

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201992312** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2020.03.06

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2018.04.03

---

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-CD37-АНТИТЕЛА, МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-CD37-АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) 62/479,712; PCT/EP2018/057836

(32) 2017.03.31; 2018.03.27

(33) US; EP

(86) PCT/EP2018/058479

(87) WO 2018/178396 2018.10.04

(71) Заявитель:  
ГЕНМАБ ХОЛДИНГ Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Остинди Симоне, Бёрскенс Франк,  
Брей Эстер, Ван Ден Бринк Эдвард,  
Холленстейн Андреас, Овердейк  
Марейе (NL), Линдорфер Маргарет,  
Тейлор Рональд (US), Паррен Паул,  
Ван Дер Хорст Хилма, И.Д. Шамюло  
Мартина, Мютис Тюна (NL)

(74) Представитель:  
Фелицына С.Б. (RU)

---

(57) Молекулы биспецифического антитела, специфичного к CD37, связывающиеся с различными эпитопами человеческого антигена CD37, где молекулы биспецифического антитела имеют усиленные Fc-Fc взаимодействия при связывании с CD37 на поверхности клетки. Изобретение также относится к моноклональным исходным антителам, из которых получают первую или вторую связывающие области молекул биспецифического антитела. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим эти молекулы, и к лечению рака и других заболеваний с использованием этих композиций.

---

**A1**

**201992312**

**201992312**

**A1**

## **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИ-CD37-АНТИТЕЛА, МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИ-CD37-АНТИТЕЛА И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к биспецифическим антителам, которые специфически связывают человеческий антиген CD37. Изобретение относится, в частности, к CD37-специфическим молекулам биспецифического антитела, связывающимся с различными эпитопами человеческого антигена CD37, где молекулы биспецифического антитела имеют улучшенные взаимодействия Fc-Fc при связывании с CD37 на поверхности клетки и, таким образом, обладают улучшенными эффекторными функциями. Изобретение также относится к новым моноклональным исходным антителам, из которых получают первую или вторую антигенсвязывающую область молекул биспецифического антитела. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим эти молекулы, и к лечению рака и других заболеваний с использованием этих композиций.

### **Предшествующий уровень техники**

Лейкоцитарный антиген CD37 («CD37»), также известный как GP52-40, тетраспанин-26 или TSPAN26, является трансмембранным белком суперсемейства тетраспанинов (Maecker et al., FASEB J. 1997; 11: 428-442). В нормальной физиологии CD37 экспрессируется на В-клетках во время стадий от пре-В до периферических зрелых В-клеток, но, как сообщается, отсутствует на плазматических клетках (Link et al., J. Pathol. 1987; 152: 12-21). Антиген CD37 слабо экспрессируется на Т-клетках и миелоидных клетках, таких как моноциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты (Schwartz-Albiez et al., J. Immunol 1988; 140 (3): 905-914). CD37 широко экспрессируется на злокачественных клетках при различных В-клеточных лейкозах и лимфомах, включая неходжкинскую лимфому (НХЛ) и хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) (Moore et al. J Immunol. 1986; 137 (9): 3013).

Несколько нацеленных на CD37 агентов на основе антител оцениваются как потенциальные терапевтические средства против В-клеточных неоплазий и других злокачественных новообразований. К ним относятся, например, радиоиммуно-конъюгаты, такие как Беталутин®, конъюгаты антитело-лекарственное средство, такие как IMG529 и AGS-67E, и переформатированные или Fc-сконструированные антитела, такие как отлертузумаб и BI 836826 (Robak and Robak, Expert Opin Biol Ther. 2014; 14 (5): 651-61). Антитела против CD37 были предложены для использования в качестве терапевтических

агентов в форматах, описанных выше, и в других форматах (см., например, WO 2012/135740, WO 2012/007576, WO 2011/112978, WO 2009/126944, WO 2011/112978 и EP 2 241 577).

Беталутин - это мышье анти-CD37 антитело, лилотомаб (ранее НН1/ тетуломаб), конъюгированное с лютецием-177. Беталутин быстро интернализуется, ингибирует рост В-клеток *in vitro* и продлевает выживание при внутривенном введении на модели Daudi-SCID (Dahle et al 2013, *Anticancer Res* 33: 85-96).

IMGN529 представляет собой ADC (конъюкат антитела и лекарства), состоящий из антитела K7153A, конъюгированного с мейтансиноидом DM1 через линкер SMCC (сукцинимидил-транс-4-[maleimidometil]циклогексан-1-карбоксилат). Сообщается, что антитело K7153 индуцирует апоптоз CD37-экспрессирующих клеток Ramos при отсутствии перекрестного связывания. Он также индуцировал CDC (комплемент-зависимую цитотоксичность) и ADCC (антитело-зависимую цитотоксичность) в клеточных линиях лимфомы Беркитта, хотя способность индуцировать CDC была намного меньше по сравнению с ритуксимабом (Deckert et al., *Blood* 2013; 122 (20): 3500-10). Эти Fc-опосредованные эффекторные функции K7153A сохраняются в конъюгированном с DM-1 антителе.

Agensys разрабатывает AGS-67E, человеческое mAb против CD37 IgG2, конъюгированное с монометилауристатином E. AGS67E индуцирует сильную цитотоксичность и апоптоз (Pereira et al., *Mol Cancer Ther* 2015; 14 (7): 1650–1660).

Отлертузумаб (первоначально известный как TRU-016) представляет собой SMIP (иммуно-фармацевтический препарат на основе модульного белка малого размера; SMIPS - это дисульфид-связанные димеры одноцепочечных белков, состоящие из одного антигенсвязывающего VH/VL, соединительной шарнирной области и Fc (фрагментной, кристаллизуемой) области (CH2 – CH3)). Механизмы его действия - индукция апоптоза и ADCC, но не CDC (Zhao et al 2007, *Blood* 110 (7), 2569-2577).

mAb37.1/BI 836826 представляет собой химерное антитело, которое разработано для связывания с высоким сродством с FcγRIIIa (CD16a) (Heider et al 2011, *Blood* 118: 4159-4168). Оно обладает проапоптотической активностью, не зависящей от сшивки Fc IgG, хотя проапоптотическая активность увеличивается при сшивке. Оно демонстрирует мощную ADCC для CD37+ В-клеточных линий и первичных клеток ХЛЛ.

Несмотря на эти и другие достижения в данной области, все еще существует потребность в улучшенных анти-CD37-антителах для лечения рака и других заболеваний.

Соответственно, целью настоящего изобретения является обеспечение анти-CD37 антител, которые могут быть полезны при лечении рака и/или других заболеваний.

Задачей настоящего изобретения является создание анти-CD37 антител, которые улучшены в отношении CDC клеток человека компонентом человека, по сравнению с антителами предшествующего уровня техники. Еще одной целью является создание биспецифического антитела, имеющего связывающие звенья, полученные из двух исходных антител, которые связываются с различными эпитопами на CD37, и где биспецифическое антитело имеет повышенные CDC и/или ADCC по сравнению с комбинацией двух исходных моноклональных антител, связывающих указанные разные эпитопы, и/или с любым из исходных моноклональных антител. Еще одной целью является создание новых моноклональных антител, связывающих различные эпитопы на CD37, в частности, целью является обеспечение антител против CD37, связывающих новые эпитопы CD37. Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение новых моноклональных антител, связывающих различные эпитопы на CD37, которые могут служить исходными антителами для биспецифических антител по изобретению. Еще одной целью является создание биспецифических антител, которые связываются с двумя различными эпитопами на CD37, и где биспецифические антитела имеют улучшенное взаимодействие Fc-Fc при связывании с CD37 на плазматической мембране, по сравнению с биспецифическим антителом того же изотипа и имеющим идентичные связывающие звенья, как биспецифическое антитело по изобретению.

#### **Изложение сущности изобретения**

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что биспецифическое антитело, обладающее специфичностью связывания против двух разных эпитопов на CD37 и имеющее мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc при связывании с CD37 на плазматической мембране, более эффективно индуцирует CDC, чем комбинация двух антител против CD37, каждое из которых обладает специфичностью связывания с одним из двух разных эпитопов на CD37 и имеет одинаковую мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, или любое антитело, имеющее одинаковую мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, само по себе. Кроме того, биспецифическое антитело, обладающее специфичностью связывания с двумя различными эпитопами на CD37 и имеющее мутацию, усиливающую взаимодействия Fc-Fc, было более эффективным в индукции ADCC, чем комбинация двух антител против CD37, каждое из которых обладает специфичностью связывания в отношении одного из двух различных эпитопов на CD37, и имеющих одинаковую мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc.

Соответственно, изобретение относится к новым биспецифическим антителам, связывающимся с человеческим CD37, которые обладают предпочтительными свойствами

в отношении их антигенсвязывающих характеристик, их способности индуцировать CDC и ADCC, их взаимодействия Fc-Fc при связывании с мембраносвязанными мишенями, их цитотоксического эффекта в отношении CD37-экспрессирующих клеток, и другими свойствами, как описано в настоящей заявке.

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему первую и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с CD37 человека, имеющим последовательность SEQ ID NO: 62, и первую и вторую Fc область иммуноглобулина человека, где первая и вторая антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы на CD37, и где первая и вторая Fc области содержат одну или несколько аминокислотных мутаций, которые усиливают взаимодействие Fc-Fc между биспецифическими антителами при связывании с мембраносвязанным CD37, по сравнению с взаимодействием Fc-Fc между биспецифическими антителами, не имеющими указанной мутации (мутаций).

Таким образом, в одном аспекте обеспечивается биспецифическое антитело, содержащее первую и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с CD37 человека, имеющим последовательность SEQ ID NO: 62, и первую и вторую Fc-область иммуноглобулина человека, где первая и вторая антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы на CD37 и где первая и вторая Fc области содержат одну или несколько аминокислотных мутаций, которые усиливают взаимодействие Fc-Fc между биспецифическими антителами при связывании с мембраносвязанной мишенью, по сравнению с взаимодействием Fc-Fc между биспецифическими антителами, не имеющими указанной мутации (мутаций).

Во втором аспекте изобретение относится к анти-CD37 антителу, связывающемуся с тем же эпитопом на CD37 человека, что и антитело против CD37, содержащему:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005].

В третьем аспекте изобретение относится к анти-CD37 антителу, которое

связывается с человеческим CD37, которое включает:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 23, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 24, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 25, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR2: YAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 28; [016], или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR2: EAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7. [004]

В четвертом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или антитело по изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель.

В пятом аспекте изобретение относится к биспецифическому антителу, или антителу или композиции по изобретению для применения в качестве медикамента. В конкретных аспектах они предназначены для применения при лечении рака или аутоиммунного заболевания, или воспалительных заболеваний, и в частности, для применения при лечении В-клеточных неоплазий.

В других аспектах изобретение относится к способам лечения, комбинированным лечением, нуклеиновокислотным последовательностям, кодирующим антитела по изобретению, к векторам и клеткам-хозяевам, которые их экспрессируют, и к способам детекции присутствия или антигена CD37, или клеток, экспрессирующих антигены CD37 в образце или у субъекта.

#### **Краткое описание чертежей**

Фигура 1: CDC, опосредованный вариантами G28.1, на первичных опухолевых клетках ХЛЛ. Способность индуцировать CDC на первичных опухолевых клетках ХЛЛ (A) IgG1-G28.1-K409R-delK, IgG1-G28.1-E345R или IgG1-b12-E345R (клетки: полученные от пациента, со впервые поставленным диагнозом/без лечения (PB = полученные из периферической крови)) и (B) IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G или IgG1-b12 (клетки: полученные от пациента, со впервые поставленным диагнозом/без лечения (BM = полученные из костного мозга)) определяли *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии.

Фигура 2: Количественное определение уровней экспрессии CD37, CD46, CD55 и

CD59 на опухолевых клетках ХЛЛ. Уровни экспрессии CD37, CD46, CD55 и CD59 на клетках ХЛЛ от одного пациента (пациент VM-PB0005, со впервые поставленным диагнозом/без лечения) определяли проточной цитометрией. Количество антигена показано в виде молекул на клетку. mIgG1 представляет собой мышиный IgG1, к изотипический контроль.

Фигура 3: Связывание гуманизированных антител против CD37 и их вариантов с клетками Дауди. Связывание IgG1-004-H5L2, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2 и IgG1-016-H5L2-E430G с клетками Дауди определяли проточной цитометрией. Показанные данные представляют собой значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для одного репрезентативного эксперимента.

Фигура 4: Связывание G28.1 и 37.3 и их вариантов с клетками Дауди. Связывание IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-37.3 и IgG1-37.3-E430G с клетками Дауди определяли методом проточной цитометрии. Показанные данные представляют собой значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для одного репрезентативного эксперимента.

Фигура 5: Связывание вариантов гуманизированного CD37-антитела IgG1-016-H5L2 с клетками Дауди. Связывание IgG1-016-H5L2, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G и IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G с клетками Дауди определяли методом проточной цитометрии. Показанные данные представляют собой значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для одного репрезентативного эксперимента.

Фигура 6: Связывание вариантов антитела CD37 с клетками СНО, экспрессирующими CD37 макаки-крабоеда. Связывание IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-G28.1 и IgG1-G28.1-E430G определяли с помощью проточной цитометрии. Показанные данные представляют собой значения средней интенсивности флуоресценции (MFI) для одного репрезентативного эксперимента.

Фигура 7: Определение конкуренции связывания между CD37 антителами, и CDC, опосредованной гуманизированными CD37 антителами, их вариантами и комбинациями CD37 антител на клетках Raji. (A) Конкуренцию связывания между IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E434G определяли методом проточной цитометрии. Клетки Raji инкубировали с немечеными антителами для первичного связывания, а затем с антителами-зондами, мечеными Alexa Fluor 488. Потеря связывания A488-меченых

антител-зондов после предварительной инкубации с немеченым антителом по сравнению со связыванием только А488-меченого антитела указывает на конкуренцию связывания между А488-меченым и немеченым антителом. Показанные данные являются значениями от двойных испытаний молекул эквивалентного растворимого флуорохрома (MESF) для одного репрезентативного эксперимента. (B-G) Способность индуцировать CDC на клетках Raji IgG1-004-H5L2, IgG1-005-H1L2, IgG1-010-H5L2, IgG1-016-H5L2 и IgG1-37.3, с мутацией E430G или без нее, и комбинации этого были определены *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии.

Фигура 8: Схематический обзор конкуренции связывания между CD37 антителами. Конкуренцию связывания между IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G для Raji клеток определяли с помощью проточной цитометрии, используя немеченые антитела для первичного связывания и меченные Alexa Fluor 488 антитела-зонды для выявления последующего связывания конкурирующего антитела. Цветовая индикация: черный - одновременное связывание; белый – конкуренция связывания; серый - родственное антитело.

Фигура 9: CDC, опосредованная гуманизированными CD37 антителами и их вариантами на клетках Дауди. Способность индуцировать CDC на клетках Дауди IgG1-004-H5L2, IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2 и IgG1-016-H5L2-E430G определяли *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии.

Фигура 10: CDC, опосредованная G28.1 и 37.3 и их вариантами, и CDC в клетках Дауди, опосредованная гуманизированными CD37 антителами с различными мутациями, усиливающими взаимодействие Fc-Fc, на клетках Дауди. (A) Способность индуцировать CDC на клетках Дауди IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-37.3 и IgG1-37.3-E430G определяли *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии. (B-C) Способность индуцировать CDC на клетках Дауди (A) IgG1-010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E345R-K409R, IgG1-010-H5L2-E345K-K409R, IgG1-010-H5L2-K409R-E430S, IgG1-010-H5L2-RRGY и (B) IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G, IgG1-016-H5L2-E345K-F405L, IgG1-016-H5L2-F405L-E430S и 016-H5L2-E345R-F405L определяли *in vitro*. Показанные данные

представляют собой % лизиса (максимальный лизис при концентрации антител 10 мкг/мл), определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительных клеток) с помощью проточной цитометрии, для одного репрезентативного эксперимента. Планки погрешностей указывают на вариацию в эксперименте (выполняют в двух повторностях).

Фигура 11: CDC, опосредованная вариантами гуманизированного антитела IgG1-016-H5L2 на клетках Дауди. Способность индуцировать CDC на клетках Дауди IgG1-016-H5L2, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G и IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G была определена *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии.

Фигура 12: CDC, опосредованная биспецифическими антителами CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, CD37-антителами (комбинацией) с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и одновалентными антителами, связывающими CD37, с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, на клетках Дауди; и CDC активность вариантов антител CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и их комбинации на клетках OCI-Ly-7. (А) Способность индуцировать CDC на клетках Дауди bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, комбинации IgG1-005-H1L2-K409R-E430G плюс IgG1-016-H5L2-F405L-E430G, bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G, и (В) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, комбинации IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G была определена *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии. (С) Способность к индукции клеток OCI-Ly-7 биспецифического антитела CD37 bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, CD37 моноспецифических двухвалентных (моноклональных) антител IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, комбинации IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G, одновалентных CD37 антител bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G, bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и комбинации bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G плюс bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G оценивали *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения

процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии. (D) Значения EC50 индукции CDC с помощью bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G плюс bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G, как определено в 2 независимых экспериментах. (E) Значения EC50 индукции CDC с помощью bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G, определенные в 3 независимых экспериментах.

Фигура 13: CDC, опосредованная биспецифическими CD37 антителами и биспецифическими CD37 антителами с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc на клетках Дауди. Способность индуцировать CDC на клетках Дауди (A) bsIgG1-016-H5L2-F405Lx005-H1L2-K409R и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, и (B) bsIgG1-016-H5L2-F405Lx010-H5L2-K409R и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G определяли *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии.

Фигура 14: CDC, опосредованная биспецифическими CD37 антителами с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, CD37 антителами (комбинацией) с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и одновалентными связывающими CD37 антителами с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, на первичных ХЛЛ опухолевых клетках. Способность индуцировать CDC на первичных опухолевых клетках ХЛЛ (пациент: VM-VM0091, со впервые поставленным диагнозом/ без лечения (BM = полученные из костного мозга)) для (A) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G, комбинации IgG1-005-H1L2-K409R-E430G плюс IgG1-016-H5L2-F405L-E430G, bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G, и (B) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, комбинации IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G определяли *in vitro*. Показанные данные представляют собой % лизиса, определенный путем измерения процента мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии.

