc), що вимірювали за зниженою люмінесценцією (фігура 6C). Не DART-1, не DART-2 не опосередковували цитотоксичність gpA33-негативної клітинної лінії злоякісної пухлини, HCT116 (фігура 6D). Як показано в таблиці 4, DART-1 і DART-2 виявили подібну еквівалентну біоактивність проти множинних пухлинних клітинних ліній.

Таблиця 4

Ефектор/мішень		Аналіз LDH		Люциферазний аналіз	
Донорна Т-клітина	Пухлинна клітинна лінія	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1	gpA33xCD3 DART-2	gpA33xCD3 DART 1
D54677	SW948	0,79	1,34		
D54677	Colo205	1,17	2,52		
D51031	Colo205-Luc	2,29	3,53	2,53	4,55
D41440	Colo205	2,29	3,37		
D41440	Colo205-Luc	2,80	4,26	2,57	3,26

#### Приклад 6

Перехресна реактивність gpA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл, gpA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл, що містять альбумінзв'язуючий домен, і gpA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл, що містять домен Fc IgG, з PBMC яванського макака

Як показано вище, гуманізований домен VL<sub>gpA33</sub> і гуманізований домен VH<sub>gpA33</sub> gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла DART-2 опосередковують цитотоксичність gpA33-експресуючих злоякісних клітин у присутності Т-клітин людини. Несподівано виявили, що домени VL<sub>CD3</sub> і VH<sub>CD3</sub> gpA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл відповідно до даного винаходу також здатні зв'язуватися з CD3 Т-клітин яванського макака та перенаправляти зазначені клітини на знищення експресуючих gpA33 клітин.

Як показано на фігурах 7A-7D, було виявлено, що всі з gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла DART-2, gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-2 w/ABD), і gpA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла DART-2, що містить домен Fc IgG (DART-2 w/Fc) були здатні стимулювати цитотоксичність злоякісних клітин у присутності PBMC людини або яванського макака. На фігурах 7A-7B показана здатність трьох діатіл опосередковувати цитотоксичність клітин Colo205-Luc, які інкубували з PBMC людини, що вимірювали за допомогою аналізу LDH (фігура 7A) або люциферазного аналізу (фігура 7B). На фігурах 7C-7D показана відповідна здатність трьох діатіл опосередковувати цитотоксичність клітин Colo205-Luc, які інкубували з PBMC яванського макака, що вимірювали за допомогою аналізу LDH (фігура 7A) або люциферазного аналізу (фігура 7B).

Як показано в таблиці 5, gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-2 і gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-2

w/ABD), проявляли порівняну CTL-активність. Біспецифічні моновалентні діатіла виявили подібну активність у відношенні ефекторних клітин PBMC як людини, так і яванського макака (супо).

Таблиця 5

	EC50-CTL активність (нг/мл) Клітини-мішені Colo205			
	Аналіз LDH		Люциферазний аналіз	
DART	PBMC людини	PBMC супо	PBMC людини	PBMC супо
gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло (DART-2)	4,09	3,81	2,73	1,55
gpA33 x CD3 біспецифічне діатіло, що містить альбумінзв'язуючий домен (DART-2 w/ABD)	5,52	4,63	3,07	1,63

5

#### Приклад 7

in vivo реактивність gpA33 x CD3 діатіла в мишачій моделі пухлини товстої кишки

Щоб продемонструвати in vivo здатність gpA33 x CD3 діатіл відповідно до даного винаходу забезпечувати лікування злоякісної пухлини, клітини colo205 імплантували разом із активованими Т-клітинами в страждаючих діабетом без ожиріння з важкою комбінованою імунною недостатністю гамма мишей (Agliano, A. et al. (2008) "Human Acute Leukemia Cells Injected In NOD/Ltsz-Scid/IL-2Rgamma Null Mice Generate A Faster And More Efficient Disease Compared To Other NOD/Scid-Related Strains", Int. J. Cancer 123(9):2222-2227; Sanchez, P.V. et al. (2009) "A Robust Xenotransplantation Model For Acute Myeloid Leukemia", Leukemia 23(11):2109-2117; Racki, W.J. et al. (2010) "NOD-Scid IL2rgamma(Null) Mouse Model Of Human Skin Transplantation And Allograft Rejection", Transplantation 89(5):527-536; Choi, B. et al. (2011) "Human B Cell Development And Antibody Production In Humanized NOD/SCID/IL-2Rγ(Null) (NSG) Mice Conditioned By Busulfan", J. Clin. Immunol. 31(2):253-264; Sartelet, H. et al. (2012) "Description Of A New Xenograft Model Of Metastatic Neuroblastoma Using NOD/SCID/IL2rg Null (NSG) Mice", In Vivo 26(1):19-29; Spranger, S. et al. (2012) "NOD/scid IL-2Rg(null) Mice: A Preclinical Model System To Evaluate Human Dendritic Cell-Based Vaccine Strategies in vivo", J. Transl. Med. 10:30; von Bonin, M. et al. (2013) "in vivo Expansion Of Co-Transplanted T Cells Impacts On Tumor Re-Initiating Activity Of Human Acute Myeloid Leukemia In NSG Mice", PLo One. 8(4):e60680).

gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1 вводили внутрішньовенно мишам один раз на день протягом 4 днів (QDx4), починаючи від дня імплантації. Виявили, що об'єм пухлини Colo205 збільшився в мишей, що одержують контроль - інертний носій (фігура 8). Проте, виявили, що тварини, які одержують DART-1, проявляли знижений об'єм пухлини Colo205 або її відсутність (фігура 8).

Зображення мишей NSG, яким імплантували клітини Colo205, показало, що на 2 день лікування миші, які одержують інертний носій (фігура 9A) або gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1 (фігура 9B), характеризувалися наявністю значних пухлин. Проте, на 12 день лікування миші, які одержують gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1, характеризувалися різко зменшеними об'ємами пухлин (фігура 9D). На 12 день лікування миші, які одержують інертний носій, продемонстрували збільшений об'єм пухлини (фігура 9C).

Як додатковий доказ in vivo здатності gpA33 x CD3 діатіл відповідно до даного винаходу забезпечувати лікування злоякісної пухлини, описану вище модель пухлини проводили з використанням клітин пухлини підшлункової залози ASPC-1 й активованих Т-клітин людини (E:T=1:1). gpA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло DART-1, контрольне біспецифічне моновалентне діатіло (контрольне DART) або інертний носій вводили внутрішньовенно один раз на день протягом 9 днів (QDx9), починаючи від дня імплантації. Виявили, що об'єм пухлини ASPC-1 збільшувався в мишей, які одержують контроль - інертний носій (фігура 10). Проте, виявили, що тварини, які одержують DART-1, проявляли зменшений об'єм пухлини, залежним від дози чином (фігура 10).

Приклад 8

Визначення ефективності версії 1 grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc IgG (версії 1 DART-2 w/Fc)

Для визначення ефективності версії 1 grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc IgG (версії 1 DART-2 w/Fc), мишам проводили інфузію (з використанням осмотичних насосів) протягом 7 днів з описаною вище версією 1 DART-2 w/Fc при різних рівнях дозування. Через 48 год. після імплантації насоса (тобто у присутності стійкого рівня циркулюючої в крові версії 1 DART-2 w/Fc), суміш пухлинних клітин Colo205 і Т-клітин імплантували підшкірно в організм мишей та здійснювали моніторинг ступеня росту пухлини. У таблиці 6 узагальнено представлена схема дослідження; кожна група містила по 8 самок мишей.

Таблиця 6

Група	Лікування	Доза (мг/кг)	Шлях/Схема	Клітинний(і) імплантат(и)
1	Інертний носій	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	grA33xCD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить домен Fc IgG (версія 1 DART-2 w/Fc)	3,1	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
3	Версія 1 DART-2 w/Fc	1,5	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
4	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,75	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
5	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,375	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
6	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)

Результати даного дослідження показані на фігурі 11 і вказують на те, що введення описаних вище grA33 x CD3 біспецифічних моновалентних діатіл, що містять домен Fc IgG (версії 1 DART-2 w/Fc), опосередковувало різке зниження об'єму пухлини у всіх досліджених дозуваннях.

У світлі різкого зниження об'єму пухлини, отриманого у представленому вище дослідженні, провели додаткове дослідження для оцінки ефективності в набагато менших дозах. У таблиці 7 узагальнено представлена схема цього додаткового дослідження; кожна група містила по 8 самок мишей.

Таблиця 7

Група	Лікування	Доза (мг/кг)	Шлях / Схема	Клітинний(і) імплантат(и)
1	Інертний носій	0	IV/QDx5	COLO205 (5E6)
2	grA33xCD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить домен Fc IgG (версія 1 DART-2 w/Fc)	0,2	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
3	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,04	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
4	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,008	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
5	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,0016	IP/CIF	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)
6	Версія 1 DART-2 w/Fc	0,5	IV/QDx5	COLO205 (5E6) hT-клітини (5E6)

Результати цього додаткового дослідження показані на фігурі 12. На фігурі 12 кожний символ означає тварину, яка одержала зазначене дозування описаного вище grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc IgG (версії 1 DART-2 w/Fc), або інертного носія. Дані показують ефективність у всіх досліджених дозуваннях.

#### Приклад 9

Фармакокінетичний профіль grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла (DART-2) і grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного діатіла, що містить домен Fc IgG (DART-2 w/Fc), у яванського макака

Здатність доменів VL<sub>CD3</sub> і VH<sub>CD3</sub> діатіл відповідно до даного винаходу зв'язуватися з CD3 яванського макака забезпечує можливість застосування цих тварин для вимірювання in vivo фармакокінетики діатіл відповідно до даного винаходу.

Для вимірювання таких фармакокінетичних параметрів описане вище grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло (DART-2) або grA33 x CD3 біспецифічне моновалентне діатіло, що містить домен Fc IgG (версія 1 DART-2 w/Fc) вводили за допомогою ін'єкції яванським макакам (10 мкг/кг/день) і піддавали моніторингу концентрацію таких молекул, що залишилися в кровотоці. На фігурі 13 показаний результат цього дослідження та зазначено, що DART-2 і версія 1 DART-2 w/Fc проявляють кінетику виведення першого порядку.

#### Приклад 10

Аналіз SPR зв'язування grA33 x CD3 біспецифічного моновалентного Fc-діатіла (версії 1 DART-1 w/Fc) з CD3 і grA33 людини й яванського макака

Зв'язування grA33 x CD3 біспецифічного Fc-діатіла (версії 1 DART-2 w/Fc) з розчинними версіями рецептора CD3 людини й яванського макака аналізували за допомогою SPR на біосенсорі BIAcore 3000 (GE, Healthcare). Рецептори іммобілізували на сенсорному чипі CM5 відповідно до процедури, що рекомендується виробником. Коротко, карбоксильні групи на поверхні сенсорного чипа активували ін'єкцією розчину, що містить 0,2 М N-етил-N-(3-діетиламіно-пропіл)карбодііміду та 0,05 М N-гідрокси-сукциніміду. Рецептор розчинного CD3 (1 мкг/мл) потім впорскували на активовану поверхню CM5 в 10 mM ацетату натрію, pH 5,0, з об'ємною швидкістю потоку, що становить 5 мкл/хв., з наступним додаванням 1 М етаноламіну для деактивації.

Розчинні версії CD3 яванського макака та людини, які використовують в такому аналізі, експресували в клітинах ссавців у вигляді CD3ε/CD3δ гетеродимеру, стабілізованого протилежно зарядженими стимулюючими утворення гетеродимеру E-спіральними та K-спіральними послідовностями на їхніх C-кінцях. Розчинний CD3ε яванського макака містив



перші 118 амінокислотних залишків CD3ε яванського макака з алелем V35 (FN18+), за яким слідував описаний вище E-спіральний домен (SEQ ID NO:3) на карбокси-кінці. Амінокислотна послідовність алеля V35 (FN18+) CD3ε яванського макака являє собою наступне (SEQ ID NO:49):

5 MQSGTRWRVL GLCLLSIGVW GQDGNEEMGS ITQTPYQVSI SGTTVILTCS QHLGSEAQWQ  
HNGKNKEDSG DRLFLPEFSE MEQSGYYVCY PRGSNPEDAS HHLYLKARVC ENCMEMDMVA  
VATIVIVDIC ITLGLLLLVY YWSKNRKAKA KPVTRGAGAG GRQRGQNKER PPPVPNPDPYE  
PIRKGQQDLY SGLNQRRRI

10 Розчинний CD3δ яванського макака містив перші 101 амінокислотний залишок CD3δ яванського макака, за яким слідував описаний вище K-спіральний домен (SEQ ID NO:4) на карбокси-кінці. Амінокислотна послідовність CD3δ яванського макака являє собою наступне (SEQ ID NO:50):

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

Два білка коекспресували в клітинах CHO-S ссавця й очищали з використанням mAb до E/K-спіралі, прикріпленої до SEPHAROSE®.