Фигура 15: CDC, опосредованная биспецифическим CD37 антителом с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, на клеточных линиях В-клеточной лимфомы. Способность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G при концентрации 10 мкг/мл индуцировать CDC в ряде линий клеток В-лимфомы определяли

*in vitro*. Уровни экспрессии CD37 определяли количественной проточной цитометрией, и они представлены в виде молекул на клетку, среднее значение  $\pm$  SD для 2 экспериментов. Белые столбцы указывают на восприимчивость к CDC (лизис  $>10\%$ , среднее значение по 2 экспериментам), опосредованный bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, черные столбцы указывают на невосприимчивость к CDC ( $<10\%$  лизис, среднее значение от 2 экспериментов), опосредованную bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

Фигура 16: ADCC, опосредованная биспецифическими CD37 антителами с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, CD37 антителами (комбинациями) с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и одновалентными связывающими CD37 антителами с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, на клетках Дауди и клетках Raji. Способность индуцировать ADCC (A) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-005-H1L2-K409R-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G и комбинации IgG1-005-H1L2-K409R-E430G плюс IgG1-016-H5L2-F405L-E430G на клетках Дауди, и (B) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G и комбинации IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G на клетках Дауди, и (C) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-E430G, комбинации IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G на клетках Raji определяли *in vitro* с использованием анализа высвобождения хрома. Показанные данные представляют собой % специфического лизиса; планки погрешностей указывают на вариации в анализе, с 5 повторностями (A, B) или 6 повторностями (C) на точку данных.

Фигура 17: Количественное определение уровней экспрессии CD37, CD46, CD55 и CD59 на опухолевых клетках (A) ХЛЛ, (B) ФЛ, (C) МКЛ или (D) ДКБКЛ. Уровни экспрессии на опухолевых клетках определяли проточной цитометрией. Количество антигена показано как способность связывания антител.

Фигура 18: CDC, опосредованная биспецифическим CD37 антителом с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, на первичных опухолевых клетках пациентов с ХЛЛ, ФЛ, МКЛ, ДКБКЛ или В-НХЛ (без дополнительной классификации). Способность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G индуцировать CDC на опухолевых клетках, полученных от пациентов с (A) ХЛЛ, (B) ФЛ и (C) МКЛ, ДКБКЛ или В-НХЛ (без дополнительной классификации) определяли проточной цитометрией. Индукция CDC представлена как процент лизиса, определяемый долей 7-AAD-положительных опухолевых клеток, с использованием 100 мкг/мл (A и B) или 10 мкг/мл

(C) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2 -K409R-E430G.

Фигура 19: Связывание биспецифического CD37 антитела с мутацией, усиливающей Fc-Fc взаимодействие, с В-клетками в крови человека или макаки-крабоеда. Связывание меченых Alexa-488 bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G с В-клетками в крови (А) человека или (В) макаки-крабоеда определяли методом проточной цитометрии. Меченный Alexa-488 IgG1-b12 использовали в качестве антитела отрицательного контроля. Данные представлены в виде средних геометрических значений интенсивности флуоресценции A488 для одного репрезентативного донора/ животного. Планки погрешностей показывают вариацию в эксперименте (измерения в двух повторностях).

Фигура 20: Цитотоксичность биспецифического CD37 антитела с мутацией, усиливающей Fc-Fc взаимодействие, и моноклонального CD37-специфического антитела с усиленным FcγR-взаимодействием, по отношению к В-клеткам крови человека или макаки-крабоеда. (А) Цитотоксичность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и IgG1-CD37-B2-S239D-I332E для В-клеток крови человека и (В) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G для В-клеток крови макаки-крабоеда определяли в анализе цитотоксичности в цельной крови. IgG1-b12 использовали в качестве отрицательного контрольного антитела. Данные представлены как % истощения В-клеток для одного репрезентативного донора/ животного. Планки погрешностей показывают изменения в эксперименте (измерения в двух повторностях).

Фигура 21: CDC, опосредованная биспецифическим CD37 антителом с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, CD20-специфическим антителом или их комбинацией. (А-Д) Способность индуцировать CDC на опухолевых клетках, полученных от 2 пациентов с ХЛЛ, для bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, офатумумаба или их комбинации, в указанных концентрациях определяли *ex vivo*. Данные представлены как % жизнеспособных В-клеток.

Фигура 22: Соотношение доза-эффект для трехнедельных доз bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G на модели JVM-3. (А) Опухолевый рост ксенотрансплантатов JVM-3 после лечения различными дозами bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G или антитела для контроля изотипа (IgG1-b12). Среднее значение и SEM каждой группы (n = 10) показаны для каждой временной точки. (В) Размер опухоли на мышь в день 25. Среднее значение и SEM указаны для каждой группы лечения. Различия были проанализированы с помощью теста Манна-Уитни. Статистически достоверные различия были указаны следующим образом: \*\* - p <0,01; \*\*\* - p <0,001.

Фигура 23: Соотношение доза-эффект для трехнедельных доз bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G на модели Daudi-luc. (A) Рост опухоли (измеренный по активности люциферазы, биолюминесценции) ксенотрансплантатов Daudi-luc после обработки различными дозами bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G или антитела контроля изотипа (IgG1-b12). Среднее значение и SEM каждой группы (n = 9) показаны для каждой временной точки. (B) Активность люциферазы на мышь на 36 день. Среднее значение и SEM указаны для группы лечения. Различия были проанализированы односторонним дисперсионным анализом, без поправки наименьшей значимой разности Фишера. Статистически достоверные различия были указаны следующим образом: \*\* - p < 0,01; \*\*\* - p < 0,001.

Фигура 24: Концентрации в плазме bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и IgG1-b12 после внутривенной инъекции мышам SCID. Мышам SCID вводили внутривенно одну дозу (A-B) 100 мкг (5 мг/кг) или (C-D) 500 мкг (25 мг/кг) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G или IgG1-b12.

Фигура 25. Анализ связывания CD37 антител с CD37 вариантами с аланиновыми мутациями во внеклеточных доменах. Z-оценку (кратное изменение) определяли как  $as$  (нормализованное  $gMFI[aa \text{ положение}]/\mu$ )/ $\sigma$ , где  $\mu$  и  $\sigma$  - среднее значение и стандартное отклонение (SD) нормализованного  $gMFI$  всех мутантов. Остатки, в которых значение z-оценки было ниже  $-1,5$  (указано пунктирной линией), считались «мутантами с потерей связывания». Цифры над x-осью относятся к аминокислотным положениям. Обратите внимание, что x-ось не является непрерывной: левая часть (до пунктирной линии) оси представляет собой остатки в небольшой внеклеточной петле человеческого CD37, которые не являются аланинами или цистеинами; правая часть оси представляет собой остатки в большой внеклеточной петле человеческого CD37, которые не являются аланинами или цистеинами. Пунктирная линия обозначает z-оценку (кратное изменение)  $-1,5$ .

Фигура 26 CDC, опосредованная смесями CD37 антител с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, плюс клинически установленных продуктов CD20 антител, на клетках Raji. CDC-опосредованный лизис клеток Raji (% лизиса, выраженный как PI-положительная клеточная фракция, как определено с помощью проточной цитометрии) для серий разведений концентрации антител 1:0, 3:1, 1:1, 3:1 и 0:1 смесей антител (конечная концентрация 10 мкг/мл) для CD37 антител с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, плюс стандартные продукты CD20 антител: MabThera (ритуксимаб), Arzerra (офатумумаб) и Gazyva (обинутузумаб, GA101): (A) смеси с IgG1-37.3-E430G; (B) смеси с IgG1-G28.1-E430G; (C) смеси с IgG1-004-E430G; (D) смеси с

IgG1-005-E430G; (E) смеси с IgG1-010-E430G и (F) смеси с IgG1-016-E430G.

## **Подробное описание изобретения**

### Определения

Используемый в настоящей заявке термин «CD37» относится к лейкоцитарному антигену CD37, также известному как GP52-40, тетраспанин-26 и TSPAN26, который представляет собой сильно гликозилированный трансмембранный белок с четырьмя трансмембранными доменами (TM) и одним маленьким и одним большим внеклеточным доменом. Белок Homo sapiens, то есть человеческий белок CD37, кодируется нуклеиновокислотной последовательностью, кодирующей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 62 (белок CD37 человека: UniProtKB/Swiss-Prot P11049). В этой аминокислотной последовательности остатки с 112 по 241 соответствуют большому внеклеточному домену, остатки с 39 по 59 - малому внеклеточному домену, тогда как остальные остатки соответствуют трансмембранным и цитоплазматическим доменам. Белок Macaca flavicularis, т.е. белок макаки-крабоода CD37 кодируется последовательностью нуклеиновых кислот, кодирующей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 63 (белок CD37 макаки-крабоода: инвентарный номер Genbank XP\_005589942). Если не противоречит контексту, термин «CD37» означает «человеческий CD37». Термин «CD37» включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD37, которые естественным образом экспрессируются клетками, включая опухолевые клетки, или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном или кДНК CD37.

Термин «человеческий CD20» или «CD20» относится к человеческому CD20 (UniProtKB/Swiss-Prot №P11836) и включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD20, которые естественным образом экспрессируются клетками, включая опухолевые клетки, или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном или кДНК CD20. К видовым гомологам относятся CD20 макаки-резус (Macaca mulatta; UniProtKB/Swiss-Prot №H9YXP1) и макаки-крабоода CD20 (Macaca flavicularis).

Термины «антитело, связывающее CD37», «анти-CD37 антитело», «CD37-связывающее антитело», «CD37-специфичное антитело», «CD37 антитело», которые могут использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо, относятся к любому антителу, связывающему эпитоп на внеклеточной части CD37.

Термин «антитело» (Ат) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или ее производному, которое обладает способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях со значительным периодом полужизни, таким как по меньшей

мере примерно 30 минут, по меньшей мере примерно 45 минут, по меньшей мере примерно один час, по меньшей мере примерно два часа, по меньшей мере примерно четыре часа, по меньшей мере примерно 8 часов, по меньшей мере примерно 12 часов, примерно 24 часа или более, примерно 48 часов или более, примерно 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т. д., или любой другой соответствующий функционально определенный период (такой как время, достаточное для индукции, стимуляции, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном и/или время, достаточное для того, чтобы антитело обеспечило эффекторную активность). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител (Ат) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классическом пути активации комплемента. Как указано выше, термин «антитело» в данном документе, если не указано иное, или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые являются антигенсвязывающими фрагментами, то есть сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, охватываемых термином «антитело», включают (i) фрагмент Fab' или Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, как описано в WO2007059782 (Genmab); (ii) F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит по существу из VH домена, и также называется доменным антителом (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21 (11): 484-90); (vi) камелидные или нанотела (Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5 (1): 111-24) и (vii) изолированный гипервариабельный участок (CDR). Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH кодируются отдельными генами, они могут быть объединены с использованием рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть образованными в виде единой белковой цепи, в которой VL и области VH спариваются с получением одновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охватываются термином антитело,

если не упомянуто иное или четко не указано в контексте. Хотя такие фрагменты, как правило, включены в значение антитела, они в совокупности и каждый независимо представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрирующие различные биологические свойства и полезность. Эти и другие полезные фрагменты антител в контексте настоящего изобретения, а также биспецифические форматы таких фрагментов обсуждаются здесь далее. Для биспецифических антител по изобретению такие фрагменты связаны с доменом Fc. Также следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (мАт), антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и фрагменты антител, сохраняющие способность специфически связываться с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), обеспечиваемые любым известным способом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы. Полученное антитело может обладать любым изотипом.

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, обладающему специфичностью по меньшей мере для двух разных, обычно неперекрывающихся, эпитопов. Такие эпитопы могут быть на одной или разных мишенях. Для настоящего изобретения эпитопы находятся на одной и той же мишени, а именно CD37. Примеры различных классов биспецифических антител, содержащих область Fc, включают асимметричные биспецифические молекулы, например, IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3; и симметричные биспецифические молекулы, например рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, где каждая антигенсвязывающая область молекулы связывает по меньшей мере два разных эпитопа; но не ограничиваются ими.

Примеры биспецифических молекул включают Triomab® (Trion Pharma/ Fresenius Biotech, WO/2002/020039), Knobs-in-Holes (Genentech, WO1998/50431), CrossMAbs (Roche, WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253), электростатически подобранные Fc-гетеродимерные молекулы (Amgen, EP1870459 и WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO 2010/129304), LUZ-Y (Genentech), DIG-тело, PIG-тело и TIG-тело (Pharmabsine), сконструированное обменом цепей доменное тело (SEED-тело) (EMD Serono, WO2007110205), биспецифические IgG1 и IgG2 (Pfizer/ Rinat, WO 2011/143545), Azymetric каркас (Zymeworks/ Merck, WO2012058768), mAb-Fv (Xencor, WO 2011/028952), XmAb (Xencor), двухвалентные биспецифические антитела (Roche, WO 2009/080254), биспецифические IgG (Eli Lilly), молекулы DuoBody® (Genmab A/S, WO 2011/131746), DuetMab (Medimmune, US2014/0348839), Biclomics (Merus, WO

2013/157953), NovImmune (κλBodies, WO 2012/023053), FcΔAdp (Regeneron, WO 2010/151792), (DT)-Ig (GSK/ Domantis), антитела два-в-одном или Fabs двойного действия (Genentech, AdimAt), mAb2 (F-Star, WO 2008/003116), молекулы Zybody™ (Zyngenia), CovX-body (CovX/ Pfizer), FynomAbs (Covagen/Janssen Cilag), DutaMab (Dutalys/ Roche), iMab (MedImmune), двойной вариабельный домен (DVD)-Ig™ (Abbott), двухдоменные антитела с двойной головкой (Unilever; Sanofi Aventis, WO 2010/0226923), Ts2Ab (MedImmune/AZ), BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec, US7,951,918), scFv-гибриды (Genentech/ Roche, Novartis, Immunomedics, Changzhou Adam Biotech Inc, 10226, CN), TvAb (Roche, WO2012/025525, WO2012/025530), ScFv/Fc гибриды, SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/ BMS), Interceptor (Emergent), переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART™) (MacroGenics, WO2008/157379, WO2010/080538), BEAT (Glenmark), Di-Diobody (IMKJone/Eli Lilly) и химически сшитые mAb (онкологический центр Karmanos), а также ковалентно слитые mAb (AIMM Therapeutics), но не ограничиваются ими.

Термин «полноразмерное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу (например, исходному или вариантному антителу), которое содержит все константные и вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, соответствующие тем, которые обычно обнаруживаются в антителе дикого типа этого класса или изоформа.

Используемый в настоящей заявке термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором вариабельная область получена из нечеловеческого вида (например, получена от грызунов), а константная область получена из другого вида, такого как человек. Химерные антитела могут быть получены с помощью инженерии антител. «Инженерия антител» - это термин, используемый для обозначения различных видов модификаций антител, который хорошо известен специалисту в данной области техники. В частности, химерное антитело может быть получено с использованием стандартных методик ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Таким образом, химерное антитело может быть генетически или ферментативно сконструированным рекомбинантным антителом. Специалисту в данной области техники известно, как создать химерное антитело, и таким образом, получение химерного антитела в соответствии с настоящим изобретением может быть выполнено другими способами, чем описано в настоящем документе. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разработаны для снижения иммуногенности антител. Они обычно могут содержать нечеловеческие (например, мышьиные) вариабельные области, которые специфичны для интересующего антигена, и домены тяжелой и легкой цепей константной области

антитела человека. Термины «вариабельная область» или «вариабельные домены», используемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина.

Термин «олигомер», используемый в данном документе, относится к молекуле, которая состоит из более чем одного, но ограниченного числа мономерных звеньев (например, антител), в отличие от полимера, который, по меньшей мере в принципе, состоит из неограниченного количества мономеров. Типичными олигомерами являются димеры, тримеры, тетрамеры, пентамеры и гексамеры. Аналогично, «олигомеризация», такая как, например, «гексамеризация», как используется в настоящей заявке, означает, что происходит увеличение распределения антител и/или других димерных белков, содержащих области связывания мишени, согласно изобретению, в олигомеры, такие как гексамеры. Повышенное образование олигомеров, таких как гексамеры, обусловлено повышенным взаимодействием Fc-Fc после связывания с мембраносвязанными мишенями.

Используемый в настоящей заявке термин «антигенсвязывающая область», «антиген-связывающая область», «связывающая область» или антигенсвязывающий домен относится к области антитела, которая способна связываться с антигеном. Эта область связывания обычно определяется доменами VH и VL антитела, которые могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Антиген может быть любой молекулой, такой как полипептид, например, присутствующий на клетке, бактерии или вирусе, или в растворе. Термины «антиген» и «мишень» могут, если это не противоречит контексту, использоваться взаимозаменяемо в контексте настоящего изобретения.

Используемый в настоящей заявке термин «мишень» относится к молекуле, с которой связывается антигенсвязывающая область антитела. Мишень включает любой антиген, на который направлено созданное антитело. Термины «антиген» и «мишень» могут относиться к антителу взаимозаменяемо и представлять собой одно и то же значение и цель в отношении любого аспекта или варианта осуществления настоящего изобретения.

Используемый в настоящей заявке термин «гуманизованное антитело» относится к генно-инженерному антителу, не являющемуся антителом человека, которое содержит

константные домены человеческого антитела и переменные домены нечеловеческого происхождения, модифицированные так, чтобы они содержали высокий уровень гомологии последовательности с переменными доменами человека. Это может быть достигнуто путем прививки шести гиперпеременных областей (CDR) антител, не являющихся антителами человека, которые вместе образуют участок связывания антигена, на гомологичную акцепторную каркасную область человека (FR) (см. WO92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного антитела, может потребоваться замена каркасных остатков из исходного антитела (т.е. антитела, не являющегося человеческим) в каркасных областях человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизованное антитело может содержать не-человеческие последовательности CDR, первоначально человеческие каркасные области, при необходимости содержащие одну или несколько аминокислотных обратных мутаций в не-человеческую аминокислотную последовательность, и полностью человеческие константные области. При необходимости, дополнительные аминокислотные модификации, которые необязательно являются обратными мутациями, могут применяться для получения гуманизованного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

Гуманизованные антитела могут быть получены с использованием иммунизированных кроликов, гуманизации кроличьих антител с использованием технологии гуманизации зародышевой линии (CDR-прививки) и, при необходимости, путем обратной мутации остатков, которые могут быть критическими для свойств связывания антител, как выявлено при структурном моделировании для остатков кролика. Может быть применен скрининг потенциальных T-клеточных эпитопов.

Используемый в настоящей заявке термин «человеческое антитело» относится к антителам, имеющим переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако термин «человеческое антитело», как используется в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на каркасные последовательности человека. Человеческие моноклональные

антитела по изобретению могут быть получены различными способами, включая обычную методологию моноклональных антител, например, стандартную методику гибридизации соматических клеток Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Хотя процедуры гибридизации соматических клеток являются предпочтительными, в принципе, могут быть использованы другие способы получения моноклональных антител, например, вирусная или онкогенная трансформация В-лимфоцитов или методики фагового дисплея с использованием библиотек генов антител человека.

Подходящей животной системой для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, является мышьяная система. Производство гибридомы у мыши является очень хорошо отработанной процедурой. Протоколы и методы иммунизации для выделения иммунизированных спленоцитов для гибридизации известны в данной области техники. Партнеры гибридизации (например, мышьяные миеломные клетки) и процедуры гибридизации также известны.

Человеческие моноклональные антитела могут быть получены с использованием, например, трансгенных или трансхромосомных мышей или кроликов, несущих части иммунной системы человека, а не мышьяной или кроличьей системы.

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей с низкой молекулярной массой и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов была хорошо охарактеризована. См., например, «Fundamental Immunology», Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь обычно состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной здесь как  $V_H$  или  $VH$ ) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначенной здесь как  $C_H$  или  $CH$ ). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов,  $CH1$ ,  $CH2$  и  $CH3$ . Каждая легкая цепь обычно состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как  $V_L$  или  $VL$ ) и константной области легкой цепи (сокращенно обозначенной здесь как  $C_L$  или  $CL$ ). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена,  $CL$ . Области  $VH$  и  $VL$  могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, каркасными областями (FR). Каждая  $VH$  и  $VL$  обычно состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2,

CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. Также Chothia и Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Если иное не указано или не противоречит контексту, последовательности CDR в данном документе идентифицируются в соответствии с правилами IMGT (Brochet X., Nucl Acids Res. 2008; 36: W503-508 и Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999; 27: 209-212; см. также интернет - [http адрес http://www.imgt.org/](http://www.imgt.org/)). Если иное не указано или не противоречит контексту, ссылка на аминокислотные положения в константных областях в настоящем изобретении соответствует нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci US A. 1969 May; 63 (1): 78-85; Kabat et al., «Sequences of Proteins of Immunological Interest», Fifth Edition. 1991 NIH Publication No. 91-3242).

При использовании в настоящем документе, если не противоречит контексту, термин «Fab-плечо» или «плечо» относится к одной паре тяжелая цепь-легкая цепь и используется здесь взаимозаменяемо с «половинными молекулами». Соответственно, «Fab-плечо» включает переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, а также константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи, которая включает область CH1, шарнир, область CH2 и область CH3 иммуноглобулина. «Область CH1» относится, например, к области человеческого антитела IgG1, соответствующей аминокислотам 118-215 согласно нумерации EU. Таким образом, фрагмент Fab содержит область связывания иммуноглобулина.

Термины «область кристаллизации фрагмента», «Fc область», «Fc фрагмент» или «Fc домен», которые могут использоваться здесь взаимозаменяемо, относятся к области антитела, содержащей, при расположении от аминоконца до карбоксиконца, по меньшей мере шарнирную область, домен CH2 и домен CH3. Fc область антитела IgG1 может, например, быть получена путем расщепления антитела IgG1 папаином. Fc область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент в классическом пути активации комплемента. Используемый в настоящей заявке термин «шарнирная область» предназначен для обозначения шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216-230 согласно нумерации EU.

Используемый в настоящей заявке термин «центральный шарнир» или «центральная шарнирная область» относится к четырем аминокислотам, соответствующим положениям 226-229 человеческого IgG1 антитела.

Используемый в настоящей заявке термин «область CH2» или «домен CH2» предназначен для обозначения области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так,

например, область СН2 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231-340 согласно нумерации EU. Однако область СН2 также может быть любым из других изомеров или аллотипов, как описано в настоящей заявке.

Используемый в настоящей заявке термин «область СН3» или «домен СН3» предназначен для обозначения области СН3 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область СН3 человеческого IgG1 антитела соответствует аминокислотам 341-447 согласно нумерации EU. Однако область СН3 также может быть любым из других изомеров или аллотипов, как описано в настоящей заявке.

Используемый в настоящей заявке термин «изомер» относится к классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Термин «одновалентное антитело» означает в контексте настоящего изобретения, что молекула антитела способна связывать одну молекулу антигена и, следовательно, не способна к сшиванию антигена.

«CD37 антитело» или «анти-CD37 антитело» представляет собой антитело, как описано выше, которое специфически связывается с антигеном CD37.

«CD37xCD37 антитело» или «анти-CD37xCD37 антитело» представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит две разные антигенсвязывающие области, одна из которых специфически связывается с первым эпитопом на антигене CD37, а вторая специфически связывается с другим эпитопом на CD37.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело по изобретению является изолированным. «Изолированное биспецифическое антитело», как используется в данном документе, предназначено для обозначения биспецифического антитела, которое по существу не содержит других антител, обладающих различной антигенной специфичностью (например, изолированное биспецифическое антитело, которое специфически связывается с CD37, по существу не содержит моноспецифических антител, которые специфически связываются с CD37).

Термин «эпитоп» означает белковую детерминанту, способную связываться с антигенсвязывающей областью антитела («паратопом»). Эпитопы обычно состоят из поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или сахара, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что связывание с первым, но не с последним, теряется в присутствии денатурирующих растворителей. Методы картирования эпитопов могут определять «структурные эпитопы» или «функциональные эпитопы». Структурные эпитопы

определяются как те остатки в структуре, которые находятся в прямом контакте с антителом и могут, например, оцениваться методами, основанными на структуре, такими как рентгеновская кристаллография. Структурный эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании антитела, а также другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокированы или покрыты антителом (другими словами аминокислотный остаток находится в зоне действия антитела). Функциональный эпитоп определяется как те остатки, которые вносят энергетический вклад в взаимодействие, связывающее антиген-антитело, и могут быть, например, оценены с помощью сайт-направленного мутагенеза, такого как аланиновое сканирование (Cunningham, BC, & Wells, JA (1993) *Journal of Molecular Biology*; Clackson, T. & Wells, J. (1995) *Science*, 267 (5196), 383–386). Функциональный эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании антитела, а также другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, такие как аминокислотные остатки, которые вызывают конформационные изменения в расположении остатков, вовлеченных в прямые взаимодействия (Greenspan, N. S., & Di Cera, E. (1999) *Nature Biotechnology*, 17(10), 936–937). В случае взаимодействий антитело-антиген функциональный эпитоп может использоваться для различения молекул антител друг от друга. Функциональный эпитоп может быть определен с использованием метода аланинового сканирования, как описано в Примере 17. Таким образом, аминокислоты в белке могут быть замещены аланинами, в результате чего образуется ряд мутантных белков, где связывание антигенсвязывающей области антитела с мутантным белком снижается по сравнению с белком дикого типа; уменьшенное связывание определяют как стандартизированное  $\log$  (кратное изменение) (выраженное в виде z-оценок), при этом связывание указанного антитела составляет менее чем 1,5, как указано в примере 17.

Используемый в данной заявке термин «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антитела по существу с одним молекулярным составом. Композиция моноклонального антитела проявляет единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, обладающим единственной специфичностью связывания, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие моноклональные антитела могут генерироваться гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного или трансхромосомного животного, не

являющегося человеком, такого как трансгенная мышь, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

Используемый в настоящей заявке термин «связывание» в контексте связывания антитела с заранее определенным антигеном обычно представляет собой связывание с аффинностью, соответствующей  $K_D$ , равной примерно  $10^{-6}$  М или менее, например,  $10^{-7}$  М или менее, например, около  $10^{-8}$  М или менее, например, около  $10^{-9}$  М или менее, около  $10^{-10}$  М или менее, или около  $10^{-11}$  М или даже менее, если это определено, например, с помощью технологии BioLayer Interferometry (BLI) на приборе Octet HTX с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве анализируемого вещества, и где антитело связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, соответствующей  $K_D$ , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином), отличным от предварительно определенного антигена или близко родственного антигена. Степень, в которой  $K_D$  связывания ниже, зависит от  $K_D$  антитела, так что когда  $K_D$  антитела очень низка, то степень, в которой  $K_D$  связывания с антигеном ниже, чем  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном, может составлять по меньшей мере 10000 раз (то есть антитело является высокоспецифичным).

Термин « $K_D$ » (М), используемый в данном документе, относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген.

«Аффинность», как используется в данном документе, и « $K_D$ » имеют обратную связь, то есть более высокая аффинность обозначает более низкую  $K_D$ , а более низкая аффинность означает более высокую  $K_D$ .

Как используется в настоящем документе, антитело, которое «конкурирует» или «перекрестно конкурирует», используется взаимозаменяемо с антителом, которое «блокирует» или «перекрестно блокирует» другое антитело, то есть эталонное антитело, и означает, что антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с человеческим CD37, например, как определено в анализе, описанном в Примере 7 данного документа. В одном варианте осуществления антитело проявляет связывание менее чем 50%, такое как менее чем 20%, такое как менее чем 15% от его максимального связывания в присутствии конкурирующего эталонного антитела.

Как используется в данном документе, антитело, которое «не конкурирует» или «не конкурирует перекрестно» или «не блокирует» с другим антителом, т.е. эталонным

антителом, означает, что антитело и эталонное антитело не конкурируют за связывание с человеческим CD37, например, как определено в анализе, описанном в Примере 7 данного документа. Для некоторых пар антитела и эталонного антитела отсутствие конкуренции в анализе из Примера 7 наблюдается только тогда, когда одно антитело связано с антигеном в клетке, а другое используется для конкуренции, а не наоборот. Термин «не конкурирует» или «неконкурентный» или «неблокирующий» при использовании в настоящем документе также предназначен для охвата таких комбинаций антител. В одном варианте осуществления антитело проявляет связывание по меньшей мере 75%, такое как по меньшей мере 80%, такое как по меньшей мере 85% от его максимального связывания в присутствии эталонного антитела.

Используемый в настоящей заявке термин «мутация, усиливающая взаимодействие Fc-Fc» относится к мутации в IgG антителах, которая усиливает взаимодействия Fc-Fc между соседними антителами IgG, которые связаны с мишенью на клеточной поверхности. Это может привести к усилению образования олигомеров, такому как, например, гексамеризация антител, связанных с мишенью, в то время как молекулы антител остаются мономерными в растворе, как описано в WO 2013/004842; WO 2014/108198, которые тем самым включены посредством ссылки.

Используемый в настоящей заявке термин «эффektorные Fc функции» или «Fc-опосредованные эффektorные функции» предназначен для обозначения функций, которые являются следствием связывания полипептида или антитела с его мишенью, такой как антиген, на клеточной мембране, и последующего взаимодействия Fc-домена IgG с молекулами врожденной иммунной системы (например, растворимыми молекулами или мембраносвязанными молекулами). Примеры эффektorных функций Fc включают (i) C1q-связывание, (ii) активацию комплемента, (iii) комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), (iv) антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), (v) связывание с Fc-гамма рецептором, (vi) антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), (vii) комплемент-зависимую клеточную цитотоксичность (CDCC), (viii) усиленную комплементом цитотоксичность, (ix) связывание с рецептором комплемента опсонизированного антитела, опосредуемое антителом, (x) опсонизацию и (xi) комбинацию любого из (i) - (x).

При использовании в настоящем документе термин «гетеродимерное взаимодействие между первой и второй областями CH3» относится к взаимодействию между первой областью CH3 первой Fc-области и второй областью CH3 второй Fc-области в первом-CH3/ втором-CH3 гетеродимерном белке. Биспецифическое антитело является примером гетеродимерного белка.

При использовании в настоящем документе термин «гомодимерные взаимодействия первой и второй областей СНЗ» относится к взаимодействию между первой областью СНЗ и другой первой областью СНЗ в гомодимерном белке первый-СНЗ/первый-СНЗ и взаимодействию между второй областью СНЗ и другой второй областью СНЗ в гомодимерном белке второй-СНЗ/второй-СНЗ. Моноклональное антитело является примером гомодимерного белка.

Термин «восстанавливающие условия» или «восстанавливающая среда» относится к состоянию или среде, в которой субстрат, такой как, например, остаток цистеина в шарнирной области антитела, с большей вероятностью станет восстановленным, чем окисленным.

Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антителам, содержащим функциональные варианты VL областей, VH областей, или одной или нескольких CDR из биспецифических антител из примеров. Функциональный вариант VL, VH или CDR, используемый в контексте биспецифического антитела, по-прежнему позволяет каждой ветви биспецифического антитела сохранять по меньшей мере значительную долю (по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности и/или специфичности/селективности исходного биспецифического антитела, и в некоторых случаях такое биспецифическое антитело может быть связано с большей аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем исходное биспецифическое антитело. Такие функциональные варианты обычно сохраняют значительную идентичность последовательности с исходным биспецифическим антителом. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных позиций, совместно используемых последовательностями (то есть, % гомологии = количество идентичных позиций/ общее количество позиций x 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может, например, быть определен с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весовых остатков PAM120, штраф за продолжение гэпа 12 и штраф за открытие гэпа 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Типичные варианты включают те варианты, которые отличаются от VH областей и/или VL и/или CDR последовательностей исходного биспецифического антитела в

основном консервативными заменами; например, 10, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замена в варианте, являются консервативными заменами аминокислотных остатков. Предпочтительно, вариант содержит не более 10 аминокислотных замен в области VH и/или VL исходного антитела, например, не более 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или не более 1 аминокислотной замены. Предпочтительно такие замены представляют собой консервативные замены, особенно если замены находятся в последовательности CDR.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут быть определены заменами в пределах классов аминокислот, отраженных в следующей таблице:

*Классы аминокислотных остатков для консервативных замен*

Кислые остатки	Asp (D) и Glu, (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R) и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N) и Gln. (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M) и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y) и Trp (W)

В контексте настоящего изобретения следующие обозначения, если не указано иное, используются для описания мутации: (i) замена аминокислоты в данном положении регистрируется, например, как K409R, что означает замену лизина в положении 409 на аргинин; и (ii) для конкретных вариантов используются конкретные трех- или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина аргинином в положении 409 обозначена как K409R, а замена лизина любым аминокислотным остатком в положении 409 обозначена как K409X. В случае делеции лизина в положении 409 это обозначено как K409\*.

Используемый в настоящей заявке термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») предназначен для обозначения клетки, в которую был введен вектор экспрессии, например, вектор экспрессии, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, CHO-S, HEK, HEK293, HEK-293F, Expi293F, PER.C6 или NS0, и лимфоцитарные клетки.

Термин «лечение» относится к введению эффективного количества терапевтически активного биспецифического антитела по настоящему изобретению с целью ослабления, облегчения, прекращения или устранения (излечения) симптомов или патологических состояний.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени,

необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество биспецифического антитела может меняться в зависимости от таких факторов, как патологическое состояние, возраст, пол и масса тела индивидуума, и способность биспецифического антитела вызывать необходимый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела выражены в меньшей степени, чем терапевтически полезные эффекты.

Термин «антиидиотипическое антитело» относится к антителу, которое распознает уникальные детерминанты, обычно связанные с антигенсвязывающим участком антитела.

### **Варианты осуществления изобретения**

В первом основном варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему первую и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с CD37 человека, имеющим последовательность SEQ ID NO: 62, и первую и вторую Fc область иммуноглобулина человека, где первая и вторая антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы на CD37, и где первая и вторая Fc области содержат одну или несколько аминокислотных мутаций, которые усиливают взаимодействие Fc-Fc между биспецифическими антителами при связывании с мембраносвязанными мишенями по сравнению с Fc-Fc взаимодействием между биспецифическими антителами, не имеющими указанных мутаций. Таким образом, обеспечивается биспецифическое анти-CD37 антитело, которое связывает два разных эпитопа на CD37. Предпочтительно два эпитопа таковы, что оба связывающих плеча могут связывать один и тот же белок и таким образом, что каждое связывающее плечо не блокирует связывание другого плеча и/или не конкурирует за связывание с другим связывающим плечом биспецифической молекулы. Кроме того, биспецифическое антитело содержит мутацию, которая усиливает взаимодействие Fc-Fc между двумя или несколькими биспецифическими антителами по изобретению. Это приводит к тому, что биспецифические молекулы образуют олигомеры при связывании с CD37, экспрессируемым на плазматической мембране клетки-мишени. Взаимодействие Fc-Fc усиливается по сравнению с молекулой, которая идентична, за исключением мутации. Предпочтительно мутация находится в Fc области биспецифической молекулы. В одном варианте осуществления это является одной аминокислотной заменой в Fc области биспецифической молекулы. Предпочтительно это является симметричной заменой, что означает, что обе половинные молекулы (исходные антитела) имеют мутацию. Еще одним преимуществом настоящего биспецифического антитела является то, что оно обладает улучшенными эффекторными функциями CDC и/или ADCC по сравнению с идентичной

биспецифической молекулой, не имеющей мутации, усиливающей взаимодействие Fc-Fc. Удивительно, что биспецифическая молекула также имеет улучшенные CDC и/или ADCC по сравнению с комбинацией двух исходных моноклональных антител против CD37, которые имеют мутации для усиления Fc-Fc взаимодействий, и с улучшенными CDC и/или ADCC по сравнению с любым исходным моноклональным анти-CD37 антителом, которое имеет мутации, чтобы усиливать Fc-Fc взаимодействия как таковые. Таким образом, биспецифическое антитело по изобретению более эффективно индуцирует CDC и/или ADCC, чем комбинация антитела, имеющего первую антигенсвязывающую область, и второго антитела, имеющего вторую антигенсвязывающую область, и где оба антитела содержат мутацию, усиливающую Fc-Fc взаимодействие, или по сравнению с единичными моноклональными анти-CD37-антителами, имеющими первую или вторую антигенсвязывающие области и содержащими мутацию, усиливающую Fc-Fc взаимодействие.

В одном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела получена из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с CD37-антителом, содержащим последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20,

VL CDR2 последовательность KAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. [010]

Предпочтительно конкуренцию за связывание определяют согласно примеру 7.

В другом варианте осуществления первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и CD37 антитело, содержащее последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20,

VL CDR2 последовательность KAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. [010]

В дополнительном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20,  
VL CDR2 последовательность KAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. [010]

В следующем варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела по изобретению содержит VH и VL последовательности:

(i) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или

(ii) VH последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностями из SEQ ID NO: 15 и 19.

В дополнительном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела получена из антитела, которое конкурирует за связывание с CD37 человека антителом CD37, содержащим последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13,  
VL CDR2 последовательность: AAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. [005]

В дополнительном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и CD37 антитело, содержащее последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13,  
VL CDR2 последовательность: AAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. [005]

В одном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела имеет функциональный эпитоп, включающий одну или несколько аминокислот Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 и P199 SEQ ID NO: 62 (CD37).