20 Розчинний CD3ε людини містив залишки 1-127 CD3ε людини з C119S і C122S, за якими слідував описаний вище E-спіральний домен (SEQ ID NO:3) на карбокси-кінці. Амінокислотна послідовність CD3ε людини являє собою наступне (SEQ ID NO:51):

20 MQSGTHWRVL GLCLLSVGVW GQDGNEEMGG ITQTPYKVS SGTTVILTCP QYPGSEILWQ  
HNDKNIGGDE DDKNIGSDED HSLKEFSEL EQSGYYVCYP RGSKPEDANF YLYLRARVCE  
NCMEMDMVSV ATIVIVDICI TGGLLLLVYY WSKNRKAKAK PVTRGAGAGG RQRGQNKERP  
PPVPNPDPYEP IRKGQRDLYS GLNQRRRI

25 Розчинний CD3δ людини містив залишки 1-101 CD3δ людини, за якими слідував описаний вище K-спіральний домен (SEQ ID NO:4) на карбокси-кінці. Два білка коекспресували в клітинах CHO-S ссавця й очищали з використанням афінної колонки до E/K-спіралі. Амінокислотна послідовність CD3δ людини являє собою наступне (SEQ ID NO:52):

30 FKPIEELE DRVFVNCNTS ITWVEGTVGT LLSDITRLDL GKRILDPRGI YRCNGTDIYK  
DKESTVQVHY RMCQSCVELD PATVAGIIVT DVIATLLLLAL GVFCFAGHET GRLSGAADTQ  
ALLRNDQVYQ PLRDRDDAQY SHLGGNWARN K

35 Розчинний gpA33 людини містив залишки 1-235 gpA33 людини з (SEQ ID NO:53) повторами НННННН ("6His") на карбокси-кінці. Розчинний gpA33 яванського макака містив залишки 1-314 gpA33 яванського макака від Met 1 до Gln 314 з 6 His повторами на карбокси-кінці. Білки експресували в клітинах CHO-S ссавця й очищали з використанням Ni SEPHAROSE®.

40 Експерименти зі зв'язування проводили у буфері HBS-EP, який містить 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA і 0,005 % поверхнево-активну речовину P20. Зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc аналізували (у двох паралелях) у концентраціях, що становлять 0, 6,25, 12,5, 25, 50 і 100 nM, що впорскують протягом 120 секунд із об'ємною швидкістю потоку, що становить 30 мкл/хв.

45 Відновлення поверхні іммобілізованого рецептора проводили шляхом імпульсної ін'єкції 10 mM гліцину, pH 1,5. Стандартні криві одержували шляхом впорскування кожного розведення DART-2 w/Fc на оброблену поверхню без іммобілізованого білка. Криві зв'язування в нульовій концентрації віднімали як фон. Дані KD визначали шляхом глобальної апроксимації кривої зв'язування з моделлю зв'язування 1:1 Ленгмюра (програмне забезпечення BIAevaluation™ v4.1).

50 Аналіз SPR зв'язування gpA33 x CD3 біспецифічного Fc-діатіла (версії 1 DART-2 w/Fc) з CD3 і gpA33 людини й яванського макака продемонстрував істотну подібність молекул із двох різних видів (фігури 14A-14B; фігури 15A-15B). У таблиці 8 представлені рівноважні константи дисоціації (KD), розраховані шляхом глобальної апроксимації до констант афінності та кінетичних констант 1:1 моделі Ленгмюра для взаємодій DART-2 w/Fc. Значення KD версії 1 DART-2 w/Fc для CD3 людини й яванського макака є майже ідентичними при 23 і 26 nM, відповідно, незважаючи на деяке розходження в реакціях максимального зв'язування між двома антигенами. Випадкова орієнтація антигенів із різними амінокислотними послідовностями, безпосередньо іммобілізованими на поверхні, може призвести до різних щільностей доступних сайтів зв'язування на поверхні. Значення KD для взаємодії версії 1 DART-2 w/Fc з gpA33 людини й мавпи являють собою 2,2 nM і 12 nM, відповідно (таблиця 8). Розходження в афінності є результатом невеликого зниження константи швидкості асоціації та збільшення константи швидкості дисоціації для взаємодії версії 1 DART-2 w/Fc з gpA33 яванського макака (таблиця 8).  
60 Дані являють собою середні значення від трьох незалежних експериментів у двох паралелях

(SD = стандартне відхилення; h, людина; cyno, яванський макак).

Таблиця 8

Рівноважні константи дисоціації (KD) для  
зв'язування версії 1 DART-2 W/Fc з антигенами з різних видів

Антигени	$k_a (\pm SD) (M^{-1} s^{-1})$	$k_d (\pm SD) (s^{-1})$	$K_D (\pm SD) (nM)$
hCD3 $\epsilon/\delta$	$1,5(\pm 0,1) \times 10^5$	$3,5(\pm 0,06) \times 10^{-3}$	$23 \pm 2,0$
cynoCD3 $\epsilon/\delta$	$1,3(\pm 0,02) \times 10^5$	$3,4(\pm 0,02) \times 10^{-3}$	$26 \pm 0,6$
hgpA33-His	$4,2(\pm 0,3) \times 10^5$	$9,0(\pm 0,5) \times 10^{-4}$	$2,2 \pm 0,2$
cynogpA33-His	$2,3(\pm 0,2) \times 10^5$	$2,8(\pm 0,1) \times 10^{-3}$	$12 \pm 1,0$

- Всі згадані в даному описі винаходу публікації та патенти включені в даний документ тією самою мірою, як яби було передбачено, що кожна окрема публікація або патентна заявка спеціально й індивідуально включена за допомогою посилання у всій своїй повноті. Поряд із тим, що даний винахід був описаний з використанням конкретних його варіантів здійснення, варто розуміти, що можливі додаткові модифікації, і передбачено, що дана заявка охоплює будь-які зміни, застосування або адаптації даного винаходу, слідуючи в цілому принципам даного винаходу та містячи в собі такі відхилення від даного розкриття, які узгоджуються з відомою або загальноприйнятою практикою в даній області техніки, до якої належить даний винахід, і які можуть бути застосовані до основних ознак, викладених вище в даному документі.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> МАКРОДЖЕНІКС, ІНК.  
 МУР, Пол  
 ЛІ, Джонатан  
 ЧЕН, Франсін  
 ДЖОНСОН, Леслі  
 ШАХ, Калпана  
 БОНВІНІ, Езіо

<120> БІСПЕЦИФІЧНІ МОНОВАЛЕНТНІ ДІАТИЛА, ЯКІ ЗДАТНІ ЗВ'ЯЗУВАТИСЯ З  
 ГРАЗЗ І CD3, ТА ЇХ ЗАСТОСУВАННЯ

<130> 1301.0112PCT

<150> US 61/869,528  
 <151> 2013-08-23

<150> US 61/907,691  
 <151> 2013-11-22

<150> EP 13198859  
 <151> 2013-12-20

<160> 57

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Лінкер 1 Поліпептид

<400> 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

<210> 2  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Лінкер 2 Поліпептид

<400> 2

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 3  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> E-спіральний Домен

<400> 3

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

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

<210> 4  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> K-спіральний Домен

<400> 4

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

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

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(110)  
<223> Варіабельний Домен Легкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла

<400> 5

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly

```

1             5             10             15

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

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

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

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

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

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

```

```

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(14)
<223> CDR1 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла
<400> 6

```

```

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

```

```

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

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(7)

```

<223> CDR2 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла

<400> 7

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(9)

<223> CDR3 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла

<400> 8

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val  
1 5

<210> 9

<211> 125

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(125)

<223> Варіабельний Домен Важкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(5)  
<223> CDR1 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла  
<400> 10

Thr Tyr Ala Met Asn  
1 5

<210> 11  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(19)  
<223> CDR2 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла  
<400> 11

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

Val Lys Asp

<210> 12  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(14)  
 <223> CDR3 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Мишачого Анти-CD3 Антитіла

<400> 12

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

<210> 13  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> Варіабельний Домен Легкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла

<400> 13

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met  
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
 85 90 95



Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(10)  
<223> CDR1 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла

<400> 14

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

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

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(7)  
<223> CDR2 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла

<400> 15

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(9)  
<223> CDR3 Варіабельного Домена Легкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла

<400> 16

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
1 5

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(119)  
<223> Варіабельний Домен Важкого Ланцюга Мишачого Анти-gpA33 Антитіла

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CDR1 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла  
 <400> 18

Gly Ser Trp Met Asn  
 1 5

<210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CDR2 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла  
 <400> 19

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

Asp

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

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <223> CDR3 Варіабельного Домена Важкого Ланцюга Мишачого Анти-grA33 Антитіла  
 <400> 20

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

<210> 21  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-1

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
130 135 140

Tyr Thr Phe Ser Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly  
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr  
165 170 175

Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
180 185 190

Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp  
195 200 205

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe  
210 215 220

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

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

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

<210> 22  
<211> 813  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-1

<400> 22  
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120  
aagccaggac aggcaccaag gggcctgacg ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc 180  
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggtggtggat ccggcggagg tggacaggtc 360  
cagctgcagc agtctggacc tgagctggtg aagcctgggg cctcagtga gatttcctgc 420  
aaagcttcag gctacacatt cagtggctct tggatgaact ggggtgaagca gaggcctgga 480  
cagggtcttg agtggattgg acggatctac cctggagatg gagaaactaa ctacaatggg 540  
aagtttaagg acaaggccac actgactgca gacaaatcat ccaccacagc ctacatggag 600  
ctcagcagcc tgacctctgt ggactctgcg gtctatttct gtgcaagaat ctatggtaat 660  
aacgtttact tcgatgtctg gggcgcaggg accacggtca ccgtgtcttc cggaggatgt 720

ggcgggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttggagaa ggaggtcgct 780  
gcacttgaaa aggaggtcgc agccctggag aaa 813

<210> 23  
<211> 274  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Другий Поліпептидний Ланцюг DART-1

<400> 23

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met  
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly Gly Gly Ser Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Glu

<210> 24

<211> 822

<212> ДНК

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Другий Поліпептидний Ланцюг DART-1

<400> 24

caaatgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gagggtcacc 60

atgacctgca gtgccaggtc aagtataagt ttcatgtact ggtaccagca gaagccagga 120

tcctccccc gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctttat tctctcaca tcagccgaat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagttacc cactcacgtt cggttctggg 300

```

accaagctgg agctgaaacg ggggtggagga tccggcggag gcggagaggt gcagctggtg      360
gagtcctgggg gaggtcttggg ccagcctgga gggtccttga gactctcctg tgcagcctct      420
ggattcacct tcaacacata cgctatgaat tgggtccgcc aggctccagg gaaggggctg      480
gagtgggttg caaggatcag gtccaagtac aacaattatg caacctacta tgccgactct      540
gtgaaggata gattcaccat ctcaagagat gattcaaaga actcactgta tctgcaaagt      600
aacagcctga aaaccgagga cacggccgtg tattactgtg tgagacacgg taacttcggc      660
aattcttacg tgtcttggtt tgcttattgg ggacagggga cactgggtgac tgtgtcttcc      720
ggaggatgtg gcggtggaaa agtggccgca ctgaaggaga aagttgctgc ttgaaagag      780
aaggtcgccg cacttaagga aaagtcgca gccctgaaag ag                               822

```

```

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

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(125)
<223> Варіабельний Домен Важкого Ланцюга Анти-CD3 Антитіла

```

```

<400> 25

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```



	85		90		95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe					
	100		105		110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		125
<210> 26					
<211> 106					
<212> PRT					
<213> Штучна Послідовність					
<220>					
<223> Варіабельний Домен Легкого Ланцюга Гуманізованого Анти-grA33 Антитіла					
<400> 26					
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met					
	20		25		30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr					
	35		40		45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser					
	50		55		60
Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu					
65		70		75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr					
	85		90		95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		
<210> 27					
<211> 119					
<212> PRT					
<213> Штучна Послідовність					

<220>

<223> Варіабельний Домен Важкого Ланцюга Гуманізованого Анти-gpA33 Антитіла

<400> 27

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

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

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

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 28

<211> 271

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2

<400> 28

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

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

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

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

<210> 29  
<211> 813  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2

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

<210> 30  
<211> 273  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Другий Поліпептидний Ланцюг DART-2

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met  
20 25 30

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

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu

<210> 31  
<211> 819  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Другий Поліпептидний Ланцюг DART-2

<400> 31  
gacattcagc tgactcagtc cccctctttt ctgtccgcat ccgtcggaga tcgagtgact 60  
attacttgct ctgctaggtc ctcaatcagc ttcatgtact ggtatcagca gaagcccggc 120  
aaagcaccta agctgctgat ctacgacaca agcaacctgg cctccggggg gccatctcgg 180  
ttctctggca gtgggtcagg aactgagttt accctgacaa ttagctccct ggaggctgaa 240  
gatgccgcta cctactattg ccagcagtgg agcagctatc ctctgacctt cggacagggg 300  
actaaactgg aaatcaaggg tggaggatcc ggccggcggag gcgaggtgca gctggtggag 360  
tctgggggag gcttgggtcca gcctggaggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 420  
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 480  
tgggttgga ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 540  
aaggatagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 600