В одном варианте осуществления изобретения указанная первая антигенсвязывающая область связывается с функциональным эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 и P199 SEQ ID NO: : 62 (CD37).

В одном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с функциональным эпитопом на CD37, где связывание с мутантным CD37, в котором любой один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 и P199 SEQ ID NO: 62 (CD37) замещен (замещены) аланинами, уменьшено по сравнению со связыванием с CD37 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62; уменьшенное связывание определяют по z-оценке (кратному изменению), когда связывание указанного антитела ниже, чем -1,5, где z-оценку (кратное изменение) в связывании рассчитывают, как изложено в Примере 17.

В дополнительном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13,

VL CDR2 последовательность: AAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. [005]

В дополнительном варианте осуществления изобретения первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела включает последовательности VH и VL:

(i) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, или

(ii) VH последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность,

такую как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностями SEQ ID NO: 8 и 12.

В следующем варианте осуществления изобретения вторую антигенсвязывающую область биспецифического антитела получают из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с антителом CD37, содержащим последовательности CDR, выбранные из группы, включающей:

- (i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,  
VL CDR2 последовательность: YAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]
- (ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,  
VL CDR2: EAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]
- (iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,  
VL CDR2: FAK, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и
- (iv) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,  
VL CDR2 последовательность: VAT и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3]

В следующем варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела получена из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с CD37-антителом, содержащим CDR

последовательности, выбранные из группы, включающей:

(i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,  
 VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,  
 VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,  
 VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,  
 VL CDR2: YAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]

(ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,  
 VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,  
 VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,  
 VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,  
 VL CDR2: EAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]

(iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,  
 VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,  
 VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,  
 VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,  
 VL CDR2: FAK, и

VL CDR3, последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и

(iv) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,  
 VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,  
 VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,  
 VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,  
 VL CDR2 последовательность: VAT и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3]

Таким образом, получают биспецифические антитела, в которых первая и вторая антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы на CD37 человека. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что антитела, имеющие CDR последовательности антитела 005 (SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 13, 13а, 14) и антитела 010 (SEQ ID NO 16, 17, 18 и 20, 20а, 21) конкурируют за связывание человеческого CD37, и не конкурируют за связывание человеческого CD37 ни с одним из антител, имеющих CDR последовательности антител 016 (SEQ ID NO: №23, 24, 25 и 27, 27а, 28), 004 (SEQ ID NO 2, 3, 4 и 6, 6а, 7), G28.1 (SEQ ID NO: №40, 41, 42 и 44, 44а, 45) и 37.3 (SEQ ID NO: №47, 48, 49 и 51, 51а, 52). Однако было обнаружено, что антитела 016, 004, G28.1 и 37.3 конкурируют друг с другом за связывание человеческого CD37. Таким образом,

биспецифическое антитело, содержащее первое связывающее плечо, которое получено из антитела, конкурирующего за связывание с одним или обоими антителами 005 или 010, и второе связывающее плечо, которое получено из антитела, которое конкурирует за связывание с любым из 016, 004, G28.1 и 37.3 или со всеми из них, представляет собой биспецифическое антитело, которое обладает специфичностью к двум различным эпитопам на CD37. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что такие биспецифические антитела обладают усиленной активностью CDC в отношении клеток, экспрессирующих CD37, по сравнению с обработкой таких клеток комбинацией двух моноклональных антител, которые не конкурируют за связывание CD37. Кроме того, авторы изобретения неожиданно обнаружили, что такие биспецифические антитела обладают усиленной активностью ADCC в отношении клеток, экспрессирующих CD37, по сравнению с обработкой таких клеток комбинацией двух моноклональных антител, которые не конкурируют за связывание CD37.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим последовательности CDR антитела 010, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности 016.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 010, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности 004.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 010, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности G28.1.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 010, и вторую связывающую область, которая получена из

антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности 37.3.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 005, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности 016.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 005, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание с человеческим CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности 004.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 005, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности G28.1.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит первую антигенсвязывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности антитела 005, и вторую связывающую область, которая получена из антитела, конкурирующего за связывание человеческого CD37 с антителом, имеющим CDR последовательности 37.3.

Такие биспецифические антитела, описанные в настоящей заявке, могут в других вариантах осуществления содержать замену, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, в обеих Fc областях (т.е. Fc областях, полученных из первого и второго исходного антитела) биспецифического антитела, где замена соответствует E430G в IgG1 при использовании EU нумерации, и где замена усиливает взаимодействие Fc-Fc двух или более биспецифических антител по изобретению при связывании с мембраносвязанной мишенью. В другом варианте осуществления замена, усиливающая взаимодействие Fc-Fc, соответствует E345K в IgG1 при использовании нумерации EU.

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело

содержит вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и CD37-антитело, содержащее CDR последовательности, выбранные из группы, включающей:

- (i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,  
VL CDR2 последовательность: YAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]
- (ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,  
VL CDR2 последовательность: EAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]
- (iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,  
VL CDR2 последовательность: FAK, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и
- iv) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,  
VL CDR2 последовательность: VAT, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3]

В другом варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело содержит вторую антигенсвязывающую область, которая связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и CD37 антитело, содержащее CDR последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- a) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 27,

- VL CDR2 последовательности: YAS, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 28; [016]
- b) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 3,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 6,  
VL CDR2 последовательности: EAS, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 7; [004]
- c) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 40,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 41,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 42,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 44,  
VL CDR2 последовательности: FAK, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и
- d) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 47,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 48,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 49,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 51,  
VL CDR2 последовательность: VAT и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 52. [37.3]

В одном варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела имеет функциональный эпитоп, включающий одну или несколько аминокислот E124, F162, Q163, V164, L165 и H175 SEQ ID NO: 62 (CD37).

В одном варианте осуществления изобретения указанная вторая антигенсвязывающая область связывается с функциональным эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из E124, F162, Q163, V164, L165 и H175 SEQ ID NO: 62 (CD37).

В одном варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с функциональным эпитопом на CD37, в котором связывание с мутантным CD37, в котором любой один или несколько аминокислотных остатков в положениях, соответствующих положениям E124, F162, Q163 V164, L165 и H175 SEQ ID NO: 62 (CD37), замещены аланинами, уменьшено по сравнению с CD37 дикого типа, имеющим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62; уменьшенное связывание определяют как z-оценку (кратное изменение), где связывание указанного антитела ниже -1,5, где z-оценка (кратное изменение) в связывании



CDR последовательности антитела 016.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37-антитело, содержащее CDR последовательности антитела 005 и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37-антитело, содержащее CDR последовательности антитела 004.

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37-антитело, содержащее CDR последовательности антитела 005, и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37-антитело, содержащее CDR последовательности антитела G28.1.

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37-антитело, содержащее CDR последовательности антитела 005, и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37-антитело, содержащее CDR последовательности антитела 37.3.

В дополнительном варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности, выбранные из группы, включающей:

- (i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,  
VL CDR2 последовательность: YAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]
- (ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,

VL CDR2 последовательность: EAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]

(iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,

VL CDR2: FAK, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и

(v) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,

VL CDR2 последовательность: VAT и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3]

В дополнительном варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(i) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 23,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 24,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 25,

VL CDR1 последо

вательности, указанной в SEQ ID NO: 27,

VL CDR2 последовательности: YAS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 28; [016]

(ii) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 2,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 3,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 4,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 6,

VL CDR2 последовательности: EAS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 7; [004]

(iii) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 40,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 41,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 42,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 44,

VL CDR2 последовательности: FAK, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и

(vi) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 47,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 48,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 49,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 51,

VL CDR2 последовательности: VAT и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 52. [37.3]

Соответственно, настоящее изобретение также относится к другому варианту осуществления биспецифического антитела, содержащего первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности антитела 010 (т.е. SEQ ID NO: 16-18 и 20-21), и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности антитела 016 (т.е. SEQ ID NO: 23-25 и 27-28). Как также описано выше, такое биспецифическое антитело по изобретению дополнительно содержит мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc в Fc области антитела. В одном варианте осуществления эта мутация соответствует мутации в положении E430 или E345 в IgG1 при использовании системы нумерации EU. В одном варианте осуществления мутация представляет собой замену E430G. В другом варианте осуществления это замена E345K.

Настоящее изобретение также обеспечивает в другом варианте осуществления биспецифическое антитело, содержащее первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности антитела 010 (т.е. SEQ ID NO: 16-18 и 20-21), и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности антитела 004 (т.е. SEQ ID NO: 2-4 и 6-7).

Настоящее изобретение также обеспечивает в другом варианте осуществления биспецифическое антитело, содержащее первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит последовательности CDR антитела 010 (т.е. SEQ ID NO: 16-18 и 20-21), и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит последовательности CDR антитела G28.1 (т.е. SEQ ID NO: 40-42 и 44-45).

Настоящее изобретение также обеспечивает в другом варианте осуществления биспецифическое антитело, содержащее первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности антитела 010 (т.е. SEQ ID NO: 16-18 и 20-21), и где вторая

антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит CDR последовательности антитела 37.3 (то есть SEQ ID NO 47-49 и 51-52).

В дополнительном варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности, выбранные из группы, включающей:

(i) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26 [016], или

(ii) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5 [004], или

(iii) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 43 [G28.1], или

(iv) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 46, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50 [37.3], или

VH последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностью, соответственно, как указано в любом из (i) - (iv).

В другом варианте осуществления изобретения вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(i) VH последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22, и VL последовательности, указанной в SEQ ID NO: 26 [016],

(ii) VH последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, и VL последовательности, указанной в SEQ ID NO: 5 [004],

(iii) VH последовательности, указанной в SEQ ID NO: 39, и VL последовательности, указанной в SEQ ID NO: 43 [G28.1],

(iv) VH последовательности, указанной в SEQ ID NO: 46, и VL последовательности, указанной в SEQ ID NO: 50 [37.3], и

VH последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность, такой как по меньшей мере 95% идентичность, такой как по меньшей мере 98% идентичность, такой как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательности, имеющей по меньшей мере 90% идентичность, такой как по меньшей мере 95% идентичность, такой как по

меньшей мере 98% идентичность, такой как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностью, соответственно, как указано в любом из (i) - (iv).

Таким образом, в другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 010 (т.е. SEQ ID NOs 15 и 19) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 016 (т.е. SEQ ID NO: 22 и 26).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 010 (то есть SEQ ID NO: 15 и 19) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 004 (т.е. SEQ ID NO: 1 и 5).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 010 (т.е. SEQ ID NO: 15 и 19) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела G28.1 (т.е. SEQ ID NO: 39 и 43).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 010 (то есть SEQ ID NO: 15 и 19) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит последовательности VH и VL антитела 37.3 (т.е. SEQ ID NO: 46 и 50).

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 005 (то есть SEQ ID NO 8 и 12) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 016 (т.е. SEQ ID NO: 22 и 26).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую

область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 005 (то есть SEQ ID NO 8 и 12) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 004 (т.е. SEQ ID NO: 1 и 5).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 005 (то есть SEQ ID NO: 8 и 12) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела G28.1 (т.е. SEQ ID NO: 39 и 43).

В другом варианте осуществления настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, включающему первую и вторую антигенсвязывающую область, где первая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 005 (то есть SEQ ID NO 8 и 12) и где вторая антигенсвязывающая область биспецифического антитела содержит VH и VL последовательности антитела 37.3 (т.е. SEQ ID NO: 46 и 50).

В еще других вариантах осуществления настоящего изобретения VH и VL последовательности, раскрытые выше, могут варьироваться в пределах 90% идентичности последовательности.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к CD37-связывающей молекуле, содержащей одну антигенсвязывающую область, описанную в данном документе, где CDR последовательности представляют собой CDR последовательности одного из антител 004, 005, 010, 016, 28.1 или 37.3. В одном варианте осуществления такая молекула имеет только одну антигенсвязывающую область. Таким образом, связывающая молекула имеет одновалентное связывание с CD37. Предпочтительно такая молекула содержит интактную Fc-область иммуноглобулина. В одном варианте осуществления CD37-связывающая молекула содержит вторую антигенсвязывающую область для нерелевантной мишени, которая, например, может быть b12.

#### Мутации, усиливающие Fc-Fc взаимодействие

В одном варианте осуществления изобретения одна или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc в указанных первой и второй Fc областях биспецифического антитела, представляют собой аминокислотные замены. Можно сказать, что Fc область биспецифического антитела содержит две разные Fc области, по одной от каждого исходного антитела против CD37. Альтернативно, биспецифическое

антитело может содержать одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc, в каждой половине молекулы. Следует понимать, что мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, являются симметричными, то есть идентичные мутации происходят в двух Fc областях.

В одном варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, в котором одна или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc в указанных первой и второй Fc областях, представляют собой аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным положениям 430, 440 и 345 в человеческом IgG1, когда используют систему нумерации EU. В одном варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, в котором одна или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc в указанных первой и второй Fc областях, представляют собой аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным положениям 430, 440 и 345 в человеческом IgG1, когда используют систему нумерации EU с условием, что замена в 440 представляет собой 440Y или 440W.

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу, содержащему по меньшей мере одну замену в указанных первой и второй Fc областях, выбранную из группы, включающей E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В конкретном предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело содержит по меньшей мере одну замену в указанных первой и второй Fc областях, выбранную из E430G или E345K, предпочтительно E430G. Таким образом, получают биспецифические антитела, которые будут усиливать взаимодействие Fc-Fc между различными антителами, имеющими указанную мутацию. Считается, что эта мутация заставляет антитела формировать олигомеры на клетке-мишени и тем самым усиливать CDC.

В другом варианте осуществления биспецифическое антитело содержит одну дополнительную мутацию в указанных Fc областях, где мутация выбрана из K439E, S440K и S440R. Биспецифическое антитело, имеющее дополнительную мутацию K439E, и второе отличающееся антитело или биспецифическое антитело, имеющее дополнительную мутацию S440K или S440R, будут формировать олигомеры в чередующихся структурах первого и второго антител. Предполагается, что это связано с тем, что дополнительные мутации будут вызывать взаимодействие предпочтительно между первым и вторым антителами, а не взаимодействие между первым и первым или вторым и вторым антителами из-за нековалентного связывания между указанными Fc областями.

Предпочтительно мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc в указанных первой и второй Fc областях, являются идентичными заменами в указанных первой и второй Fc областях. Соответственно, в одном предпочтительном варианте осуществления биспецифические антитела имеют одинаковую мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, в обеих Fc областях. Fc область также может быть описана как Fc цепи, так что антитело имеет две Fc цепи, которые составляют общую Fc область антитела. Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления каждая из двух Fc цепей содержит замену положения, выбранного из группы положений, соответствующих аминокислотным положениям 430, 440 и 345 в IgG1 человека при использовании системы нумерации EU. В одном варианте осуществления каждая из двух Fc цепей содержит замену E430G, так что биспецифическое антитело по изобретению содержит две замены E430G. В другом варианте осуществления каждая из двух Fc цепей содержит замену E345K, так что биспецифическое антитело по изобретению содержит две замены E345K.

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG1.

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG2.

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG3.

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG4.

В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой комбинацию изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Например, антитело первой половины, полученное из первого исходного антитела, может представлять собой изотип IgG1, а антитело второй половины, полученное из второго исходного антитела, может представлять собой изотип IgG4, так что биспецифическое антитело представляет собой комбинацию IgG1 и IgG4. В другом варианте осуществления это комбинация IgG1 и IgG2. В другом варианте осуществления это комбинация IgG1 и IgG3. В другом варианте осуществления это комбинация IgG2 и IgG3. В другом варианте осуществления это комбинация IgG2 и IgG4. В другом варианте осуществления это комбинация IgG3 и IgG4. Как правило, центральный шарнир представляет собой центральный шарнир типа IgG1, имеющий последовательность CPPC, но это могут быть и другие шарниры, которые являются стабильными и не допускают замены плеча Fab *in vivo*, что имеет место для

центрального шарнира IgG4, имеющего последовательность CPSC.

В предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело по изобретению представляет собой полноразмерное антитело.

В еще одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой антитело человека. В еще одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой гуманизированное антитело. В еще одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой химерное антитело. В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело представляет собой комбинацию человеческого, гуманизированного и химерного. Например, антитело первой половины, полученное из первого исходного антитела, может представлять собой антитело человека, а антитело второй половины, полученное из второго исходного антитела, может представлять собой гуманизированное антитело, так что биспецифическое антитело представляет собой комбинацию человеческого и гуманизированного антитела. В предпочтительном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело связывается с CD37 человека и макаки-крабоеда, имеющими последовательности, указанные в SEQ ID NO: 62 и 63, соответственно. Это является преимуществом, поскольку позволяет проводить доклинические токсикологические исследования на макаках-крабоедах с той же биспецифической молекулой, которая позднее будет проверена на людях. В тех случаях, когда антитела против человеческой мишени также не связывают мишень на животной модели, очень трудно проводить доклинические токсикологические исследования и неклинический профиль безопасности молекул, что является требованием регулирующих органов.

#### Биспецифические форматы антител

Настоящее изобретение относится к биспецифическим CD37хCD37 антителам, которые эффективно способствуют CDC- и/или ADCC-опосредованному лизису CD37-экспрессирующих опухолевых клеток, таких как, например, В-клеточные опухоли. В зависимости от необходимых функциональных свойств для конкретного применения конкретные антигенсвязывающие области могут быть выбраны из набора антител или антигенсвязывающих областей, предусмотренных настоящим изобретением. Многие различные форматы и применения биспецифических антител известны в данной области техники и были рассмотрены Kontermann; Drug Discov Today, 2015 Jul; 20 (7): 838-47; и MAbs, 2012 Mar-Apr;4(2):182-97.

Биспецифическое антитело по настоящему изобретению не ограничивается каким-либо конкретным биспецифическим форматом или способом его получения, однако

биспецифическое антитело по изобретению должно иметь интактный Fc домен, чтобы индуцировать усиленные взаимодействия Fc-Fc.

Примеры молекул биспецифических антител, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают (i) одно антитело, которое имеет два плеча, содержащих разные антигенсвязывающие области; (ii) антитело с двумя переменными доменами (DVD-Ig), где каждая легкая цепь и тяжелая цепь содержит два переменных домена в тандеме через короткую пептидную связь (Wu et al., «Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule», In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (iii) так называемую молекулу, полученную способом «замка на причале (dock and lock)», на основе «домена димеризации и докинга» в протеинкиназе A.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой кросс-тело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечами (такое, как описано в WO2011131746 (Genmab)).