```

agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat      660
tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tggtgactgt gtcttcgga      720
ggatgtggcg gtggaaaagt ggccgcactg aaggagaaag ttgctgcttt gaaagagaag      780
gtcgcgcac ttaaggaaaa ggtcgcagcc ctgaaagag      819

```

```

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

```

```

<220>
<223> Лінкер 3 Поліпептид

```

```

<400> 32

```

```

Gly Gly Gly Ser
1

```

```

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

```

```

<220>
<223> Лінкер 3 Поліпептид

```

```

<400> 33

```

```

Gly Gly Gly Asn Ser
1          5

```

```

<210> 34
<211> 46
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

```

```

<220>
<223> Альбумін Зв'язуючий Домен

```

```

<400> 34

```

```

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

```

```

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

```

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

<210> 35  
<211> 321  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/ABD

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly  
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Gly Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly



145					150					155					160				
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asp	Gly	Glu	Thr				
				165					170					175					
Asn	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys				
			180					185					190						
Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp				
		195					200					205							
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ile	Tyr	Gly	Asn	Asn	Val	Tyr	Phe				
	210					215					220								
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Cys				
225					230					235					240				
Gly	Gly	Gly	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu				
				245					250					255					
Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ala	Ala	Leu	Glu	Lys	Gly				
		260						265					270						
Gly	Gly	Ser	Leu	Ala	Gln	Ala	Lys	Glu	Ala	Ala	Ile	Arg	Glu	Leu	Asp				
		275					280					285							
Lys	Tyr	Gly	Val	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ile	Asp	Asn	Ala	Lys				
	290					295				300									
Ser	Ala	Glu	Gly	Val	Lys	Ala	Leu	Ile	Asp	Glu	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu				
305					310					315					320				

Pro

<210> 36  
<211> 963  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність  
<220>

<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/ABD

```

<400> 36
caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg      60
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag      120
aagccaggac aggcaccaag gggcctgacg ggggggtacaa aaaaaagggc tccctggacc      180
cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca      240
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc      300
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggacaggtc      360
cagctgggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaaccggag caagcgtgaa ggtctcctgc      420
aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga      480
caggggactgg agtggatcgg gcgcatctac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgga      540
aagttcaaag accgagtgac catcacagcc gataagtcta ctagtaccgc ctacatggag      600
ctgagctccc tgcggtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac      660
aatgtctatt ttgacgtgtg ggggcaggga acaactgtga ctgtctctc cggaggatgt      720
ggcgggtggag aagtggccgc actggagaaa gaggttgctg ctttgagaaa ggaggtcgct      780
gcacttgaaa aggaggtcgc agccctggag aaaggcggcg ggtctctggc ccaggcaaaa      840
gaggcagcca tccgcgaact ggataaatat ggctgagcgc attattataa gaacctgatt      900
gacaacgcaa aatccgcgga aggcgtgaaa gcactgattg atgaaattct ggccgccctg      960
cct                                                                 963

```

<210> 37  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Лінкер 4 Поліпептид

<400> 37

Ala Pro Ser Ser Ser  
 1 5

<210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Лінкер 4 Поліпептид

<400> 38

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu  
 1 5

<210> 39  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> Пептид 1

<400> 39

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

<210> 40  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність

<220>  
 <223> CH2 і CH3 Домени Модифікованого Fc Домену Першого DART  
 Поліпептидного Ланцюга

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215

<210> 41

<211> 217

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> CH2 і CH3 Домени Модифікованого Fc Домену Третього DART  
Поліпептидного Ланцюга

<400> 41

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

```

210                                215

<210> 42
<211> 503
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 42

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
              20              25              30

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

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50              55              60

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala Glu
65              70              75              80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
              85              90              95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
              100              105              110

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

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

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

```

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr  
 165 170 175  
 Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys  
 180 185 190  
 Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala  
 195 200 205  
 Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser  
 210 215 220  
 Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala  
 245 250 255  
 Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu  
 260 265 270  
 Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 275 280 285  
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 290 295 300  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 305 310 315 320  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 325 330 335  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 340 345 350  
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 355 360 365  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

370 375 380

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
500

<210> 43  
<211> 1509  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 43  
gacattcagc tgactcagtc cccctctttt ctgtccgcat ccgtcggaga tcgagtgact 60  
attacttgct ctgctaggtc ctcaatcagc ttcatgtact ggtatcagca gaagcccggc 120  
aaagcaccta agctgctgat ctacgacaca agcaacctgg cctccggggt gccatctcgg 180  
ttctctggca gtgggtcagg aactgagttt accctgacaa ttagctccct ggaggctgaa 240



```

gatgccgcta cctactattg ccagcagtgagg agcagctatc ctctgacctt cggacagggg 300
actaaactgg aaatcaaggg tggaggatcc ggcggcggag gcgagggtgca gctgggtggag 360
tctggggggag gcttgggtcca gcctggagggg tccctgagac tctcctgtgc agcctctgga 420
ttcaccttca gcacatacgc tatgaattgg gtccgccagg ctccagggaa ggggctggag 480
tgggttggaa ggatcaggtc caagtacaac aattatgcaa cctactatgc cgactctgtg 540
aaggatagat tcaccatctc aagagatgat tcaaagaact cactgtatct gcaaatgaac 600
agcctgaaaa ccgaggacac ggccgtgtat tactgtgtga gacacggtaa cttcggcaat 660
tcttacgtgt cttggtttgc ttattgggga caggggacac tgggtactgt gtcttccgga 720
ggatgtggcg gtggagaagt ggccgcactg gagaagagg ttgctgcttt ggagaaggag 780
gtcgtgcac ttgaaaagga ggtcgcagcc ctggagaaag gcggcgggga caaaactcac 840
acatgcccac cgtgcccagc acctgaagcc gcggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 900
ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtgggtgtg 960
gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 1020
cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 1080
gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1140
aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1200
gaaccacagg tgtacaccct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1260
ctgtggtgcc tggtaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaat 1320
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1380
ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1440
tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1500
ccgggtaaa 1509

```

<210> 44

<211> 271

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Другий Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 1 Конструкт



Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe  
210 215 220

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

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

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

<210> 45  
<211> 813  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Другий Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 45  
caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcgggaac tgtgaccctg 60  
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag 120  
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc 180  
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca 240  
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc 300  
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggacaggtc 360  
cagctggtcc agagcggggc cgaagtcaaa aaacccggag caagcgtgaa ggtctcctgc 420  
aaagcatcag gctatacatt tacaggcagc tggatgaact gggtgaggca ggctccagga 480  
cagggactgg agtggatcgg gcgcatctac cctggagacg gcgaaactaa ctataatgga 540  
aagttcaaag accgagtgac catcacagcc gataagtcta ctagtaccgc ctacatggag 600  
ctgagctccc tgcggtctga agataccgcc gtctactatt gcgctagaat ttacggaaac 660  
aatgtctatt ttgacgtgtg ggggcagggg acaactgtga ctgtctctc cggaggatgt 720  
ggcgggtggaa aagtggccgc actgaaggag aaagttgctg ctttgaaaga gaaggctgcc 780

gcacttaagg aaaaggtcgc agccctgaaa gag

813

<210> 46

<211> 227

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<223> Третій Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 1 Конструкт

<400> 46

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
225

<210> 47  
<211> 681  
<212> ДНК  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Молекула Нуклеїнової Кислоти Кодуюча Третій Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 1 Конструкт

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

```

<210> 48
<211> 508
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<223> Перший Поліпептидний Ланцюг DART-2 w/Fc Версія 2 Конструкт