Примеры различных классов биспецифических антител включают: (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными CH3 доменами для ускорения гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, где каждая из двух сторон молекулы содержит Fab фрагмент или часть Fab фрагмента по меньшей мере двух разных антител; (iii) слитые молекулы IgG, где полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; (iv) Fc-слитые молекулы, где одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; (v) Fab-слитые молекулы, где различные Fab-фрагменты слиты вместе, слиты с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; и (vi) антитела на основе scFv и диател и тяжелых цепей антител (например, доменные антитела, нанотела), где разные одноцепочечные Fv молекулы или разные диатела или разные антитела из тяжелой цепи (например, доменные антитела, нанотела) слиты с Fc-, но не ограничиваются ими.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами CH3 домена включают молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/ Fresenius Biotech; Roche, WO2011069104), так называемые молекулы «выступы-во-впадины» (Genentech, WO9850431), CrossMAbs (Roche, WO2011117329) и электростатически управляемые молекулы (Amgen, EP1870459 и WO2009089004; Chugai, US201000155133; Oncomed, WO2010129304), молекулы LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. *J. Biol. Chem.* 2012, 287 (52):

43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), молекулы DIG-body и PIG-body (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), молекулы доменного тела, сконструированные путем обмена цепи (SEEDbody) (EMD Serono, WO2007110205), молекулы Biclomics (Merus, WO2013157953), молекулы FcΔAdp (Regeneron, WO201015792), биспецифические молекулы IgG1 и IgG2 со сконструированным шарниром (Pfizer/Rinat, WO11143545), молекулы каркаса Azymetric™ (Zymeworks/Merck, WO2012058768), молекулы mAb-Fv (Xencor, WO2011028952), двухвалентные биспецифические антитела (WO2009080254) и молекулы DuoBody® (Genmab A/S, WO2011131746), но не ограничиваются ими.

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием включают молекулы с двойным нацеливанием (DT)-Ig (WO2009058383), Антитело два-в-одном (Genentech; Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614), сшитые mAb (Онкологический центр Карманос), mAb2 (F-Star, WO2008003116), молекулы Zybody (Zyngenia; LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), подходы с обычной легкой цепью (Crucell/ Merus, US 7,262,028), κBodies (NovImmune, WO2012023053) и CovX-body (CovX/Pfizer; Doppalapudi, VR, et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501–506), но не ограничиваются ими.

Примеры слитых молекул IgG включают молекулы с двумя вариабельными доменами (DVD)-Ig (Abbott, US 7 612 181), двухдоменные антитела с двойной головой (Unilever; Sanofi Aventis, WO20100226923), IgG-подобные биспецифические молекулы (ImClone/ Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32 (2): 191-8), Ts2Ab (MedImmune/ AZ; Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30; 393 (3): 672-92) и молекулы BsAb (Zymogenetics, WO2010111625), молекулы HERCULES (Biogen Idec, US007951918), слитые молекулы scFv (Novartis), слитые молекулы scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, CN 102250246) и молекулы TvAb (Roche, WO2012025525, WO20125), но не ограничиваются ими.

Примеры Fc слитых молекул включают гибриды ScFv/Fc (Pearce et al., Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep; 42 (6): 1179-88), молекулы SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100 th Annual meeting 2009 (Abstract # 5465); Zymogenetics/ BMS, WO2010111625), молекулы переориентирующихся антител с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538) и Dual(ScFv)2-Fab молекулы (Национальный научно-исследовательский центр медицины антител (Китай)), но не ограничиваются ими.

Примеры Fab-слитых биспецифических антител включают молекулы F(ab)2 (Medarex/ AMGEN; Deo et al. J. Immunol. 1998 Feb 15; 160 (4): 1677-86), молекулы двойного действия или бис-Fab молекулы (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323,

1610–1614), молекулы на основе димеризации и докинга (DNL) (ImmunoMedics, WO2003074569, WO2005004809), двухвалентные биспецифические молекулы (Biotecol, Schoonjans, J. Immunol. 2000 Dec. 15; 165(12):7050-7) и молекулы Fab-Fv (UCB-Celltech, WO 2009040562 A1), но не ограничиваются ими.

Примеры антител на основе scFv, диател и доменных антител включают молекулы на основе технологии переориентирующихся антител с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics, WO2008157379, WO2010080538), молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug; 88(6): 667-75) и нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010), но не ограничиваются ими.

В одном аспекте биспецифическое антитело по изобретению включает первую Fc-область, содержащую первую CH3 область, и вторую Fc-область, содержащую вторую CH3 область, где последовательности первой и второй CH3 областей различны и таковы, что гетеродимерное взаимодействие между указанной первой и второй CH3 областями является более сильным, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй CH3 областей. Более подробные сведения об этих взаимодействиях и о том, как они могут быть достигнуты, представлены в WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab), которые настоящим включены посредством ссылки.

Как описано далее в настоящем документе, стабильное биспецифическое CD37xCD37 антитело может быть получено с высоким выходом с использованием определенного способа на основе одного гомодимерного исходного CD37 антитела и другого гомодимерного исходного CD37 антитела, содержащего только несколько довольно консервативных асимметричных мутаций в CH3 областях. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй CH3 областей содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях, так что первая и вторая CH3 области имеют разные аминокислотные последовательности.

В одном аспекте биспецифическое антитело, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, содержит первую и вторую Fc-область, где каждая из указанной первой и второй Fc-области содержит по меньшей мере шарнирную область, CH2 и CH3 область, где в указанной первой Fc-области по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положениям, выбранным из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, была замещена, и в указанной второй Fc области по меньшей мере одна из аминокислот в положениях, соответствующих положению, выбранному из группы, состоящей из T366, L368, K370, D399, F405, Y407 и K409 в тяжелой цепи человеческого IgG1, была замещена, и где указанная первая и указанные вторая Fc области не замещены

в одинаковых положениях.

Соответственно, в предпочтительном варианте осуществления изобретения первая Fc область биспецифического антитела содержит аминокислотную мутацию, соответствующую положению F405 в IgG1 человека, а вторая Fc область биспецифического антитела содержит дополнительную аминокислотную мутацию, соответствующую положению K409 в человеческом IgG1. Соответственно, эти мутации являются асимметричными по сравнению с вышеупомянутыми мутациями, усиливающими взаимодействие Fc-Fc.

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении 366, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из из 368, 370, 399, 405, 407 и 409. В одном варианте осуществления аминокислота в положении 366 выбрана из Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val или Gln..

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении 368, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из из 366, 370, 399, 405, 407 и 409.

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, первая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении 370, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из из 366, 368, 399, 405, 407 и 409.

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, первая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении 399, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из из: 366, 368, 370, 405, 407 и 409.

В одном варианте биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении 405, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 407 и 409.

В одном варианте биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислотную

замену в положении 407, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 409.

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407.

Соответственно, в одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящем документе, последовательности указанной первой и второй Fc-областей содержат асимметричные мутации, то есть мутации в разных положениях в двух Fc-областях, например, мутацию в положении 405 в одной из Fc-областей и мутацию в положении 409 в другой Fc-области.

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407. В одном таком варианте осуществления указанная первая область Fc имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, и указанная вторая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Phe, например Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Cys, Lys или Leu, в положении 405. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, например, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 405.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, и указанная вторая Fc-область содержит аминокислоту, отличную от Phe, например Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr, Leu, Met или Cys, в положении 405 и Lys в положении 409. В следующем варианте

осуществления указанная первая Fc-область содержит Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, например, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Met, Lys, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 405, и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Leu в положении 405 и Lys в положении 409. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения указанная первая Fc-область содержит Phe в положении 405 и Arg в положении 409, и указанная вторая Fc-область содержит аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, например, Leu, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Met, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 405 и Lys в положении 409. В другом варианте осуществления указанная первая Fc-область содержит Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Leu в положении 405 и Lys в положении 409.

В дополнительном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405. В дополнительном варианте осуществления указанная первая Fc-область содержит Arg в положении 409, а вторая Fc-область содержит Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В еще одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Lys в положении 409, Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная

вторая Fc-область содержит Lys в положении 409 и: (a) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или (b) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Lys в положении 409 и: (a) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или (b) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит Thr в положении 350, Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Lys в положении 409 и: (a) Ile в положении 350 и Leu в положении 405, или (b) Thr в положении 370 и Leu в положении 405.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область содержит Thr в положении 350, Lys в положении 370, Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область содержит Ile в положении 350, Thr в положении 370, Leu в положении 405 и Lys в положении 409.

В одном варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Phe, в положении 405, например, отличную от Phe, Arg или Gly в позиции 405; или указанная первая CH<sub>3</sub> область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а указанная вторая CH<sub>3</sub> область имеет аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, в положении 407.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, содержит первую Fc-область, имеющую аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, и вторую Fc-область, имеющую аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, содержит первую Fc-область, имеющую Tyr в положении 407, и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409, и вторую Fc-область, имеющую аминокислоту, отличную от Tyr,

Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407 и Lys в положении 409.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в данном документе, содержит первую Fc-область, имеющую Tyr в положении 407 и Arg в положении 409, и вторую Fc-область, имеющую аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления указанная первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, например Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407. В другом варианте осуществления указанная первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys, в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Tyr, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, например Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет Tyr в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Tyr или Cys в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет

Туг в положении 407 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Туг или Cys, в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет Туг в положении 407 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Туг, Asp, Glu, Phe, Lys, Gln, Arg, Ser или Thr, например, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, His, Asn, Pro, Trp или Cys в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет Туг в положении 407 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет Ala, Gly, His, Ile, Leu, Met, Asn, Val или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, указанная первая Fc-область имеет Туг в положении 407 и Arg в положении 409, а указанная вторая Fc-область имеет Gly, Leu, Met, Asn или Trp в положении 407 и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления биспецифического антитела, как определено в любом из раскрытых здесь вариантов осуществления, первая Fc-область имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Phe, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Туг или Cys, в положении 409, а вторая Fc-область имеет:

(i) аминокислоту, отличную от Phe, Leu и Met, например, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Pro, Trp, Туг или Cys, в положении 368, или

(ii) Trp в положении 370, или

(iii) аминокислоту, отличную от Asp, Cys, Pro, Glu, или Gln, например, Phe, Leu, Met, Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asn, Trp, Туг или Cys, в положении 399, или

(iv) аминокислоту, отличную от Lys, Arg, Ser, Thr или Trp, например, Phe, Leu, Met, Ala, Val, Gly, Ile, Asn, His, Asp, Glu, Gln, Pro, Туг или Cys, в положении 366.

В одном варианте осуществления первая Fc-область имеет Arg, Ala, His или Gly в положении 409, а вторая Fc-область имеет:

(i) Lys, Gln, Ala, Asp, Glu, Gly, His, Ile, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или

(ii) Trp в положении 370, или

(iii) Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Asn, Ser, Thr, Trp, Phe, His, Lys, Arg или Туг в положении

399, или

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln, Phe, Gly, Ile, Leu, Met или Tyr в положении 366.

В одном варианте осуществления первая Fc-область имеет Arg в положении 409, а вторая Fc-область имеет:

(i) Asp, Glu, Gly, Asn, Arg, Ser, Thr, Val или Trp в положении 368, или

(ii) Trp в положении 370, или

(iii) Phe, His, Lys, Arg или Tyr в положении 399, или

(iv) Ala, Asp, Glu, His, Asn, Val, Gln. в положении 366.

В дополнение к указанным выше аминокислотным заменам указанные первая и вторая Fc области могут содержать дополнительные аминокислотные замены, делеции или вставки относительно Fc последовательностей дикого типа.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения вторая Fc область биспецифического антитела содержит мутацию, соответствующую F405 в человеческом IgG1, а первая Fc область содержит мутацию, соответствующую K409 в человеческом IgG1, при использовании нумерации EU.

В одном варианте осуществления мутации в положении F405 и K409 являются заменами. В конкретном варианте осуществления замена в положении F405 представляет собой замену F405L. В другом варианте осуществления замена в положении K409 представляет собой замену K409R.

В вариантах осуществления, где биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG4, первая Fc область может дополнительно содержать замену F405L и замену R409K. В таких вариантах осуществления вторая Fc область не замещена ни в одном из 405 и 409 аминокислотных положений.

Следует понимать, что, если не указано иное, все упомянутые аминокислотные мутации в раскрытых положениях являются мутациями относительно человеческого IgG1 и использования человеческого IgG1 для нумерации с применением системы нумерации EU.

В одном варианте осуществления ни упомянутая первая, ни указанная вторая Fc-область не содержат последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в центральной шарнирной области.

В дополнительном варианте осуществления обе из указанной первой и указанной второй Fc-области содержат последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в центральной шарнирной области.

Таким образом, обеспечиваются биспецифические антитела, которые могут быть

получены с высоким выходом и которые являются стабильными *in vivo*.

В другом варианте осуществления биспецифическое антитело по изобретению имеет повышенные эффекторные функции CDC и/или ADCC по сравнению с идентичным биспецифическим антителом, которое не имеет мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В другом варианте осуществления биспецифическое антитело по изобретению обладает повышенными эффекторными функциями CDC и/или ADCC по сравнению с моноклональным исходным антителом, имеющим область связывания либо из первой, либо из второй области связывания биспецифического антитела и имеющим идентичные мутации, усиливающие Fc-Fc взаимодействие, как биспецифическое антитело по изобретению.

#### Способ получения биспецифических антител по изобретению

Традиционные способы, такие как способы на основе гибридом и способы химической конъюгации (Marvin and Zhu (2005) *Acta Pharmacol Sin* 26: 649), могут быть использованы при получении биспецифических антител по изобретению. Совместная экспрессия в клетке-хозяине двух антител, состоящих из разных тяжелых и легких цепей, приводит к смеси возможных продуктов антител в дополнение к необходимому биспецифическому антителу, которое затем может быть выделено, например, аффинной хроматографией или подобными способами.

Можно также использовать стратегии, способствующие образованию функционального биспецифического продукта при совместной экспрессии различных конструкций антител, например, способ, описанный Lindhofer et al. (1995 *J Immunol* 155: 219). Слияние гибридом крыс и мышей, продуцирующих разные антитела, приводит к ограниченному количеству гетеродимерных белков из-за предпочтительного ограниченного по видовой принадлежности спаривания тяжелой/легкой цепей. Другой стратегией, способствующей образованию гетеродимеров по сравнению с гомодимерами, является стратегия «выступ-во-впадину», в которой выступ вводят в первый полипептид тяжелой цепи и соответствующую полость во втором полипептиде тяжелой цепи, так что выступ может быть расположен в полости на границе этих двух тяжелых цепей, чтобы способствовать образованию гетеродимера и препятствовать образованию гомодимера. «Выступы» конструируют путем замены небольших аминокислотных боковых цепей на границе раздела первого полипептида более крупными боковыми цепями. Компенсаторные «полости» идентичного или сходного размера с выступами создают на границе раздела второго полипептида путем замены больших аминокислотных боковых цепей более мелкими (патент США 5731168). EP 1870459 (Chugai) и WO2009089004 (Amgen) описывают другие стратегии, способствующие образованию гетеродимера при

совместной экспрессии различных доменов антител в клетке-хозяине. В этих способах один или несколько остатков, которые составляют границу раздела СНЗ-СНЗ в обоих СНЗ-доменах, заменяют заряженной аминокислотой, так что образование гомодимера является электростатически неблагоприятным, а гетеродимеризация является электростатически выгодной. В WO2007110205 (Merck) описана еще одна стратегия, в которой различия между СНЗ доменами Ig3 и IgG используют для ускорения гетеродимеризации.

Другой способ получения биспецифических антител *in vitro* был описан в WO 2008119353 (Genmab), где биспецифическое антитело образуется путем обмена «Fab-плеча» или «полу-молекулы» (обмена тяжелой цепи и присоединенной легкой цепи) между двумя моноспецифическими IgG4- или IgG4-подобными антителами при инкубации в восстанавливающих условиях. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, которые могут содержать разные последовательности.

Предпочтительный способ получения биспецифических антител против CD37хCD37 по настоящему изобретению включает способы, описанные в WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab), включающие следующие этапы:

а) обеспечения первого антитела, содержащего Fc область, причем указанная Fc область содержит первую СНЗ область;

б) обеспечения второго антитела, содержащего вторую Fc область, причем указанная Fc область содержит вторую СНЗ область, где первое антитело представляет собой антитело против CD37, а второе антитело представляет собой другое антитело против CD37;

где последовательности указанных первой и второй СНЗ областей являются различными и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй СНЗ областями является более сильным, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй СНЗ областей;

с) инкубации указанного первого антитела вместе с указанным вторым антителом в восстанавливающих условиях; и

д) получения указанного биспецифического антитела.

В одном варианте осуществления указанное первое антитело вместе с указанным вторым антителом инкубируют при восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергаться изомеризации дисульфидной связи, где гетеродимерное взаимодействие между указанным первым и вторым антителами в полученном гетеродимерном антителе является таким, что не

происходит замены Fab-плеча при 0,5 mM GSH через 24 часа при 37°C.

Не желая углубляться в теорию, на стадии (с) дисульфидные связи тяжелой цепи в шарнирных областях исходных антител восстанавливаются, и полученные цистеины затем способны формировать дисульфидную связь между тяжелыми цепями с остатками цистеина другой молекулы исходного антитела (изначально с другой спецификой). В одном варианте осуществления этого способа восстанавливающие условия на стадии (с) включают добавление восстановителя, например, восстановителя, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина (2-MEA), дитиотреитола (DTT), дитиоэритритола (DTE), глутатиона, трис(2-карбоксиил)фосфина (TCPEP), L-цистеина и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстановителя, выбранного из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиил) фосфина. В дополнительном варианте осуществления стадия (с) включает восстанавливающие условия, которые становятся невозстанавливающими или менее восстанавливающими, например, путем удаления восстановителя, например, путем обессоливания.

Для этого способа может быть использовано любое из CD37 антител, описанных в данном документе, включая первое и второе антитела против CD37, содержащие первую и/или вторую Fc область. Примеры таких первой и второй Fc областей, включая комбинацию таких первой и второй Fc областей, могут включать в себя любые из Fc областей, описанных в настоящей заявке.

В одном варианте осуществления этого способа указанные первое и/или второе антитела являются полноразмерными антителами.

Fc области первого и второго антител могут иметь любой изотип, включая IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, но не ограничиваясь ими. В одном варианте этого способа Fc области обоих указанных первого и второго антител имеют изотип IgG1. В другом варианте осуществления одна из Fc областей указанных антител имеет изотип IgG1, а другая - изотип IgG4. В последнем варианте осуществления полученное биспецифическое антитело содержит Fc область IgG1 и Fc область IgG4 и, таким образом, может иметь интересные промежуточные свойства в отношении активации эффекторных функций.