<400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

```

69

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile  
385 390 395 400

Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
405 410 415

Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu  
420 425 430

Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val  
435 440 445

Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp  
450 455 460

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly  
465 470 475 480

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

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

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(198)  
<223> V35 алель (FN18+) э CD3 епсилон

<400> 49

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asn Gln Arg Arg Ile  
195

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

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(171)

<223> CD3 дельта

<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 51

<211> 207

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(207)

<223> CD3 епсилон

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(150)  
<223> CD3 дельта

<400> 52

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Trp Ala Arg Asn Lys  
145 150

<210> 53  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> 6His Пептид

<400> 53

His His His His His His  
1 5

<210> 54  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Гетеродимеризація Домена

<400> 54

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

<210> 55  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Штучна Послідовність

<220>  
<223> Гетеродимеризація Домена

<400> 55

Val Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

<210> 56  
<211> 7

<212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність  
 <220>  
 <223> Гетеродимеризація Домена  
 <400> 56

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5

<210> 57  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Штучна Послідовність  
 <220>  
 <223> Гетеродимеризація Домена  
 <400> 57

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 1 5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Біспецифічне діатіло, причому зазначене біспецифічне діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом grA33 і з епітопом CD3, причому біспецифічне діатіло містить перший поліпептидний ланцюг і другий поліпептидний ланцюг, причому зазначені перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і при цьому:
- 10 А) перший поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до C-кінця:
- i) домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VH<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причому зазначені субдомени (1A) і (1B) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO: 1);
- 15 ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою К-спіральный домен (SEQ ID NO: 4) або Е-спіральный домен (SEQ ID NO: 3), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домену 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO: 2);
- В) другий поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до C-кінця:
- i) домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VL<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причому зазначені субдомени (1A) і (1B) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO: 1);
- 20 ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою Е-спіральный домен (SEQ ID NO: 3) або К-спіральный домен (SEQ ID NO: 4), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домену 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO: 2); і причому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга не являють собою обидва Е-спіральных домени або обидва К-спіральных домени;