В дополнительном варианте осуществления один из исходных белков антитела был сконструирован так, чтобы не связывать белок А, что позволяет отделить гетеродимерный белок от указанного гомодимерного исходного белка путем пропускания продукта через колонку с белком А.

Как описано выше, последовательности первой и второй СН3 областей гомодимерных исходных антител (родительских антител) различны и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй СН3 областями

сильнее, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанной первой и второй СНЗ областей. Дополнительные подробности об этих взаимодействиях и о том, как они могут быть достигнуты, представлены в WO2011131746 и WO2013060867 (Genmab), которые настоящим включены посредством ссылки во всей полноте.

В частности, стабильное биспецифическое антитело к CD37хCD37 может быть получено с высоким выходом с использованием вышеуказанного способа по изобретению на основе двух гомодимерных исходных антител, которые связывают разные эпитопы CD37 и содержат только несколько довольно консервативных асимметричных мутаций в СНЗ областях. Асимметричные мутации означают, что последовательности указанных первой и второй СНЗ областей содержат аминокислотные замены в неидентичных положениях.

Биспецифические антитела по изобретению также могут быть получены путем совместной экспрессии конструкций, кодирующих первый и второй полипептиды в одной клетке. Таким образом, в дополнительном аспекте изобретение относится к способу получения биспецифического антитела, включающему следующие стадии:

а) обеспечение первой нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей первый полипептид, включающий первую Fc область и первую антигенсвязывающую область первой тяжелой цепи антитела, причем указанная первая Fc область содержит первую СНЗ область;

б) обеспечение нуклеиновокислотной второй конструкции, кодирующей второй полипептид, включающий вторую Fc область и вторую антигенсвязывающую область второй тяжелой цепи антитела, причем указанная вторая Fc область содержит вторую СНЗ область;

где последовательности указанных первой и второй СНЗ областей являются различными и являются такими, что гетеродимерное взаимодействие между указанными первой и второй СНЗ областями является более сильным, чем каждое из гомодимерных взаимодействий указанных первой и второй СНЗ областей;

при необходимости, где указанные первая и вторая нуклеиновокислотные конструкции кодируют последовательности легкой цепи указанного первого и второго антител;

с) совместная экспрессия указанных первой и второй нуклеиновокислотных конструкций в клетке-хозяине; и

д) получение указанного гетеродимерного белка из клеточной культуры.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, которая продуцирует

биспецифическое антитело по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения биспецифическое антитело получают любым из способов согласно настоящему изобретению.

Подходящие векторы экспрессии, включая промоторы, энхансеры и т.д., и подходящие клетки-хозяева для продукции антител хорошо известны в данной области техники. Примеры клеток-хозяев включают дрожжи, клетки бактерий и млекопитающих, такие как клетки СНО или НЕК.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, содержит первую Fc-область и вторую Fc-область, где ни указанная первая, ни указанная вторая Fc-область не содержат последовательность Cys-Pro-Ser-Cys в шарнирной области.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, содержит первую Fc-область и вторую Fc-область, где обе из указанных первой и второй Fc-областей содержат последовательность Cys-Pro-Pro-Cys в шарнирной области.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, содержит первую Fc-область и вторую Fc-область, где первая и вторая Fc-области представляют собой Fc-области антитела человека.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, содержит первую Fc-область и вторую Fc-область, где первая и вторая антигенсвязывающие области содержат VH последовательности антитела человека и, при необходимости, VL последовательности антитела человека.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, содержит первую Fc-область и вторую Fc-область, где первая и вторая антигенсвязывающие области происходят от антител из тяжелых цепей.

В одном варианте осуществления биспецифическое антитело, как определено в любом из вариантов осуществления, раскрытых в настоящей заявке, содержит первую Fc-область и вторую Fc-область, где первая и вторая антигенсвязывающие области содержат первую и вторую легкую цепь.

В других вариантах осуществления способ совместной экспрессии в соответствии с изобретением включает любые из дополнительных признаков, описанных выше в способе *in vitro*.

### Исходные антитела

В другом варианте осуществления изобретение относится к исходным антителам, которые используются для получения биспецифических антител по изобретению.

Таким образом, в одном варианте осуществления изобретение относится к антителу против CD37, связывающемуся с тем же эпитопом на CD37 человека, что и антитело против CD37, которое включает:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005].

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против CD37, которое конкурирует за связывание с антителом против CD37, включающему:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005].

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против CD37, включающему:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005].

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против CD37, включающему:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 23, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 24, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 25, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR2: YAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 28; [016] или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR2: EAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7. [004]

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу, как определено выше, которое содержит одну или несколько аминокислотных мутаций в Fc области антитела, где мутация (мутации) усиливает взаимодействие Fc-Fc между антителами при связывании с мишенью по сравнению с Fc-Fc взаимодействием между антителами, не имеющими указанной мутации (мутаций).

Полагают, что указанное усиленное взаимодействие Fc-Fc приводит к тому, что антитела образуют олигомеры, такие как, например, гексамеры на клетках-мишенях, где образование олигомеров вызывает эффект усиления CDC. В предпочтительном варианте осуществления одна или несколько аминокислотных мутаций в Fc области антитела представляют собой аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным положениям 430, 440 и 345 в IgG1 человека, где используют систему нумерации EU и где замена относится к аминокислотной последовательности человеческого IgG1. В одном варианте осуществления одна или несколько аминокислотных мутаций в Fc-области антитела представляют собой аминокислотную замену в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным положениям 430, 345 и 440 в IgG1 человека при использовании системы нумерации EU, при условии, что замена в 440 представляет собой замену 440Y или 440W. В одном варианте осуществления по меньшей мере одна аминокислотная замена в Fc

области выбрана из группы, включающей E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W.

В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере одна замена в указанной Fc области выбрана из E430G или E345K, предпочтительно E430G. Эти мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, являются симметричными мутациями, так что две Fc цепи антитела имеют идентичные мутации/ замены.

В дополнительном варианте осуществления антитело может дополнительно содержать замену в положении, соответствующем 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409 в человеческом IgG1. Антитело, имеющее замену в одном из этих аминокислотных положений, является стабильным антителом; однако оно может в восстанавливающих условиях в так называемой реакции «обмена Fab плеча» формировать биспецифические антитела с антителом, имеющим замену в другом из этих аминокислотных положений и имеющим другую антигенсвязывающую область. В восстанавливающих условиях, достаточных для того, чтобы позволить цистеинам в шарнирной области подвергаться изомеризации дисульфидной связи, антитело по изобретению будет формировать половинные молекулы, каждая из которых содержит один антигенсвязывающий участок и Fc область. Замены в неидентичных положениях в любом из положений, соответствующих 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409 в человеческом IgG1, способствуют димеризации половинных молекул первого антитела с половинными молекулами второго антитела, так что биспецифические (гетеродимерные) антитела будут формироваться при удалении восстанавливающих условий и реформировании дисульфидных связей в шарнирной области.

Таким образом, два антитела по настоящему изобретению, имеющие разные антигенсвязывающие области и связывающие разные эпитопы на CD37, и содержащие замену в обеих Fc цепях (Fc областях) в любом из аминокислотных положений, соответствующих 366, 368, 370, 399, 405, 407 и 409 в человеческом IgG1, но в неидентичных положениях, могут быть подходящими для получения биспецифического антитела по изобретению.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 366, и указанный второй гомодимерный белок имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 368, 370, 399, 405, 407 и 409. В одном варианте осуществления аминокислота в положении 366 выбрана из Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, Glu, и Gly.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 368, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении,

выбранном из группы, состоящей из 366, 370, 399, 405, 407 и 409.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 370, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 399, 405, 407 и 409.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 399, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 405, 407 и 409.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 405, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 407 и 409.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 407, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 409.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислотную замену в положении 409, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407.

В одном варианте осуществления первое антитело имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409, такую как аминокислота, выбранная из группы, включающей Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Trp, Phe или Tug в положении 409, а указанное второе антитело имеет аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из 366, 368, 370, 399, 405 и 407.

В одном таком варианте осуществления указанное первое антитело имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409, такую как аминокислота, выбранная из группы, включающей Gly, Ala, Val, Ile, Ser, Thr, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Trp, Phe или Tug в положении 409, а указанное второе антитело имеет аминокислоту, отличную от Phe, в положении 405, такую как аминокислота, выбранная из группы, включающей Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Ser, Thr, Lys, Arg, His, Asp, Asn, Glu, Gln, Trp, Met или Tug в положении, соответствующем 405 в IgG1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения указанное первое антитело имеет аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met, в положении 409, а указанное второе антитело имеет аминокислоту, отличную от Phe, Arg или Gly, в положении 405.

В другом варианте осуществления указанное первое антитело содержит Phe в положении 405 и аминокислоту, отличную от Lys, Leu или Met в положении 409, а указанное второе антитело содержит аминокислоту, отличную от Phe, в положении 405, и Lys в положении 409.

В другом варианте осуществления указанное первое антитело содержит Phe в положении 405 и Arg в положении 409, а указанное второе антитело содержит Leu в положении 405 и Lys в положении 409. В вариантах осуществления, где антитела представляют собой изоформы IgG1, IgG2 или IgG3, первое антитело может содержать замену F405L, а второе антитело может содержать замену K409R, или наоборот. Однако в вариантах осуществления, где антитела являются обоими изоформами IgG4, аминокислота в положении 409 естественно представляет собой Arg (R). Таким образом, в таких вариантах осуществления первое антитело не замещено в положении 409, но естественно имеет R409, а второе антитело содержит замены F405L и R405K, или наоборот; второе антитело не замещено в положении 409, но естественно имеет R409, а первое антитело содержит замены F405L и R405K. В вариантах осуществления, где одно или оба из первого и второго антител имеют изоформы IgG4.

Соответственно, в одном варианте осуществления антитело по изобретению может содержать замену, соответствующую F405L в человеческом IgG1. В другом варианте осуществления антитело по изобретению может содержать замену, соответствующую K409R в человеческом IgG1. Такие два разных антитела подходят для получения биспецифических антител по изобретению. В особо предпочтительном варианте осуществления первое антитело по изобретению содержит замену F405L и E430G, а второе антитело по изобретению содержит замену K409R и E430G. Таким образом, обеспечиваются антитела, которые могут формировать биспецифические антитела по изобретению, причем биспецифические антитела содержат первую половинную молекулу, содержащую замены F405L + E430G, и вторую половинную молекулу, содержащую K409R + E430G, при использовании IgG1 для нумерации. В вариантах осуществления, где изоформой является IgG4, первая половинная молекула содержит замены F405L + R409K + E430G, а вторая половинная молекула содержит E430G при использовании IgG4 для нумерации. Предпочтительно в таких вариантах осуществления IgG4 центральная шарнирная область замещена из аминокислотной последовательности «CPSC» на последовательность «CPPC», чтобы сделать биспецифическое антитело более стабильным *in vivo* и/или *in vitro* по сравнению с антителом IgG4, имеющим центральный шарнир CPSC.

В одном варианте осуществления изобретения первое антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность

CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; и Fc область, содержащая замену F405L и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких положениях аминокислот, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В другом варианте осуществления изобретения первое антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; и Fc область, содержащую замену K409R и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В другом варианте осуществления изобретения первое антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005]; и Fc область, содержащую замену F405L и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В еще одном варианте осуществления изобретения первое антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность

CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005]; и Fc область, содержащую замену K409R и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В одном варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 23, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 24, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 25, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR2: YAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 28 [016]; и Fc область, содержащую замену F405L и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В другом варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 23, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 24, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 25, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR2: YAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 28 [016]; и Fc область, содержащую замену K409R и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В другом варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и VL область, содержащую последовательность CDR1,

указанную в SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR2: EAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7 [004]; и Fc область, содержащую замену F405L и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В еще одном варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR2: EAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7 [004]; и Fc область, содержащую замену K409R и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В другом варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 40, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 41, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 42, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 44, и последовательность CDR2: FAK, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 45 [G28.1]; и Fc область, содержащую замену F405L и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В еще одном варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 40, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 41, и последовательность CDR3,

указанную в SEQ ID NO: 42, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 44, и последовательность CDR2: FAK, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 45 [G28.1]; и Fc область, содержащую замену K409R и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В другом варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 47, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 48, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 49, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR2: VAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 52 [37.3]; и Fc область, содержащую замену F405L и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

В еще одном варианте осуществления изобретения второе антитело включает VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 47, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 48, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 49, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR2: VAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 52 [37.3]; и Fc область, содержащую замену K409R и одну или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc. В предпочтительном варианте осуществления мутации, усиливающие взаимодействие Fc-Fc, представляют собой замены в одном или нескольких аминокислотных положениях, выбранных из группы, включающей 430, 345 и 440, такие как E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W. В предпочтительном варианте осуществления это E430G.

Соответственно, изобретение также относится к анти-CD37 антителу, которое связывается с человеческим CD37, которое содержит:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 40, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 41, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 42, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 44, и последовательность CDR2: FAK, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 45 [G28.1], или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 47, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 48, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 49, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR2: VAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 52 [37.3];

(iii) и где антитело (i) или (ii) включает Fc область, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W; и

(iv) где при необходимости Fc область дополнительно содержит мутацию либо K409R, либо F405L.

Как упомянуто выше, анти-CD37-антитела по изобретению могут представлять собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном варианте осуществления антитело против CD37 по изобретению имеет изотип IgG.

В одном варианте осуществления антитело по изобретению является человеческим, гуманизированным или химерным.

В одном варианте осуществления антитело по изобретению связывается с антигенами CD37 человека и макаки-крабода.

#### Дополнительные варианты осуществления изобретения

В другом варианте осуществления изобретение относится к композиции, включающей биспецифическое антитело по изобретению и дополнительно включающей моноспецифическое анти-CD37-антитело, предпочтительно анти-CD37-антитело, имеющее антигенсвязывающую область либо из первой, либо из второй антигенсвязывающей области биспецифического антитела.

В одном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело по изобретению или анти-CD37-антитело по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу по изобретению, или антителу по изобретению, или композиции по изобретению для применения в качестве медикамента.

В одном варианте осуществления изобретения биспецифическое антитело по

изобретению предназначено для применения при лечении рака, аутоиммунного заболевания или воспалительных расстройств.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD37-антитело по изобретению предназначено для применения при лечении рака, аутоиммунного заболевания или воспалительных расстройств.

В одном варианте осуществления изобретения композиция по изобретению предназначена для применения при лечении рака, аутоиммунного заболевания или воспалительных расстройств.

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу по изобретению для применения при лечении аллергии, отторжения трансплантата или В-клеточной неоплазии, такой как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийноклеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКБКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу по изобретению для применения при лечении ревматоидного артрита, такого как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагра или подагрический артрит, острый подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, артрит, индуцированный коллагеном II типа, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, артрит позвоночника и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, и анкилозирующий спондилит; системная красная волчанка (СКВ), такая как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, неонатальный волчаночный синдром (НВС) и диссеминированная красная волчанка, рассеянный склероз; воспалительная болезнь кишечника (ВБК), которая включает язвенный колит и болезнь Крона, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), псориаз, IgA нефропатия, IgM полиневропатии, миастения гравис, сахарный диабет, синдром Рейно и гломерулонефрит, ладонно-подошвенный пустулез (ЛПП), эрозивный плоский лишай, буллезный пемфигоид, буллезный эпидермолиз, контактный дерматит, и атопический дерматит, полирадикулит, включая синдром Гийена-Барре.

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против CD37 по изобретению для применения при лечении аллергии, отторжения трансплантата или В-клеточной неоплазии.

В другом варианте осуществления изобретение относится к анти-CD37-антителу по

изобретению для применения при лечении аллергии, отторжения трансплантата или В-клеточной неоплазии, такой как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийно-клеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКБКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

В другом варианте осуществления изобретение относится к антителу против CD37 по изобретению для применения при лечении ревматоидного артрита, такого как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагра или подагрический артрит, острый подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, артрит, индуцированный коллагеном II типа, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориазический артрит, болезнь Стилла, артрит позвоночника и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессирующий артрит, деформирующий артрит, первичный хронический полиартрит, реактивный артрит, и анкилозирующий спондилит; системной красной волчанки (СКВ), такой как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, волчаночный синдром новорожденных (NLE) и диссеминированная красная волчанка; рассеянного склероза, воспалительной болезни кишечника (ВБК), которая включает язвенный колит и болезнь Крона; хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ), псориаза, IgA нефропатии, IgM полиневропатий, миастении гравис, сахарного диабета, синдрома Рейно и гломерулонефрита, ладонно-подошвенного пузырца (ЛПП), эрозивного плоского лишая, буллезного пемфигоида, буллезного эпидермолиза, контактного дерматита и атопического дерматита, полирадикулита, включая синдром Гийена-Барре.

В другом варианте осуществления изобретение относится к биспецифическому антителу по изобретению для применения в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. В другом варианте осуществления изобретения анти-CD37-антитела по изобретению предназначены для применения в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами. Один или несколько дополнительных терапевтических агентов могут, например, быть выбранными из группы, включающей доксорубин, цисплатин, блеомицин, кармустин, циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин, винкристин, флударабин, ибрутиниб и анти-CD20-антитело, такое как ритуксимаб, офатумумаб, обинутузумаб, велтузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб или TRU-015.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой антитело против CD20.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело способно

связываться с человеческим CD20, имеющим последовательности, указанные в SEQ ID NO: 72.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело способно связываться с CD20 макаки-крабоеда, имеющим последовательности, указанные в SEQ ID NO: 73.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело способно связываться с CD20 человека и макаки-крабоеда, имеющими последовательности, указанные в SEQ ID NO: 72 и 73, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело способно связываться с эпитопом на CD20 человека, который не содержит или не требует аминокислотных остатков аланина в положении 170 или пролина в положении 172, но который содержит или требует аминокислотных остатков аспарагина в положении 163 и аспарагина в положении 166 SEQ ID NO: 72. Примерами таких антител являются антитела, обозначенные 2F2 и 7D8, как раскрыто в WO2004035607 (Genmab), и антитело, обозначенное 2C6, как описано в WO2005103081 (Genmab). Последовательности CDR 7D8 раскрыты в Таблице 1.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело способно связываться с эпитопом на CD20 человека, который не содержит или не требует аминокислотных остатков аланина в положении 170 или пролина в положении 172 из SEQ ID NO: 72. Пример такого антитела представляет собой 11B8, как раскрыто в WO2004035607 (Genmab). Последовательности CDR 11B8 раскрыты в Таблице 1.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело способно связываться с прерывистым эпитопом на CD20 человека, где эпитоп включает часть первой малой внеклеточной петли и часть второй внеклеточной петли.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело способно связываться с прерывистым эпитопом на CD20 человека, где эпитоп имеет остатки AGIYAP малой первой внеклеточной петли и остатки MESLNFIRАНТРУ второй внеклеточной петли.