- 25 і при цьому:
- (а) зазначений домен VL зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен VH зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють моновалентний антигензв'язувальний домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3; і
- 30 (б) зазначений домен VH зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен VL зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють моновалентний антигензв'язувальний домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом grA33.
2. Біспецифічне діатіло за п. 1, в якому зазначений перший поліпептидний ланцюг містить альбумінзв'язувальний домен (SEQ ID NO: 34), причому зазначений альбумінзв'язувальний домен розташований на С-кінці стосовно зазначеного домену 2 і відділений від зазначеного домену 2 лінкером 3 (SEQ ID NO: 32).
3. Біспецифічне Fc-діатіло, причому зазначене біспецифічне Fc-діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом grA33 і з епітопом CD3 і містить домен Fc IgG, причому біспецифічне Fc-діатіло містить перший поліпептидний ланцюг, другий поліпептидний ланцюг і третій поліпептидний ланцюг, причому зазначені перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і зазначені перший і третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і при цьому:
- 40 А) перший поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до C-кінця:
- i) домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VL<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причому зазначені субдомени (1A) і (1B) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO: 1);
- 45 ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою Е-спіральный домен (SEQ ID NO: 3) або К-спіральный домен (SEQ ID NO: 4), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домену 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO: 2); і
- 50 iii) домен 3, який містить субдомен (3A), що містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39) і субдомен (3B), що містить поліпептидну частину домену Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG; причому зазначені домени 3 і 2 відділені один від одного спейсерним пептидом, який має послідовність GGG (лінкер 5);
- 55 В) другий поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до C-кінця:
- i) домен 1, який містить субдомен (1A), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5), і субдомен (1B), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з grA33 (VH<sub>grA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причому зазначені субдомени (1A) і (1B) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO: 1);
- 60

- ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO: 4) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO: 3), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домену 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO: 2); і причому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга не являють собою обидва Е-спіральних домени або обидва К-спіральних домени; і
- С) третій поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця, домен 3, який містить:
- (1) субдомен (3А), що містить цистеїновмісний пептид (пептид І) (SEQ ID NO: 39); і
- (2) субдомен (3В), що містить поліпептидну частину домену Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG;
- і при цьому:
- (а) зазначені поліпептидні частини доменів Fc IgG зазначеного першого та третього поліпептидного ланцюга утворюють зазначений домен Fc IgG;
- (b) зазначений домен VL зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен VH зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють моновалентний антигензв'язувальний домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом gpA33; і
- (с) зазначений домен VH зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен VL зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють моновалентний антигензв'язувальний домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3.
4. Біспецифічне Fc-діатіло, причому зазначене біспецифічне Fc-діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом gpA33 і з епітопом CD3 і містить домен Fc IgG, причому біспецифічне Fc-діатіло містить перший поліпептидний ланцюг, другий поліпептидний ланцюг і третій поліпептидний ланцюг, причому зазначені перший та другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і зазначені перший і третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним, і при цьому:
- А) перший поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця:
- i) домен 3, який містить субдомен (3А), що містить цистеїновмісний пептид (пептид 1) (SEQ ID NO: 39), і субдомен (3В), що містить поліпептидну частину домену Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домену Fc імуноглобуліну IgG;
- ii) домен 1, який містить субдомен (1А), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з gpA33 (VL<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 26), і субдомен (1В), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VH<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 25), причому зазначені субдомени (1А) і (1В) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO: 1); причому зазначені домени 1 і 3 відділені один від одного спейсерним пептидом (лінкер 4) (SEQ ID NO: 38);
- iii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою Е-спіральний домен (SEQ ID NO: 3) або К-спіральний домен (SEQ ID NO: 4), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домену 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO: 2); і
- В) другий поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця:
- i) домен 1, який містить субдомен (1А), що містить домен VL моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з CD3 (VL<sub>CD3</sub>) (SEQ ID NO: 5); і субдомен (1В), що містить домен VH моноклонального антитіла, здатного зв'язуватися з gpA33 (VH<sub>gpA33</sub>) (SEQ ID NO: 27); причому зазначені субдомени (1А) і (1В) відділені один від одного пептидним лінкером (SEQ ID NO: 1);
- ii) домен 2, причому зазначений домен 2 являє собою К-спіральний домен (SEQ ID NO: 4) або Е-спіральний домен (SEQ ID NO: 3), причому зазначений домен 2 відділений від зазначеного домену 1 пептидним лінкером (SEQ ID NO: 2); і причому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга не являють собою обидва Е-спіральних домени або обидва К-спіральних домени; і
- С) третій поліпептидний ланцюг містить у напрямку від N-кінця до С-кінця, домен 3, який містить:
- (1) субдомен (3А), що містить цистеїновмісний пептид (пептид І) (SEQ ID NO: 39); і
- (2) субдомен (3В), що містить поліпептидну частину домену Fc IgG, що містить домени CH2 і CH3 домена Fc імуноглобуліну IgG;
- і при цьому:
- (а) зазначені поліпептидні частини доменів Fc IgG зазначеного першого та третього поліпептидного ланцюга утворюють зазначений домен Fc IgG;
- (b) зазначений домен VL зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен VH зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють моновалентний антигензв'язувальний домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом gpA33; і



(с) зазначений домен VH зазначеного першого поліпептидного ланцюга та зазначений домен VL зазначеного другого поліпептидного ланцюга утворюють моновалентний антигензв'язувальний домен, здатний специфічно зв'язуватися з епітопом CD3.

5. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким із пп. 3-4, в якому зазначений субдомен (3B) зазначеного першого поліпептидного ланцюга містить послідовність, відмінну від послідовності зазначеного субдомену (3B) зазначеного третього поліпептидного ланцюга.

6. Біспецифічне Fc-діатіло за п. 5, в якому зазначений субдомен (3B) зазначеного першого поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40, і зазначений субдомен (3B) зазначеного третього поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41.

7. Біспецифічне Fc-діатіло за п. 5, в якому зазначений субдомен (3B) зазначеного першого поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 41, і зазначений субдомен (3B) зазначеного третього поліпептидного ланцюга містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 40.

8. Біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким із пп. 3-7, в якому зазначений домен 3 зазначеного першого поліпептидного ланцюга та/або зазначений домен 3 зазначеного третього поліпептидного ланцюга містить варіантну послідовність CH2-CH3, яка проявляє змінене зв'язування з рецептором Fcγ.

9. Біспецифічне діатіло за будь-яким із пп. 1-2 або біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким із пп. 3-8, в якому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга містить E-спіраль (SEQ ID NO: 3), і зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга містить K-спіраль (SEQ ID NO: 4).

10. Біспецифічне діатіло за будь-яким із пп. 1-2 або біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким із пп. 3-8, в якому зазначений домен 2 зазначеного першого поліпептидного ланцюга містить K-спіраль (SEQ ID NO: 4), і зазначений домен 2 зазначеного другого поліпептидного ланцюга містить E-спіраль (SEQ ID NO: 3).

11. Біспецифічне діатіло, причому зазначене біспецифічне діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD3 і з епітопом gpA33, причому зазначене біспецифічне діатіло містить:

(1) перший поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28, і другий поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30; або  
(2) перший поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 35, і другий поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 30; причому зазначений перший і зазначений другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним дисульфідним зв'язком.

12. Біспецифічне Fc-діатіло, причому зазначене біспецифічне Fc-діатіло здатне специфічно зв'язуватися з епітопом CD3 і з епітопом gpA33 і містить домен Fc IgG, причому зазначене біспецифічне Fc-діатіло містить:

(1) перший поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 42, другий поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 44, і третій поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46; або  
(2) перший поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 48, другий поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 28, і третій поліпептидний ланцюг, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 46;

причому зазначений перший і зазначений другий поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним першим дисульфідним зв'язком, і зазначений перший і третій поліпептидні ланцюги ковалентно зв'язані один із одним другим дисульфідним зв'язком.

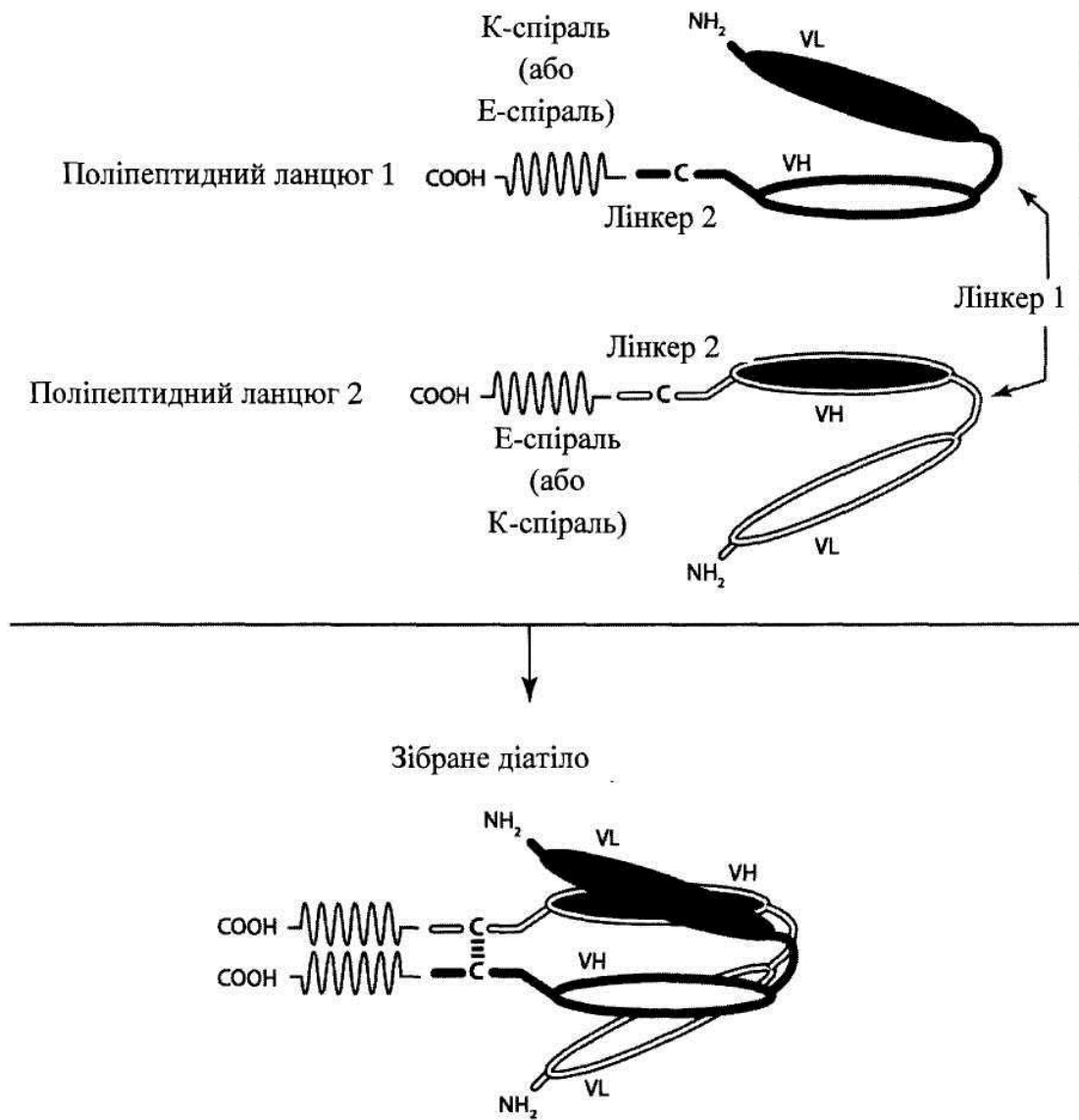
13. Фармацевтична композиція, яка містить біспецифічне діатіло за будь-яким із пп. 1-2 або 9-11 або біспецифічне Fc-діатіло за будь-яким із пп. 3-10 або 12; і фізіологічно прийнятний носій.

14. Застосування біспецифічних діатіл за будь-яким із пп. 1-2 або 9-11, або біспецифічних Fc-діатіл за будь-яким із пп. 3-10 або 12, або фармацевтичної композиції за п. 13 у лікуванні злоякісної пухлини, що характеризується експресією gpA33.

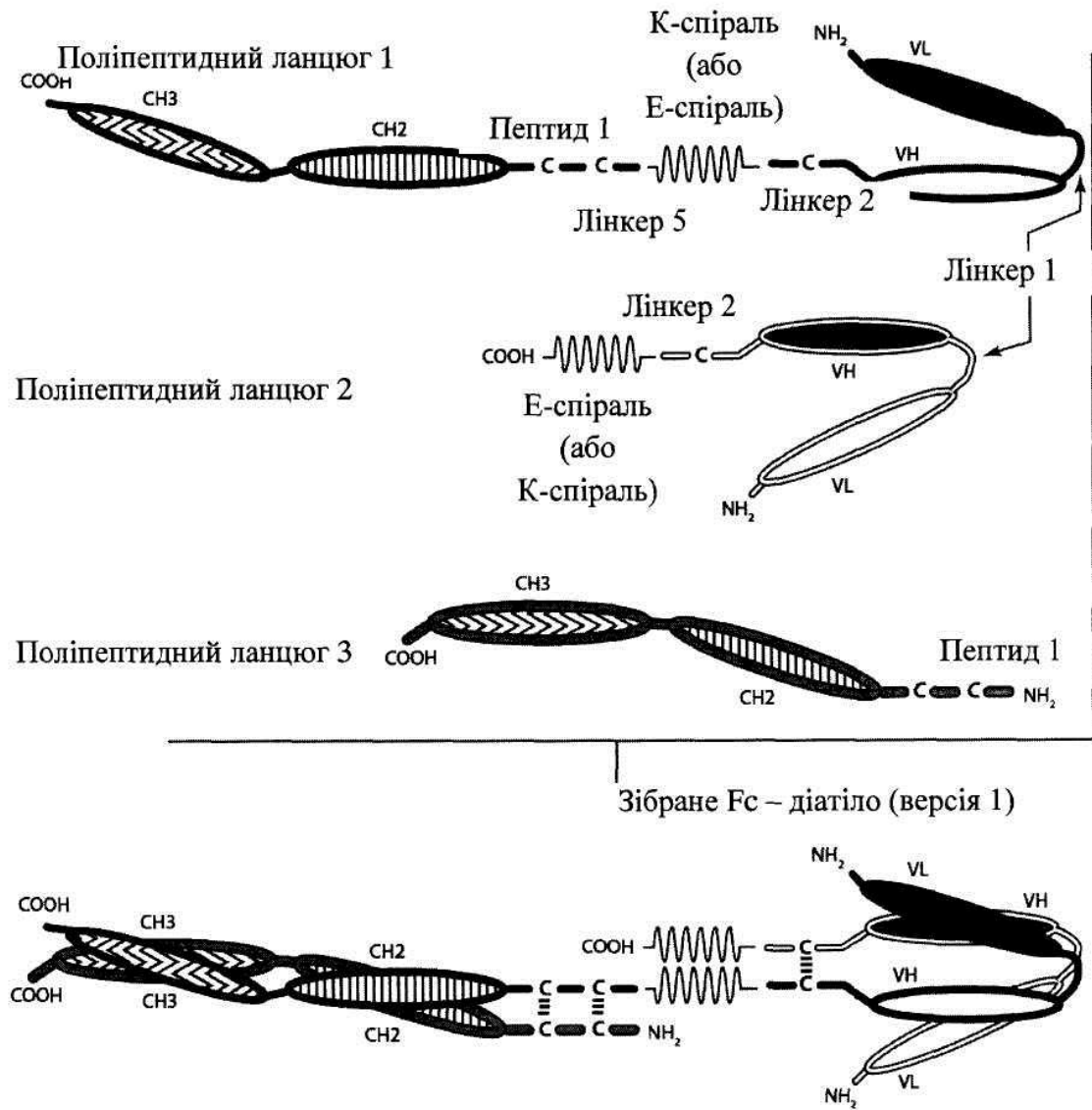
15. Застосування за п. 14, при якому зазначена злоякісна пухлина являє собою колоректальний рак, рак товстої кишки, рак шлунку або рак підшлункової залози.

16. Клітина, яка експресує поліпептидний ланцюг будь-якого з біспецифічних діатіл за пп. 1-2 або 9-11 або поліпептидний ланцюг будь-якого з біспецифічних Fc-діатіл за пп. 3-10 або 12.

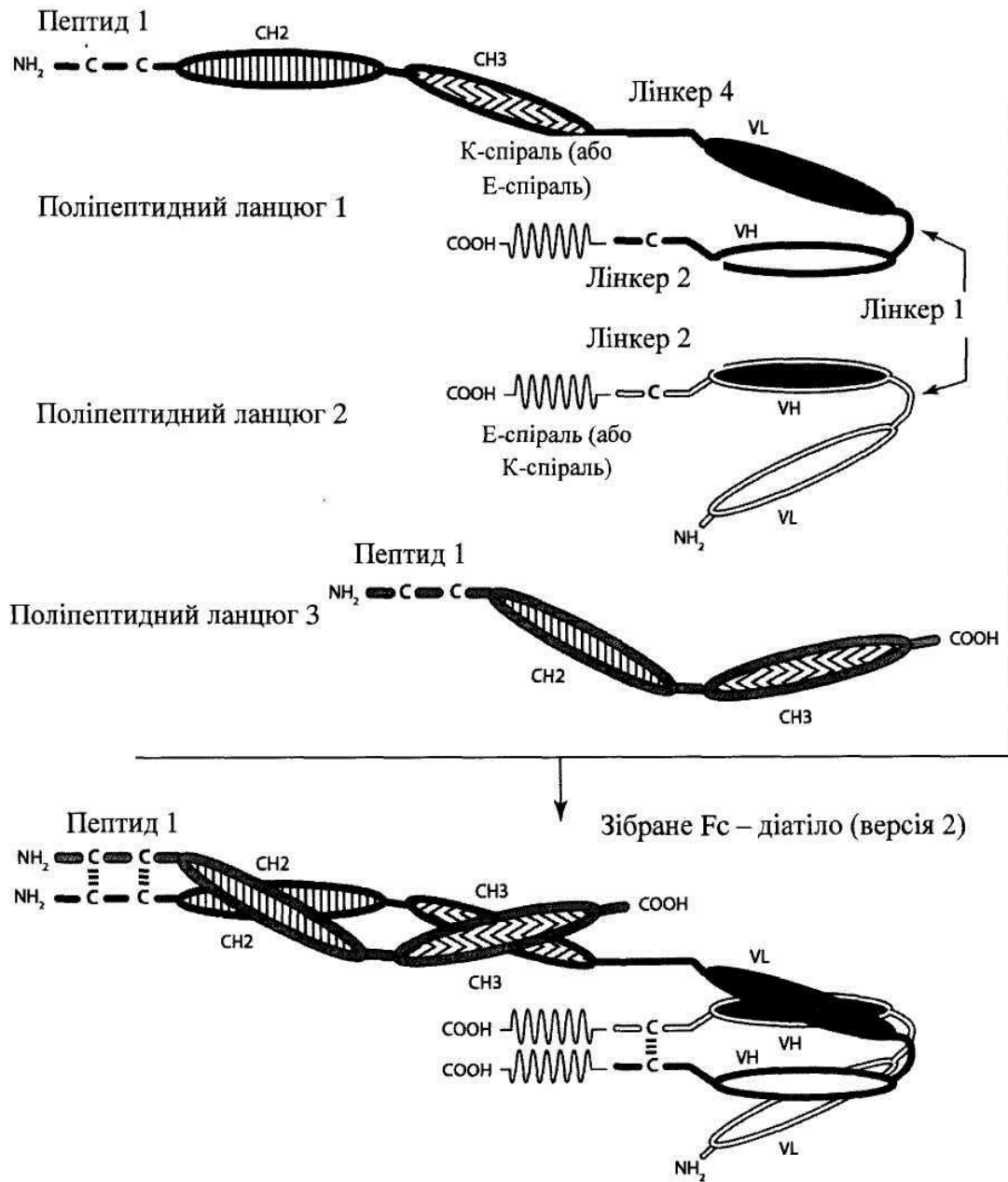
17. Полінуклеотид, який кодує зазначений перший або другий поліпептидний ланцюг біспецифічного діатіла за будь-яким з пп. 1-2 або 9-11, або зазначений перший або другий поліпептидний ланцюг біспецифічного Fc-діатіла за будь-яким з пп. 3-10 або 12.



ФІГУРА 1

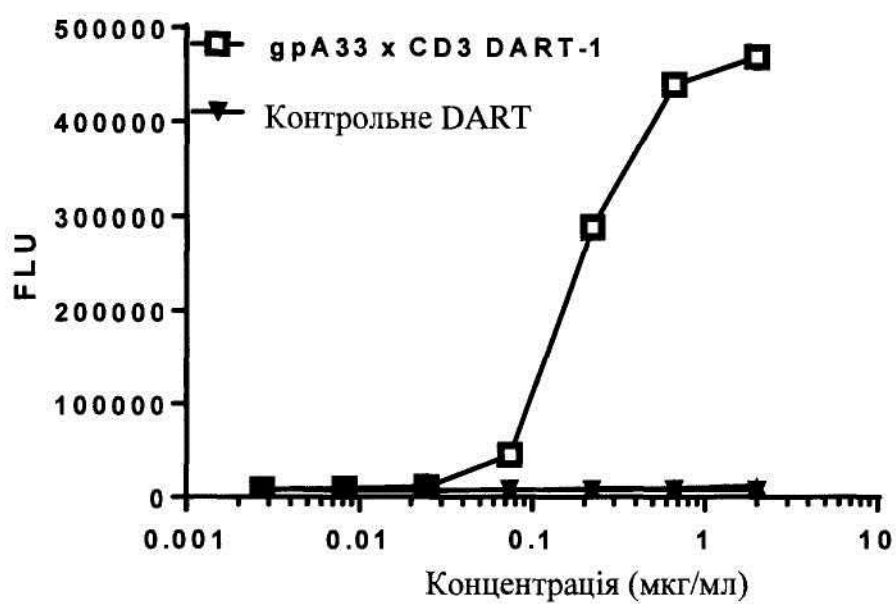


ФІГУРА 2А



ФІГУРА 2В

Захоплення shCD3/ виявлення gpA33



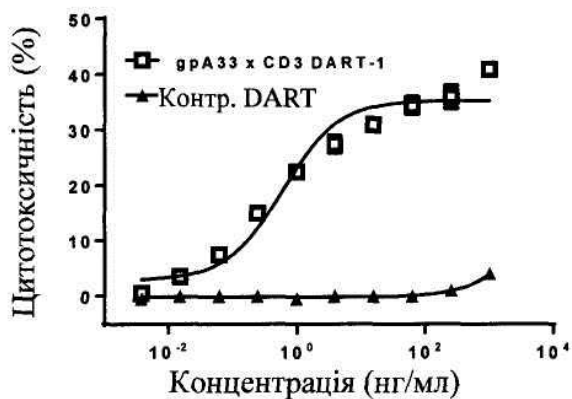
ФІГУРА 3

Клітини CSLC товстої кишки  
РВМС людини – Е:Е=25:1



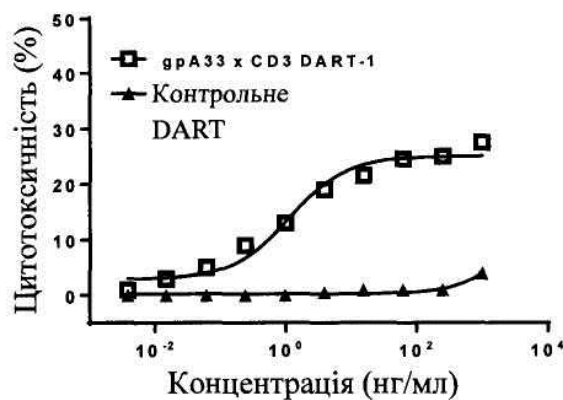
ФІГУРА 4А

Клітини колоректального раку Colo205  
Активовані Т-клітини – Е:Е=10:1

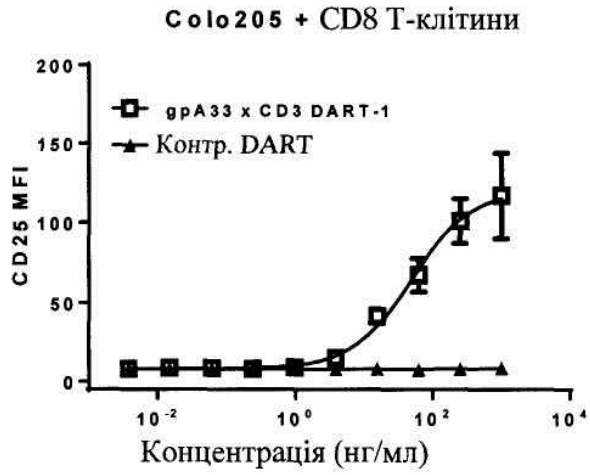


ФІГУРА 4В

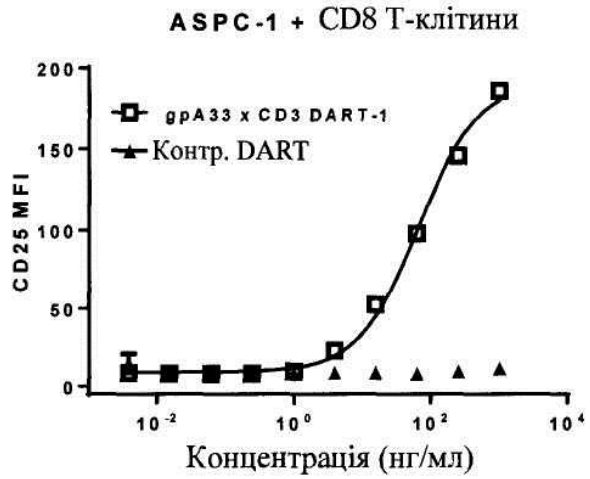
Клітини раку підшлункової залози ASPC  
Активовані Т-клітини – Е:Е=10:1



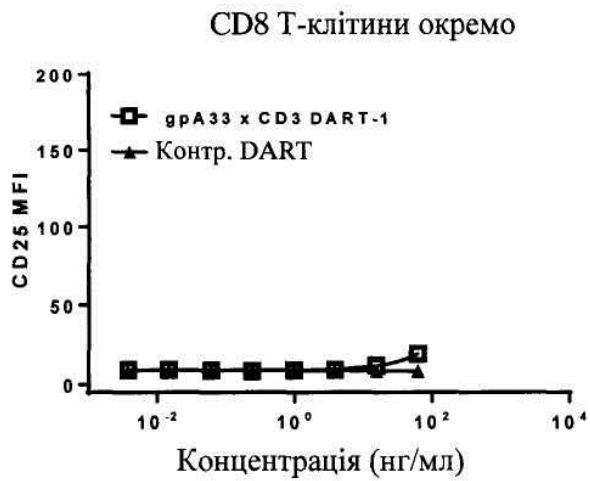
ФІГУРА 4С



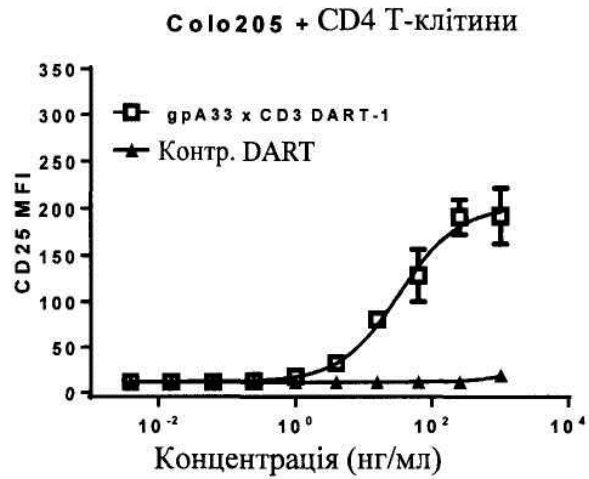
**ФІГУРА 5А**



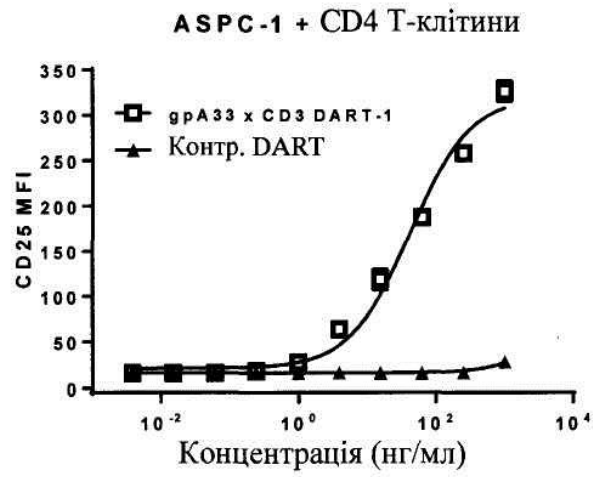
**ФІГУРА 5В**



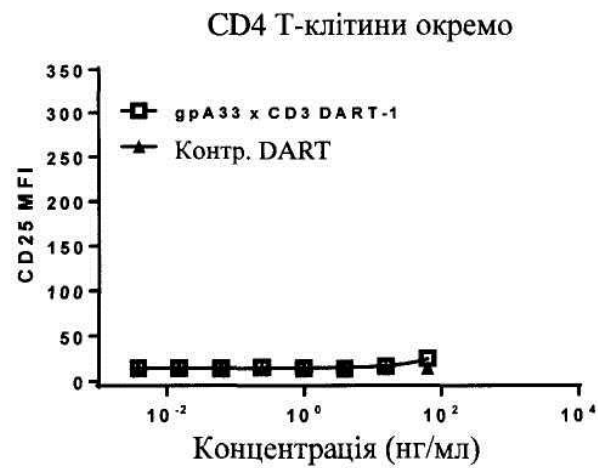
**ФІГУРА 5С**



**ФІГУРА 5D**

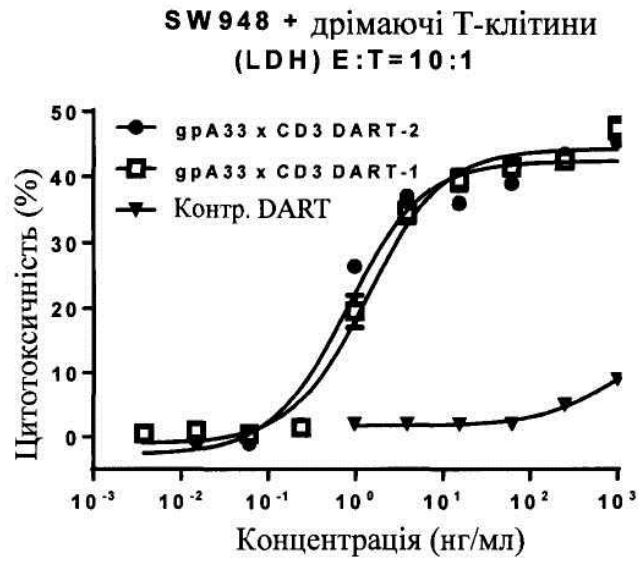


**ФІГУРА 5E**

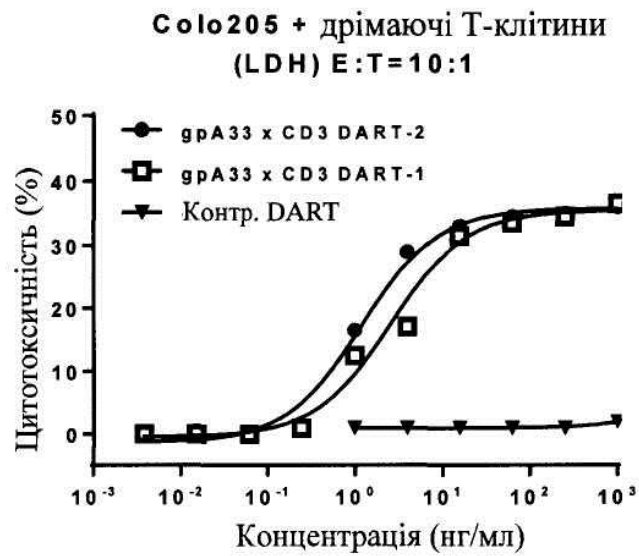


**ФІГУРА 5F**



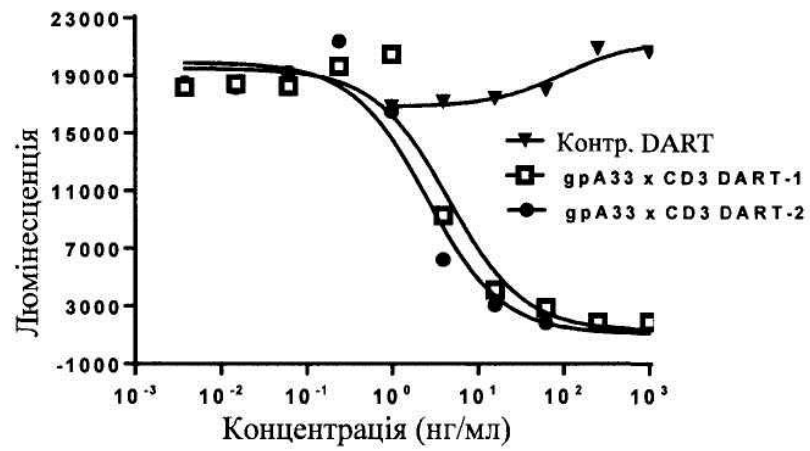


**ФІГУРА 6А**



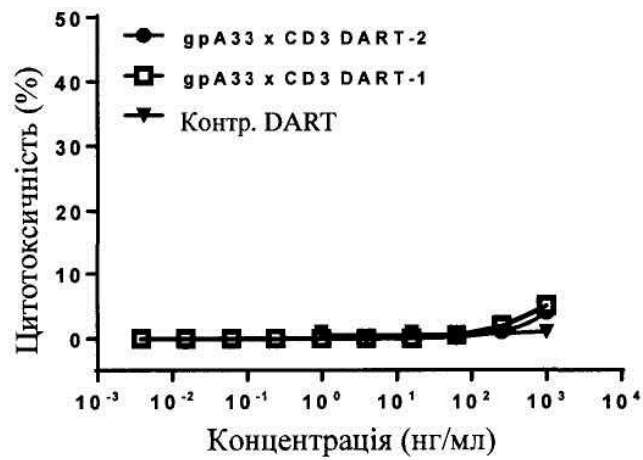
**ФІГУРА 6В**

**Colo205-Luc + дрімаючі Т-клітини  
(LUM) E:T=10:1**

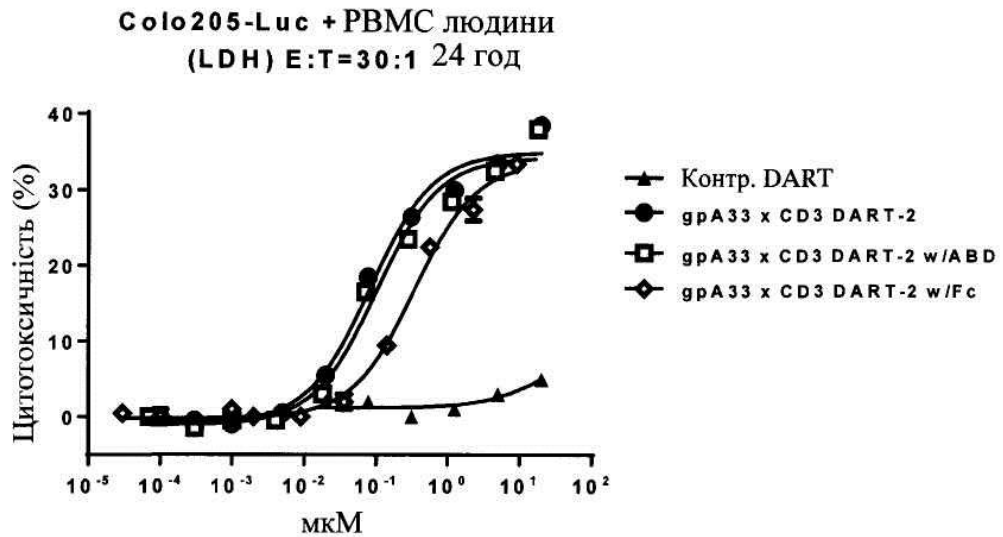


**ФІГУРА 6C**

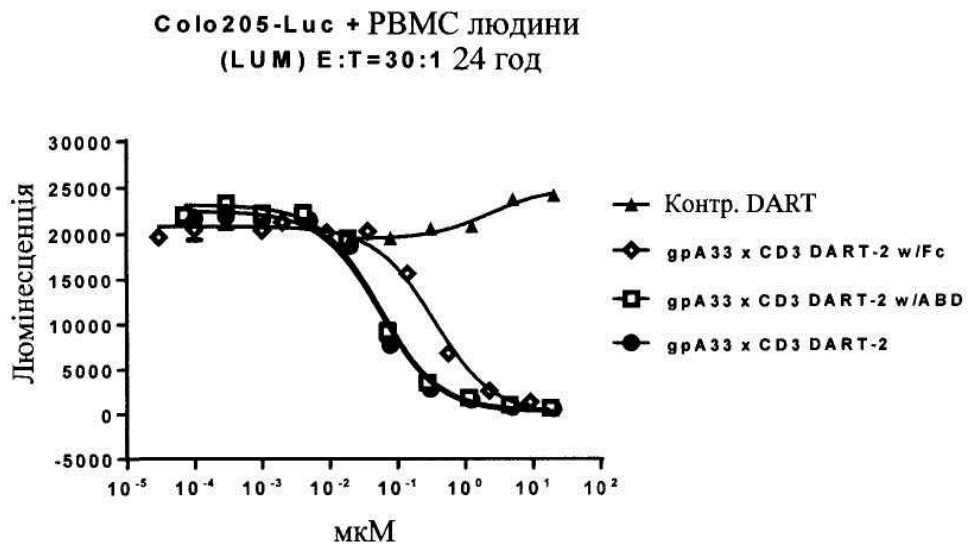
**НСТ116 (A33-ve) + дрімаючі Т-клітини  
(LDH) E:T=10:1**



**ФІГУРА 6D**

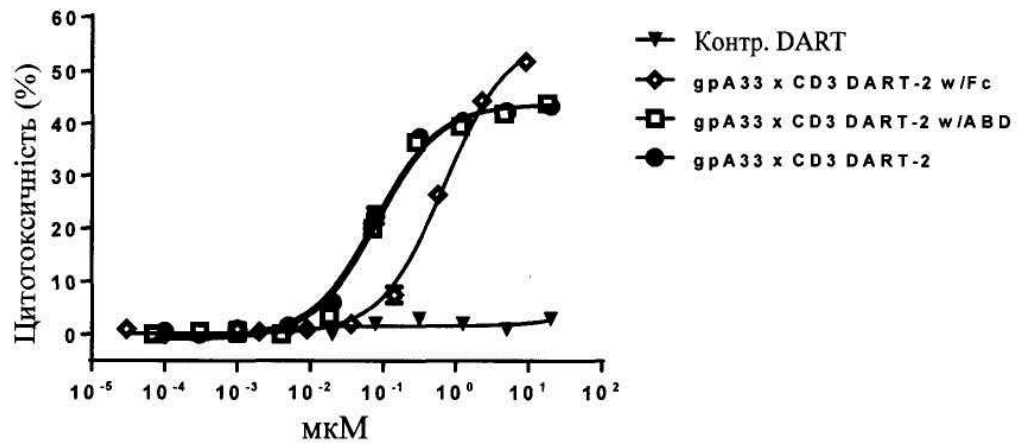


**ФІГУРА 7А**



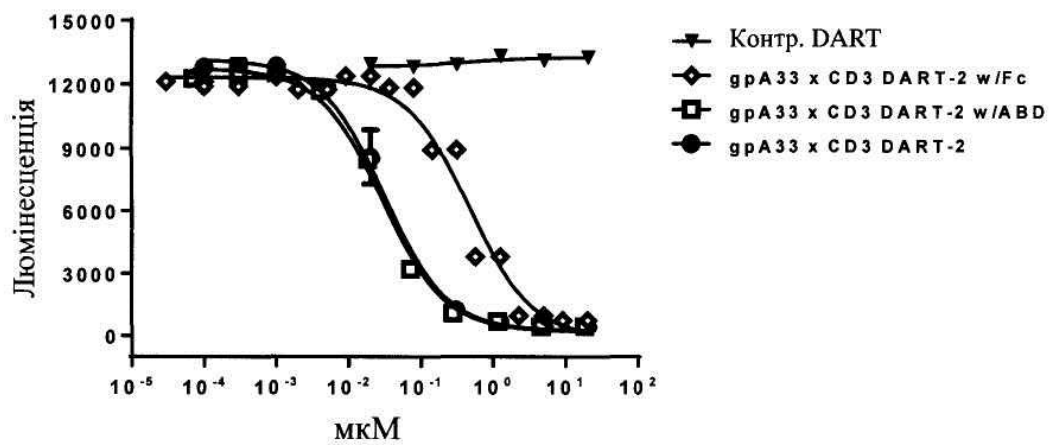
**ФІГУРА 7В**

**Colo205-Luc + РВМС яванського макака  
(LDH) E:T=30:1 24 год**

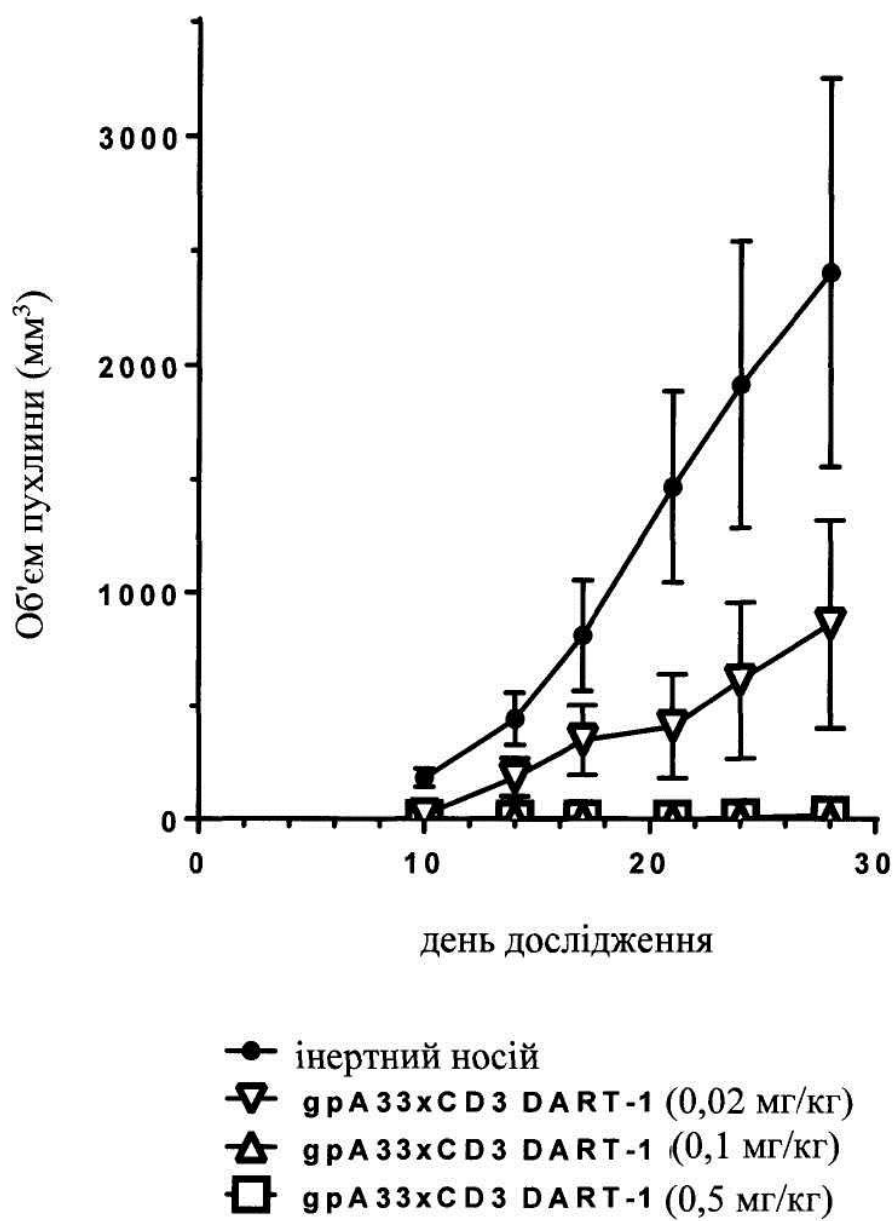


**ФІГУРА 7C**

**Colo205-Luc + РВМС яванського макака  
(LUM) E:T=30:1 24 год**

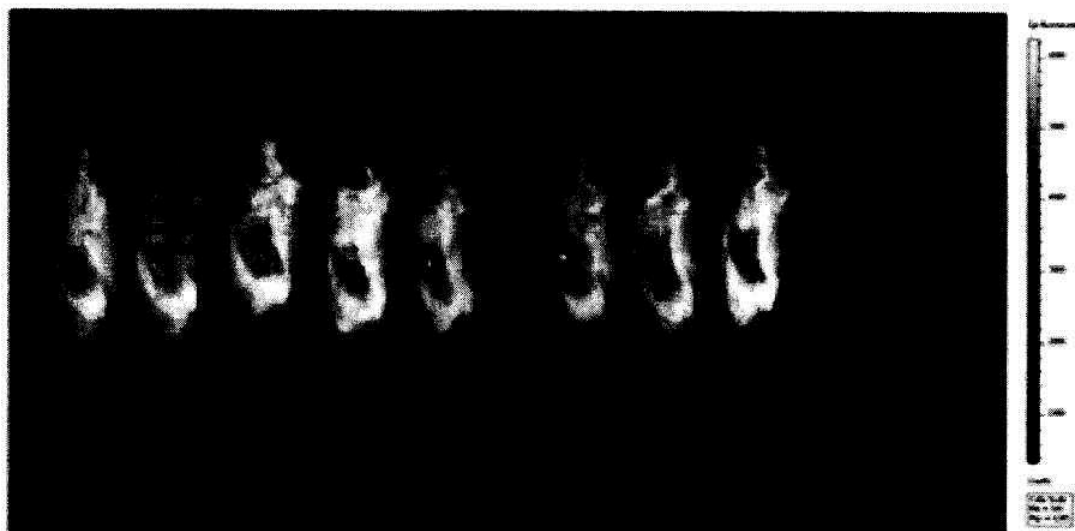


**ФІГУРА 7D**

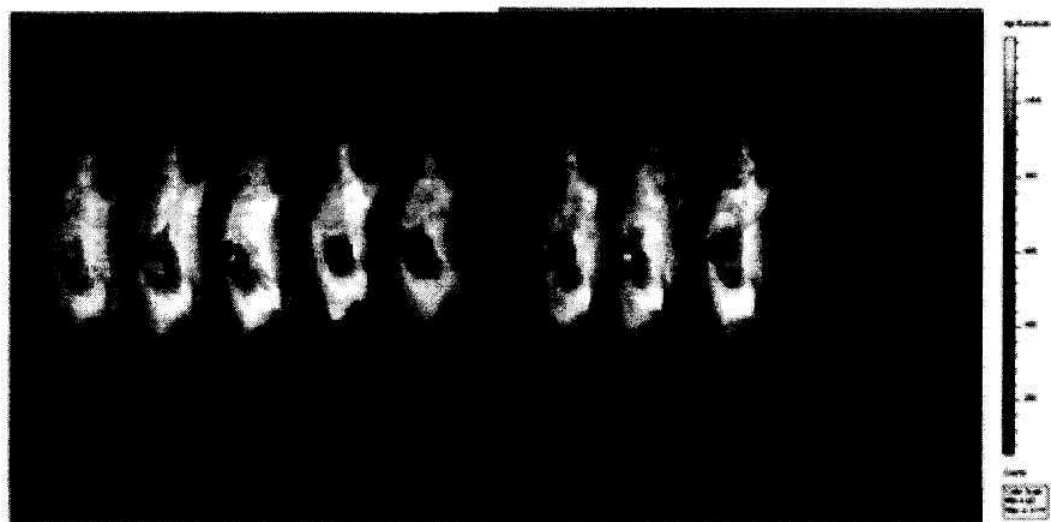


ФІГУРА 8

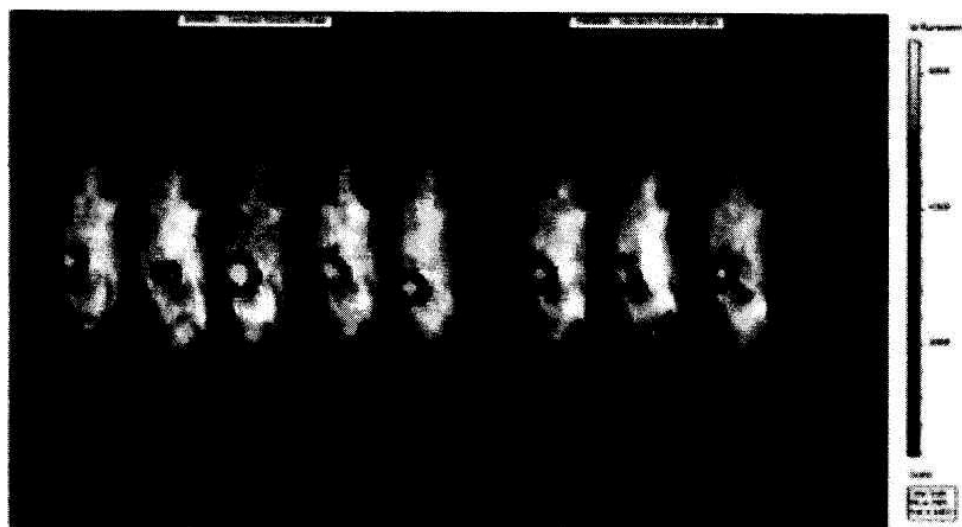
**ФІГУРА 9А День 2 Візуальні дані (інертний носій):**



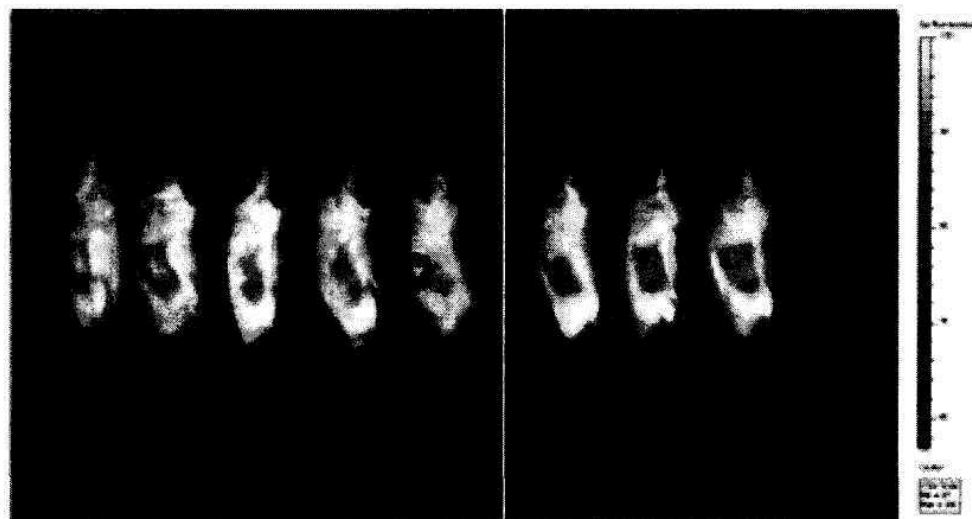
**ФІГУРА 9В День 2 Візуальні дані (grA33 x CD3 DART-1  
(0,5 мг/кг)):**

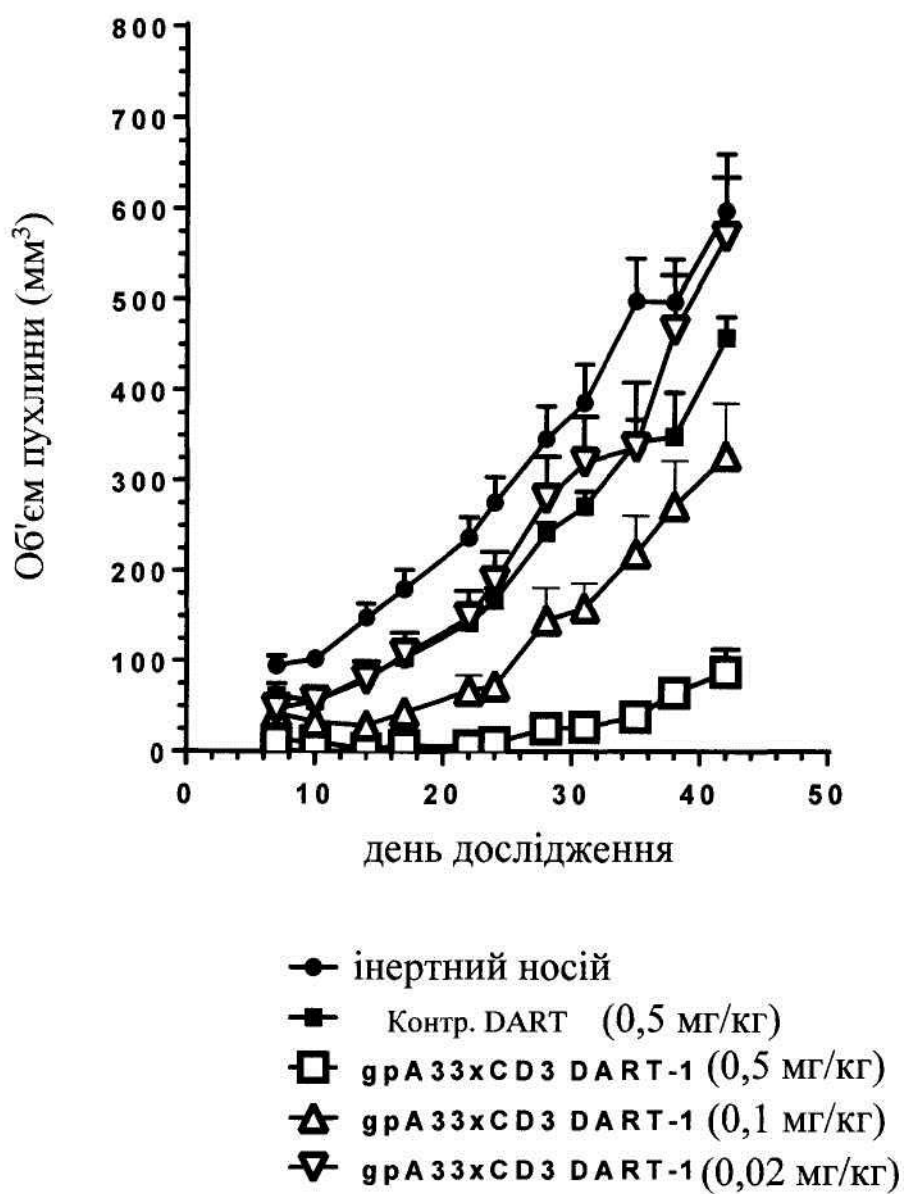


**ФІГУРА 9С День 12 Візуальні дані (інертний носій):**



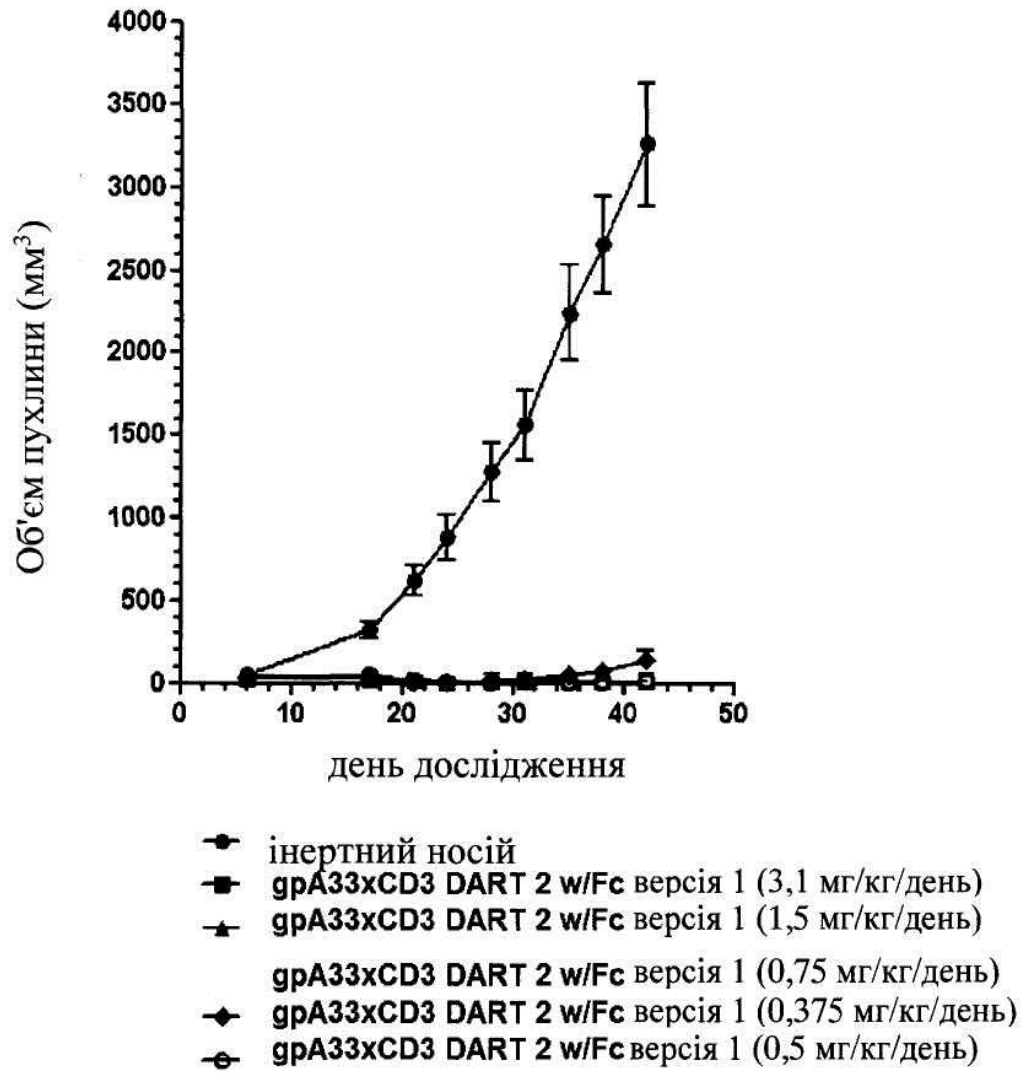
**ФІГУРА 9D День 12 Візуальні дані (grA33 x CD3 DART-1 (0,5 мг/кг)):**



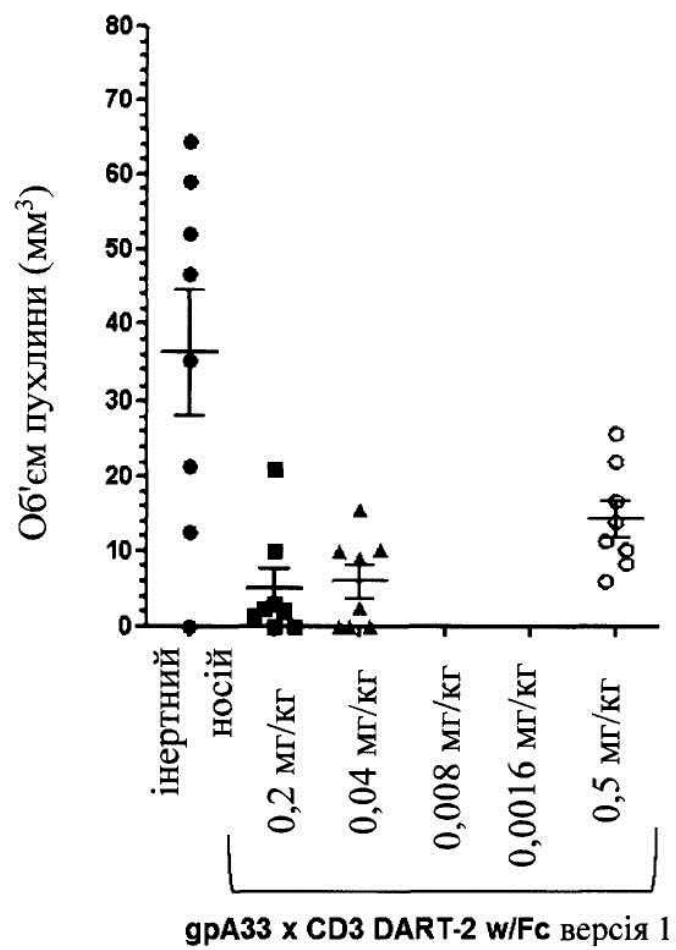


ФІГУРА 10

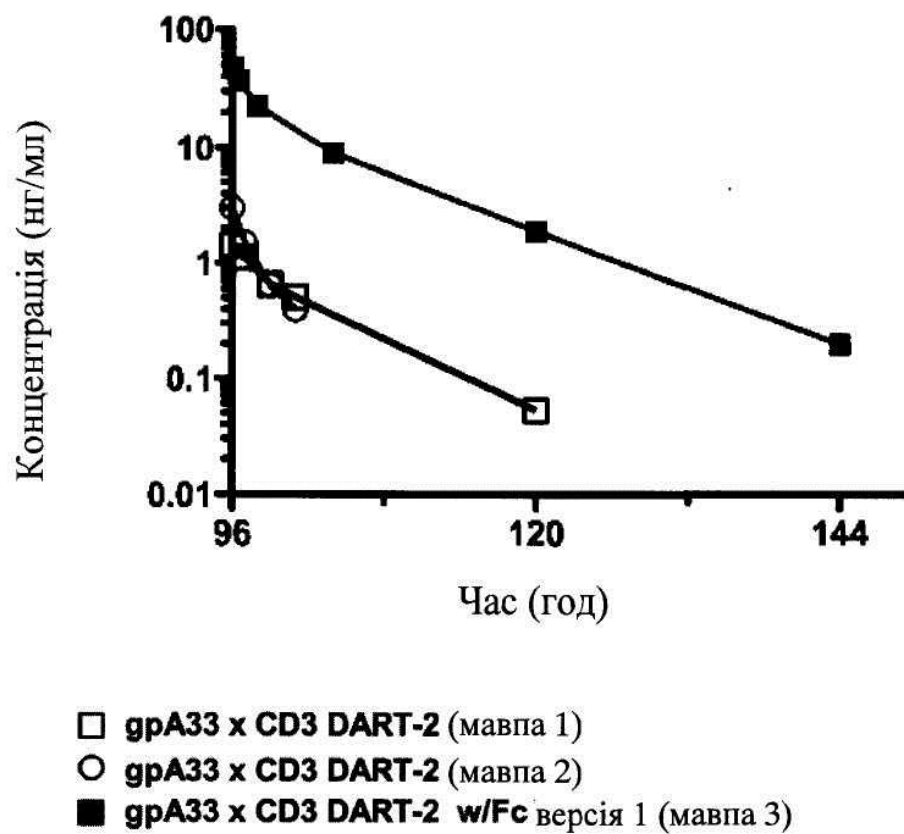




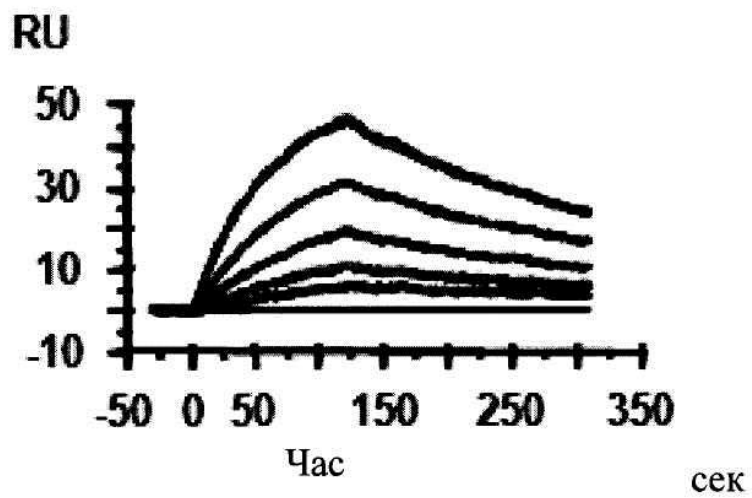
ФІГУРА 11



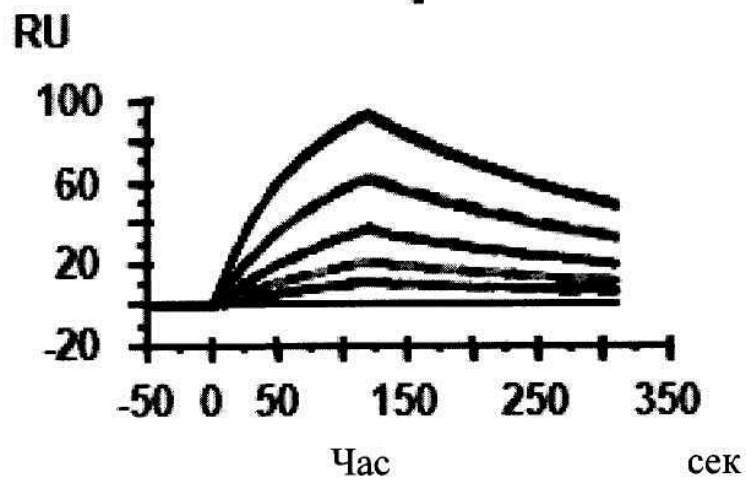
ФІГУРА 12



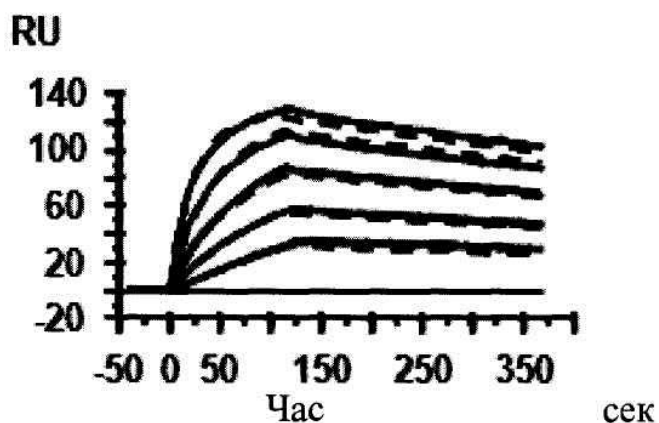
ФІГУРА 13



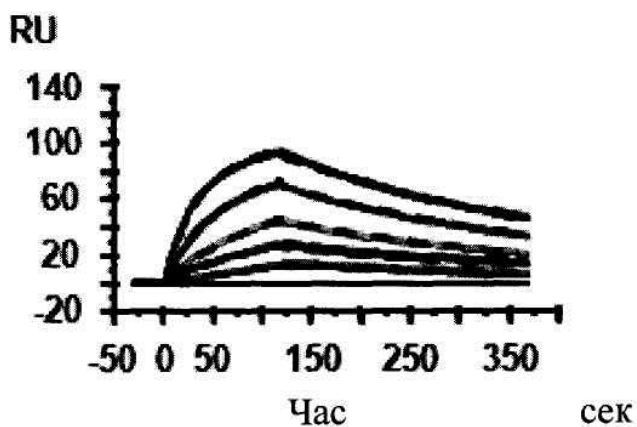
**Зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc з CD3 людини**  
**ФІГУРА 14А**



**Зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc з CD3 яванського макака**  
**ФІГУРА 14В**



**Зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc з грA33 людини**  
**ФІГУРА 15А**



**Зв'язування версії 1 DART-2 w/Fc з грA33 яванського макака**  
**ФІГУРА 15В**

---

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601