Анти-CD20 антитела могут характеризоваться как анти-CD20 антитела I типа и II типа. Анти-CD20-антитела I типа обладают высокой активностью CDC и ADCC, но низкой апоптотической активностью, такие как офатумумаб (2F2) и ритуксимаб, тогда как анти-CD20-антитела II типа имеют низкую или отсутствующую активность CDC, но высокую ADCC и апоптотическую активность, такие как обинутузумаб и 11B8. Также антитела I типа индуцируют CD20 к перераспределению в большие устойчивые к детергентам микродомены (рафты), в то время как антитела II типа - нет.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, где антигенсвязывающая область конкурирует за связывание CD20 человека с анти-CD20 антителом, содержащим последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельной легкой цепи (VL), как указано в SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 78, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, где антигенсвязывающая область конкурирует за связывание CD20 человека с анти-CD20 антителом, содержащим последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельной легкой цепи (VL), как указано в SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 109, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, где антигенсвязывающая область конкурирует за связывание CD20 человека с анти-CD20-антителом, содержащим последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельной легкой цепи (VL), как указано в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 98, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, где антигенсвязывающая область конкурирует за связывание CD20 человека с анти-CD20-антителом, содержащим последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельной легкой цепи (VL), как указано в SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 91, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, где антигенсвязывающая область конкурирует за связывание CD20 человека с анти-CD20-антителом, содержащим последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и последовательность вариабельной легкой цепи (VL), как указано в SEQ ID NO: 101 и SEQ ID NO: 105, соответственно.

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, содержащую последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 75,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 76,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 77,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 79

VL CDR2 последовательность DAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 80. [7D8]

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело включает антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, содержащую последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 82,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 83,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 84,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 85

VL CDR2 последовательность DAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 86. [118B]

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, содержащую последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 95,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 96,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 97,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 99,

VL CDR2 последовательность ATS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 100. [Ритуксимаб]

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело включает антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, содержащую последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 88,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 89,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 90,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 92,

VL CDR2 последовательности DAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 93. [Офатумумаб]

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20-антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, содержащую последовательности CDR:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 102,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 103,  
Последовательность VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 104,  
Последовательность VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 106  
VL CDR2 последовательность QMS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 107. [обинутузумаб]

В одном варианте осуществления изобретения анти-CD20 антитело содержит антигенсвязывающую область, способную связываться с CD20 человека, включающую последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

- i) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 75,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 76,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 77,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 79  
VL CDR2 последовательности DAS, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 80. [7D8];
- ii) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 82,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 83,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 84,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 85  
VL CDR2 последовательности DAS, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 86. [118B];
- iii) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99,  
VL CDR2 последовательности ATS, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100. [Ритуксимаб];
- iv) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 88,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 89,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 90,  
VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 92  
VL CDR2 последовательности DAS, и  
VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 93. [Офатумумаб]; и
- v) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102,  
VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 103,  
VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 104,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106

VL CDR2 последовательности QMS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 107. [Обинутузумаб].

В другом варианте осуществления изобретение относится к применению биспецифического антитела по изобретению или анти-CD37-антитела по изобретению для изготовления медикамента. В другом варианте осуществления настоящего изобретения применение осуществляют для изготовления медикамента для лечения рака, аутоиммунных заболеваний или воспалительных заболеваний, таких как аллергия, отторжение трансплантата или В-клеточная неоплазия, такая как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийно-клеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКБКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), ревматоидный артрит, такой как острый артрит, хронический ревматоидный артрит, подагра или подагрический артрит, острый подагрический артрит, острый иммунологический артрит, хронический воспалительный артрит, дегенеративный артрит, артрит, индуцированный коллагеном II типа, инфекционный артрит, артрит Лайма, пролиферативный артрит, псориазический артрит, болезнь Стилла, артрит позвоночника, и ювенильный ревматоидный артрит, остеоартрит, хронический прогрессивный артрит, деформирующий артрит, хронический первичный полиартрит, реактивный артрит и анкилозирующий спондилит, системная красная волчанка (СКВ), такая как кожная СКВ или подострая кожная СКВ, неонатальный волчаночный синдром (НВС) и диссеминированная красная волчанка, рассеянный склероз, воспалительная болезнь кишечника (ВБК), которая включает язвенный колит и болезнь Крона, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), псориаз, IgA нефропатия, IgM полиневропатии, миастения гравис, сахарный диабет, синдром Рейно, и гломерулонефрит, ладонно-подошвенный пузыр (ЛПП), эрозивный плоский лишай, буллезный пемфигоид, врожденный буллезный эпидермолиз, контактный дерматит и атопический дерматит, полирадикулит, включая синдром Гийена-Барре.

В другом варианте осуществления изобретение относится к способу индукции гибели клеток или ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей CD37, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества биспецифического антитела по изобретению или анти-CD37 антитела по изобретению. В некоторых вариантах осуществления этот способ предназначен для лечения индивидуума, имеющего аллергию, отторжение трансплантата или В-клеточную неоплазию, такую как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический

лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийно-клеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДККВКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), где способ включает введение указанному индивидууму эффективного количества биспецифического антитела по изобретению или анти-CD37 антитела по изобретению. В определенных вариантах осуществления способ включает введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов в комбинации с указанным антителом или указанным биспецифическим антителом, таких как, например, доксорубин, цисплатин, блеомицин, кармустин, циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин, винкристин, флударабин, ибрутиниб или анти-CD20-антитело, такое как ритуксимаб, офатумумаб, обинутумаб, велтузумаб, окаратузумаб, окрелизумаб или TRU-015.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения дополнительный терапевтический агент выбран из группы, включающей: циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин, ифосфамид, цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, кармустин, преднизон, дексаметазон, флударабин, пентостатин, кладрибин, фторурацил, гемцитабин, цитарабин, метотрексат, пралатрексат, гемцитабин, винкристин, паклитаксел, доцетаксел, доксорубин, митоксантрон, этопозид, топотекан, иринотекан, блеомицин, CD20-специфический ритуксимаб, обинутумаб и офатумумаб, CD52-специфический алемтузумаб, CD30-специфический брентуксимаб, JNJ-63709178, JNJ-64007957, HuMax-IL8, анти-DR5, анти-VEGF, анти-CD38, анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA4, анти-CD40, анти-CD137, анти-GITR, анти-VISTA, специфические антитела для других иммуномодулирующих мишеней, брентуксимаб ведотин, HuMax-TAC-ADC, интерферон, талидомид, леналидомид, аксикабтаген силолейсел, бортезомиб, ромидепсин, белиностат, вориностат, ибрутиниб, акалабрутиниб, идедалисиб, копанлисиб, сорафениб, сунитиниб, эверолимус, рекомбинантный человеческий TRAIL, биринапант и венетоклакс.

В одном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент выбран из группы, включающей ибрутиниб, ритуксимаб, венетоклакс, СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон), бендамустин, флударабин, циклофосфамид и хлорамбуцил.

В одном варианте осуществления изобретения дополнительный терапевтический агент выбран из группы, включающей ибрутиниб, ритуксимаб и венетоклакс.

В дополнительном аспекте изобретение относится к нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей одну или несколько последовательностей, представленных в таблице 1. В дополнительном аспекте изобретение относится к нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей одну или несколько последовательностей, выбранных из

группы, включающей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6а, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13а, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20а, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 27а, 28, 29, 30, 30а и 31.

Изобретение также относится к нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей VH и/или VL область биспецифического антитела или анти-CD37 антитела по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения.

Изобретение также относится к нуклеиновокислотной конструкции, кодирующей биспецифическое антитело или анти-CD37 антитело по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения.

В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему одну или несколько нуклеиновокислотных конструкций, указанных выше. В другом варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор экспрессии, как определено выше.

Вектор экспрессии в контексте настоящего изобретения может представлять собой любой подходящий вектор, включая хромосомные, нехромосомные и синтетические нуклеиновокислотные векторы (нуклеиновокислотную последовательность, содержащую подходящий набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирус, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против CD37, содержится в векторе из депротенизированной ДНК или РНК, включая, например, элемент линейной экспрессии (как описано, например, в Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997), компактированный нуклеиновокислотный вектор (как описано, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18 или pUC 118/119, нуклеиновокислотный вектор MIDGE минимального размера (как описано, например, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или в виде векторной конструкции осажденной нуклеиновой кислоты, такой как конструкция из осажденного CaP04 (как описано, например, в WO200046147, Benvenisty) и Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978) и Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие нуклеиновокислотные векторы и их использование хорошо известны в данной области техники (см., например, US 5,589,466 и US 5,973,972).

В одном варианте осуществления вектор пригоден для экспрессии антител против CD37 в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают векторы экспрессии, такие как BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), векторы pET (Novagen, Madison WI) и тому подобное).

Вектор экспрессии может также или альтернативно представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Может быть использован любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, например, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа-фактор, алкогольоксидаза и PGH (обзор: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), и Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

Вектор экспрессии может также или альтернативно представлять собой вектор, подходящий для экспрессии в клетках млекопитающих, например, вектор, содержащий глутаминсинтетазу в качестве селектируемого маркера, такой как векторы, описанные в Bebbington (1992) *Biotechnology (NY)* 10: 169-175.

Нуклеиновая кислота и/или вектор также могут содержать нуклеиновокислотную последовательность, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направлять полипептид, такой как возникающая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в среду для культивирования клеток. Такие последовательности известны в данной области и включают лидер секреции или сигнальные пептиды.

Вектор экспрессии может содержать или быть связан с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами, облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают сильные промоторы экспрессии (например, человеческий промотор/энхансер CMV IE, а также RSV, SV40, SL3 3, MMTV и HIV LTR промоторы), эффективные поли (A) терминационные последовательности, источник репликации для плазмидного продукта в *E.coli*, ген устойчивости к антибиотику в качестве селектируемого маркера и/или удобный сайт клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты могут также содержать индуцибельный промотор, в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE.

В одном варианте осуществления экспрессирующий вектор, кодирующий антитело против CD37, может быть расположен и/или доставлен в клетку-хозяин или животное-хозяина через вирусный вектор.

Таким образом, настоящее изобретение также относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, которая продуцирует биспецифическое антитело по настоящему изобретению, такой как трансфектома.

Изобретение, кроме того, относится к антиидиотипическому антителу, которое связывается с антигенсвязывающей областью антитела или биспецифическим антителом по изобретению.

Способ *in vitro* для обнаружения присутствия человеческого антигена CD37 или клетки, экспрессирующей человеческий CD37, в образце, причем указанный способ включает:

(i) обеспечение контакта образца с биспецифическим антителом по любому из вышеуказанных вариантов осуществления или с антителом по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом или биспецифическим антителом и CD37; и

(ii) детекцию образования комплекса.

Способ *in vivo* для обнаружения присутствия человеческого антигена CD37 или клетки, экспрессирующей человеческий CD37 у субъекта, причем указанный способ включает:

(i) введение биспецифического антитела по любому из вышеуказанных вариантов осуществления или антитела по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом или биспецифическим антителом и CD37; а также

(ii) детекцию образовавшегося комплекса.

### Последовательности

Таблица 1:

SEQ ID NO:	ОБОЗНАЧЕНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	VH-004-H5L2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYDMSWVRQAPG KGLEWVSIYSSVGAYYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAREYGASSSDYIFSLWGQGLTVTVSS
2	VH-004-H5L2-CDR1	GFSLSYD
3	VH-004-H5L2-CDR2	IYSSVGA
4	VH-004-H5L2-CDR3	AREYGASSSDYIFSL
5	VL-004-H5L2	AQVLTQSPSPLASVGDRTITCQASQSVYNSQNLAWYQQKPG KAPKLLIYEASKLASGVPSRFKGGSGGTEFTLTISSLQPDFATY YCQGEFSCISADCTAFGGGKVEIK
6	VH-004-H5L2-CDR1	QSVYNSQN
	VH-004-H5L2-CDR2	EAS
7	VH-004-H5L2-CDR3	QGEFSCISADCTA
8	VH-005-H1L2	EQSVVESGGGLVQPGGSLRLSCTVSGFSLSSNAMNWVRQAPG KGLEWIGLIYASGNTDYASWAKGRFTISKSTTVYLKITSPTAE DTATYFCAREGSVWGAAFDPAWGQGLTVTVSS
9	VH-005-H1L2-CDR1	GFSLSSNA
10	VH-005-H1L2-CDR2	IYASGNT
11	VH-005-H1L2-CDR3	AREGSVWGAAFDPA
12	VL-005-H1L2	AYDMTQSPSSVSASVGDRTITCQASQSSISNWLAWYQQKPGK APKQLIYAASLASGVPSRFKGGSGGTFDLTISSLQPDFATYY CQQGYSNSNIDNTFGGGKVEIK
13	VL-005-H1L2-CDR1	QSSISNW
	VL-005-H1L2-CDR2	AAS
14	VL-005-H1L2-CDR3	QQGYSNSNIDNT

15	VH-010-H5L2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYNAMNWVRQAPG KGLEWVSIIFASGRTDYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAREGSTWGDALDPWGQGTLLTVSS
16	VH-010-H5L2-CDR1	GFSLSYNA
17	VH-010-H5L2-CDR2	IFASGRT
18	VH-010-H5L2-CDR3	AREGSTWGDALDP
19	VL-010-H5L2	AYDMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNIIDYLAWYQQKPGKA PKLLIHKASTLASGVPSRFKSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQGYSNSNIDNTFGGGTKVEIK
20	VL-010-H5L2-CDR1	QNIIDY
	VL-010-H5L2-CDR2	KAS
21	VL-010-H5L2-CDR3	QQGYSNSNIDNT
22	VH-016-H5L2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSNYMGWVRQAPG KGLEWVSVIDASGTTYATWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTATYYCARELLYFGSSYYDLWGQGTLLTVSS
23	VH-016-H5L2-CDR1	GFSLSNYN
24	VH-016-H5L2-CDR2	IDASGTT
25	VH-016-H5L2-CDR3	ARELLYFGSSYYDL
26	VL-016-H5L2	DVVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNIDSNLAWYQQKPGKA PKFLIYYASNLPGVPSRFKSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QCADVGSTYVAAFGGGKVEIK
27	VL-016-H5L2-CDR1	QNIDSN
	VL-016-H5L2-CDR2	YAS
28	VL-016-H5L2-CDR3	QCADVGSTYVAA
29	VL-016-H5L2-C90S	DVVMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNIDSNLAWYQQKPGKA PKFLIYYASNLPGVPSRFKSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QSADVGSTYVAAFGGGKVEIK
30	VL-016-H5L2-C90S- CDR1	QNIDSN
	VL-016-H5L2-C90S- CDR2	YAS
31	VL-016-H5L2-C90S- CDR3	QSADVGSTYVAA
32	VH-b12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYRFSNFVIHWVRQAPG QRFEWGMWINPYNGNKEFSKAFQDRVTFTADTSANTAYMELR SLRSADTAVYYCARVGPYSWDDSPQDNYYMDVWVGKGTIV SS
33	VH-b12-CDR1	GYRFSNFV
34	VH-b12-CDR2	INPYNGNK
35	VH-b12-CDR3	ARVGPYSWDDSPQDNYYMDV
36	VL-b12	EIVLTQSPGTLSPGERATFSCRSSHRSIRSRVAWYQHKGQAP RLVIHGVSNRASGISDRFSGSGSDFTLTIITRVEPEDFALYYCQ VYGASSYTFGQGTKLERK
37	VL-b12-CDR1	HSIRSR
	VL-b12-CDR2	GVS
38	VL-b12-CDR3	QVYGASSYT
39	VH-G28.1	AVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQNG KSLEWIGNIDPYYGGTTYNRKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKS LTSEDSAVYYCARVGPMDYWGQGTSTVSS
40	VH-G28.1-CDR1	GYSFTGYN
41	VH-G28.1-CDR2	IDPYYGGT
42	VH-G28.1-CDR3	ARVGPMDY
43	VL-G28.1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRTSENVYSYLAWYQQKQKGS PQLLVSAKTLAEGVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLQPEDSGSYFC QHSDNPWTFGGGTELEIK

44	VL-G28.1-CDR1	ENVVSY
	VL-G28.1-CDR2	FAK
45	VL-G28.1-CDR3	QHSDNPWT
46	VH-37.3	QVQVKESGPGVLVAPSQSL SITCTVSGFSLTTS GVS WVRQPPGKG LEWLGVIWGDGSTNYHSALKSRLSIK KDHSKSQVFLKLNLSLQT DDTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSA
47	VH-37.3-CDR1	GFSLTTSG
48	VH-37.3-CDR2	IWGDGST
49	VH-37.3-CDR3	AKGGYSLAH
50	VL-37.3	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIRSNLAWYQQKQGKSP QLLVN VATNLADGVP SRFSGSGSTQYSLKINSLQSEDFGTYYC QHYWGTTWTFGGGKLEIK
51	VL-37.3-CDR1	ENIRSN
	VL-37.3-CDR2	VAT
52	VL-37.3-CDR3	QHYWGTTWT
53	IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	IgG1-Fc-delK	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG <sub>2</sub>
55	IgG1-E430G-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH <u>G</u> ALHNHYTQKSLSLSPGK
56	IgG1-E345R-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPR <u>R</u> PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	IgG1-F405L-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF <u>L</u> LYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	IgG1-K409R-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP

		REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
59	IgG1-F405L-E430G-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
60	IgG1-K409R-E430G-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHGALHNHYTQKSLSLSPGK
61	Каппа-С	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVXJIIINNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLTKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
62	Человеческий CD37	MSAQESCLSLIKYFLVFVNLFFFVLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSVFV GLAFVPLQIWSKVLAIISGIFTMGIALLGCVGALKELRXJJGLYF GMLLLLFATQITLGILISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEE TAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGNNGSEAHHRVP CSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHADICAVPAES HIYREGCAQGLQKWLHNNLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCR NLDHVYNRLARYR
63	CD37 макаки-крабеода (mfCD37)	MSAQESCLSLIKYFLVFVNLFFFVLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSVFV GLAFVPLQIWSKVLAIISGVFTMGLALLGCVGALKELRXJJGLY FGMLLLLFATQITLGILISTQRAQLERSLQDIVEKTIQKYHTNPEE TAAEESWDYVQFQLRCCGWHSPQDWFQVLTLRGNNGSEAHHRVP CSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGQLARSRHSTDICAVPANS HIYREGCARSLQKWLHNNLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCR NLDHVYNRLARYR
64	CD37EC2-FcHis	MWWRLWLLLLLLLLLWPMVWARAQLERSLRDVVEKTIQKY GTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLILRGNNGS EAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHADIC AVPAESHYREGCAQGLQKWLHNNPKSCDKTHTCPPCPAPEAE GAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTAPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHH HHHHH
65	CD37mfEC2-FcHis	MWWRLWLLLLLLLLLWPMVWARAQLERSLQDIVEKTIQKYH TNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHSPQDWFQVLTLRGNNGSE AHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGQLARSRHSTDICA VPANSHYREGCARSLQKWLHNNPKSCDKTHTCPPCPAPEAEG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTAPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHH HHHHH
66	IgG1-F405L-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE

		KTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
67	IgG1-F405L-E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
68	IgG1-F405L-E430S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHSALHNHYTQKSLSLSPGK
69	IgG1-K409R-E345R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPRRPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
70	IgG1- K409R -E345K	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPRKPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
71	IgG1- K409R -E430S	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHSALHNHYTQKSLSLSPGK
72	Человеческий CD20	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRMSSLVGPTQSF FMRESKTLGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPL WGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMI LSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYINIYNCEPANPSEKNSPS TQYCYSIQSLFLGILSVMILFAFFQELVIAGIVENEWKRTCSRPKS NIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEE EETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
73	CD20 макаки- крабоседа	MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQPGPKPLLRMSSLVGPTQSF FMRESKALGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTVWYPL WGGIMYIISGSLLAATEKNSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMI LSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRVHTPYINIYNCEPANPSEKNSPS TQYCYSIQSLFLGILSVMILFAFFQELVIAGIVENEWRRTCSRPKS SVLLSAEEKKEQVIEIKEEVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEE EETETNFPEPPQDQESSPIENDSSP
74	VH CD20-7D8	EVQLVESGGGLVQPDRSLRLSCAAS <b>GFTFH</b> DYAMHWVRQAPG KGLEWVST <b>ISWNSGT</b> IGYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNS

		LRAEDTALYYC <b>AKDIQYGNYYYYGMDV</b> WGQGTTVTSS
75	VH CD20-7D8 CDR1	GFTFHDTYA
76	VH CD20-7D8 CDR2	ISWNSGTI
77	VH CD20-7D8 CDR3	AKDIQYGNYYYYGMDV
78	VL CD20-7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAP RLLIY <b>DASN</b> RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <b>Q</b> <b>QRSNWPIT</b> FGQGTTRLEIK
79	VL CD20-7D8 CDR1	QSVSSY
	VL CD20-7D8 CDR2	DAS
80	VL CD20-7D8 CDR3	QQRSNWPIT
81	VH CD20-11B8	EVQLVQSGGGLVHPGSSLRLSCTGSG <b>GFTFSY</b> HAMHWVRQAPG KGLEWVSI <b>IIGTGGVT</b> YADSVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMNSL RAEDMAVYYC <b>ARDYYGAGSFYDGLYGMDV</b> WGQGTTVTSS
82	VH CD20-11B8 CDR1	GFTFSYHA
83	VH CD20-11B8 CDR2	IIGTGGVT
84	VH CD20-11B8 CDR3	ARDYYGAGSFYDGLYGMDV
85	VL CD20-11B8 CDR1	QSVSSY
	VL CD20-11B8 CDR2	DAS
86	VL CD20-11B8 CDR3	QQRSDWPLT
87	VH CD20- офатумумаб	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS <b>CAASGFTFNDY</b> AMHWVRQAPG KGLEWVST <b>ISWNSGSI</b> GYADSVKGRFTISRDN <b>AKK</b> SLYLQMNS LRAEDTALYYC <b>AKDIQYGNYYYYGMDV</b> WGQGTTVTSS
88	VL CD20- офатумумаб CDR1	GFTFNDYA
89	VH CD20- офатумумаб CDR2	ISWNSGSI
90	VH CD20- офатумумаб CDR3	AKDIQYGNYYYYGMDV
91	VL CD20- офатумумаб	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAP RLLIY <b>DASN</b> RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC <b>Q</b> <b>QRSNWPIT</b> FGQGTTRLEIK
92	VL CD20- офатумумаб CDR1	QSVSSY
	VL CD20- офатумумаб	DAS
93	VL CD20- офатумумаб CDR3	QQRSNWPIT
94	VH CD20- ритуксимаб	QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKAS <b>GYTFTSYN</b> MHWVKQTP GRGLEWIGAI <b>IYPGNGDT</b> SYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQL SSLTSEDSAVYYC <b>ARST</b> <b>YYGGDWYFNV</b> WGAGTTVTVSA
95	VH CD20- ритуксимаб CDR1	GYTFTSYN
96	VH CD20- ритуксимаб CDR2	IYPGNGDT
97	VH CD20- ритуксимаб CDR3	ARSTYYGGDWYFNV
98	VL CD20- ритуксимаб	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASS <b>SVSY</b> IHWVFQQKPGSSPKP WIY <b>ATSN</b> LASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC <b>QQ</b>

		<b>WTSNPPT</b> FGGGTKLEIK
99	VL CD20- ритуксимаб CDR1	SSVSY
	VL CD20- ритуксимаб CDR2	ATS
100	VL CD20- ритуксимаб CDR3	QQWTSNPPT
101	VH CD20- обинутузумаб	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS <b>GYAFSYSW</b> INWVRQAPG QGLEWMGR <b>IFPGDGD</b> TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYC <b>ARNVFDGYWLVY</b> WGQGLTVTVSS
102	VH CD20- обинутузумаб CDR1	GYAFSYSW
103	VH CD20- обинутузумаб CDR2	IFPGDGD
104	VH CD20- обинутузумаб CDR3	ARNVFDGYWLVY
105	VL CD20- обинутузумаб	DIVMTQTPLSLPVTPEPASISCRSS <b>KSLLSHNGITY</b> LYWYLQK PGQSPQLLIY <b>QMS</b> NLVSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCA <b>AQNLELPY</b> TFGGGTKVEIK
106	VL CD20- обинутузумаб CDR1	KSLLSHNGITY
	VL CD20- обинутузумаб CDR2	QMS
107	VL CD20- обинутузумаб CDR3	AQNLELPYT
108	IgG1- S239D-I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPAE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVDFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
109	VL CD20 11B8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <b>QSVSSY</b> LAWYQQKPGQAP RLLIY <b>DAS</b> NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC <b>Q</b> <b>QRSDWPL</b> TFGGGTKVEIK
110	VH CD37-004	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSTYDMSWVRQAPGKG LEWIGIYSSVGAYYASWAKGRFTFSKTSTTVDLKITSPTTEDTA TYFCAREYGASSSDYIFSLWGQGLTVTVSS
2	VH CD37-004 CDR1	GFSLSTYD
3	VH CD37-004 CDR2	IYSSVGA
4	VH CD37-004 CDR3	AREYGASSSDYIFSL
111	VL CD37-004	AQVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASQSVYNSQNLAWYQQKP GQPPKLLIYEASKLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQSDDAAT YYCQGEFSCISADCTAFGGGTEVVVK
6	VL CD37-004 CDR1	QSVYNSQN
	VL CD37-004 CDR2	EAS
7	VL CD37-004 CDR3	QGEFSCISADCTA
112	VH CD37-005	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSNAMNWVRQAPGKG LEWIGLIYASGNTDYASWAKGRFTISKSTTVDLKITSPTTEDTA TYFCAREGSVWGAAFDPWGPGTLTVTVSS
9	VH CD37-005 CDR1	GFSLSSNA
10	VH CD37-005 CDR2	IYASGNT
11	VH CD37-005 CDR3	AREGSVWGAAFDP
113	VL CD37-005	AYDMTQTPASVEVAVGGTVTIKCQASQSSISNWLAWYQQKPGQ PPKQLIYAASLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVESADAATYY CQQGYSNSNIDNTFGGGTEVVVK

13	VL CD37-005 CDR1	QSSISNW
	VL CD37-005 CDR2	AAS
14	VL CD37-005 CDR3	QQGYSNSNIDNT
114	VH CD37-010	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSYNAMNWVRQAPGKG LEWIGIIFASGRTDYASWAKGRFTISKTSSTVELKITSPTTEDTAT YFCAREGSTWGDALDPWGPGLTVVSS
16	VH CD37-010 CDR1	GFSLSYNA
17	VH CD37-010 CDR2	IFASGRT
18	VH CD37-010 CDR3	AREGSTWGDALDP
115	VL CD37-010	AYDMTQTPSSVEAAVGGTVTIKCQASQNIIDYLAWYQQKPGQP PQLLIHKASTLASGVPSRFKGSQSGTQFTLTISGVQSDDAATYY CQQGYSNSNIDNTFGGGTEVVVK
20	VL CD37-010 CDR1	QNIIDY
	VL CD37-010 CDR2	KAS
21	VL CD37-010 CDR3	QQGYSNSNIDNT
116	VH CD37-016	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSNYMGWVRQAPGKG LEWIGVIDASGTTYATWAKGRFTCSKTSSTVELKMTSLTTED TATYFCARELLYFGSSYYDLWGQGLTVVSS
23	VH CD37-016 CDR1	GFSLSNYN
24	VH CD37-016 CDR2	IDASGTT
25	VH CD37-016 CDR3	ARELLYFGSSYYDL
117	VL CD37-016	DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQNIDSNLAWYQQKPGQP PKFLIYYASNLPFGVSSRFKGSQSGTQFTLTISDLESADAATYYC QCADVGSTYVAAFSGGGTEVVVK
27	VL CD37-016 CDR1	QNIDSN
	VL CD37-016 CDR2	YAS
28	VL CD37-016 CDR3	QCADVGSTYVAA

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1. Получение специфичных к CD37 антител у кроликов.

#### Экспрессионные конструкции для CD37

Были получены следующие кодон-оптимизированные конструкции для экспрессии полноразмерных вариантов CD37: человеческий (*Homo sapiens*) CD37 (инвентарный номер Genbank NP\_001765) (SEQ ID NO: 62), CD37 макаки-крабоеда (*Macaca flavicularis*) ((mfCD37) (SEQ ID NO: 63). Кроме того, были получены следующие кодон-оптимизированные конструкции для экспрессии различных вариантов ECD CD37: последовательность, кодирующая сигнальный пептид, за которой следует второй внеклеточный домен (EC2) человеческого CD37 (aa 112-241), слитый с Fc (CH2-CH3) доменом человеческого IgG с C-концевой Гис-меткой (CD37EC2-FcHis, SEQ ID NO: 64) и аналогичной конструкцией для mfCD37 (CD37mfEC2-FcHis, SEQ ID NO: 65). Конструкции содержали подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальную последовательность Козака (GCCGCCACC) [Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208]. Конструкции были клонированы в векторе экспрессии млекопитающих pcDNA3.3 (Invitrogen) или эквивалентном векторе.

### Временная экспрессия в клетках CHO и НЕК

Мембранные белки временно трансфицировали в клетках Freestyle 293-F (НЕК293F) (Life technologies, США) с использованием 293fectin (Life technologies), по существу, как описано производителем, или в клетках Freestyle CHO-S (CHO) (Life technologies) с использованием реагента Freestyle Max (Life technologies), по сути, как описано производителем. Растворимые белки временно экспрессировали в клетках Expi293 (Life technologies) с использованием реагента ExpiFectamine 293 (Life technologies), по существу, как описано производителем.

Слитые белки Fc (CD37mfEC2-FcHis и CD37EC2-FcHis) выделяли из надосадочной жидкости клеточной культуры с использованием аффинной хроматографии с белком А.

### Иммунизация кроликов

Иммунизацию кроликов проводили в MAB Discovery GmbH (Нойрид, Германия). Кроликов многократно иммунизировали смесью CD37EC2-FcHis и CD37mfEC2-FcHis или НЕК293F клеток, временно экспрессирующих человеческий CD37 или mfCD37. Кровь этих животных собирали, и выделяли В-лимфоциты. Используя запатентованный способ MAB Discovery, отдельные В-клетки сортировали в лунки планшетов для микротитрования и затем размножали. Надосадочную жидкость от этих отдельных В-клеток анализировали на специфическое связывание с клетками CHO-S, временно экспрессирующими CD37 (CHO-CD37) и mfCD37 (CHO-mfCD37).

### Производство рекомбинантных антител

После анализа результатов первичного скрининга первичные совпадения отбирали для секвенирования, получения и очистки рекомбинантных мАт. Области, кодирующие уникальную переменную тяжелую цепь (VH) и легкую цепь (VL), были генетически синтезированы и клонированы в векторы экспрессии млекопитающих, содержащие последовательности, кодирующие константную область человеческого IgG1 (цепь Каппа Ig и аллотип G1m (f) IgG1, содержащие тяжелую цепь с мутацией E430G (нумерация EU). Во время этого процесса нежелательный непарный цистеин в некоторых легких цепях антител был заменен серином.

Рекомбинантные химерные антитела были получены в клетках НЕК 293 путем временной котрансфекции векторов экспрессии, кодирующих тяжелую цепь (HC) и легкую цепь (LC), с использованием автоматизированной процедуры на платформе Tescan Freedom Evo. Иммуноглобулины очищали из надосадочной жидкости клеток, используя аффинную очистку (белок А) в системе ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000.

Реакционную способность полученных химерных (VH кролика, Fc человека) моноклональных антител (мАт), содержащих мутацию E430G, повторно анализировали на

связывание с клетками CHO-CD37 или CHO-mfCD37. Кроме того, было проанализировано связывание с клеточной линией лимфомы Дауди человека и функциональность в анализе CDC на клетках Дауди.

## **Пример 2: Гуманизация химерных антител кролика**

### Генерация последовательностей гуманизированных антител

Последовательности гуманизированных антител из кроличьих антител против CD37-004, -005, -010 и -016 были получены в Antitope (Кембридж, Великобритания). Последовательности гуманизированных антител были получены с использованием технологии гуманизации зародышевой линии (CDR-прививка). Гуманизированные гены V-области были сконструированы на основе последовательностей зародышевой линии человека, наиболее близких к аминокислотным последовательностям VH и V<sub>κ</sub> антител кролика и мыши. Для каждого из антител кролика конструировали серию от четырех до шести генов VH и четырех или пяти генов V<sub>κ</sub> (VL) гуманизированной V-области зародышевой линии.

Структурные модели V-областей антитела кролика были получены с использованием Swiss PDB и проанализированы с целью идентификации аминокислот в каркасах V-области, которые могут быть важны для свойств связывания антитела. Эти аминокислоты были отмечены для включения в одно или несколько вариантов CDR-привитых антител.

Аминокислотную последовательность V-области тяжелой и легкой цепей сравнивали с базой данных последовательностей V и J сегментов зародышевой линии человека, чтобы идентифицировать человеческие последовательности тяжелой и легкой цепей с наибольшей степенью гомологии для использования в качестве каркасов переменных доменов человека. Последовательности зародышевой линии, используемые в качестве основы для гуманизированных конструкций, показаны в Таблице 2.

Таблица 2: Наиболее близкие последовательности V-сегмента и J-сегмента зародышевой линии человека.

Анти-CD37 кролика	Тяжелая цепь		Легкая цепь (κ)	
	Сегмент зародышевой линии V-области человека	Сегмент зародышевой линии J-области человека	Сегмент зародышевой линии V-области человека	Сегмент зародышевой линии J-области человека
004	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-5*01	IGKJ4
005	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-12*01	IGKJ4
010	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-5*03	IGKJ4
016	IGHV3-53*04	IGHJ4	IGKV1-12*01	IGKJ4

Затем был сконструирован ряд гуманизированных V-областей тяжелой и легкой

цепи путем прививки CDR на каркасы и, при необходимости, путем обратной мутации остатков, которые могут быть критическими для свойств связывания антител, как определено при структурном моделировании, с остатками кролика. Вариантные последовательности с наименьшей частотой возникновения потенциальных Т-клеточных эпитопов были затем выбраны с использованием запатентованных технологий *in silico* Antitope, iTope™ и TCED™ (База данных Т-клеточных эпитопов) (Perry, L.C.A., Jones, T.D. и Baker, M.P. «New Approaches to Prediction of Immune Responses to Therapeutic Proteins during Preclinical Development» (2008). *Drugs in R&D* 9 (6): 385-396; Bryson, C.J., Jones, T.D. and Baker, M.P. *Prediction of Immunogenicity of Therapeutic Proteins* (2010). *Biodrugs* 24(1):1-8). Наконец, нуклеотидные последовательности сконструированных вариантов были оптимизированы по кодонам.

Для антитела IgG1-016-H5L2 был создан вариант с точечной мутацией в варибельном домене для замены свободного цистеина: IgG1-016-H5L2-LC90S (также с дополнительными мутациями F405L и E430G). Этот мутант был создан путем синтеза генов (Geneart).

Последовательности варибельной области гуманизированных антител против CD37 показаны в Перечне последовательностей в настоящей заявке и в Таблице 1 выше.

### **Пример 3: Получение биспецифических антител**

Биспецифические антитела IgG1 генерировали путем обмена Fab-плечей в контролируемых восстанавливающих условиях. Основой этого способа является использование комплементарных СН3 доменов, которые способствуют образованию гетеродимеров в специфических условиях анализа, как описано в WO 2011/131746. Мутации F405L и K409R (нумерация EU) были введены в CD37 антитела для создания пар антител с комплементарными СН3 доменами. Мутации F405L и K409R в некоторых случаях сочетались с мутацией E430G.

Для получения биспецифических антител два исходных комплементарных антитела, каждое в конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубировали с 75 мМ 2-меркаптоэтиламин-HCl (2-МЕА) в общем объеме 100 мкл ТЕ при 31°C в течение 5 часов. Реакцию восстановления оспин-колонок центрифуг (центрифужные фильтры Micropore, 30k, Millipore) в соответствии с протоколом производителя.

### **Пример 4: Экспрессионные конструкции для антител, временная экспрессия и очистка.**

Для экспрессии антител последовательности VH и VL клонировали в векторах экспрессии (pcDNA3.3), содержащих в случае VH соответствующую константную тяжелую цепь (HC), в некоторых случаях содержащую мутацию F405L или K409R и/или

мутацию E345R или E430G, а в случае VL области легкой цепи (LC).

Антитела экспрессировали как смеси IgG1,κ. Смеси плазмидной ДНК, кодирующие тяжелые и легкие цепи антител, временно трансфицировали в клетках Expi293F (Life technologies, США) с использованием 293fectin (Life technologies), по существу, как описано Vink et al. (Vink et al., Methods, 65 (1), 5-10 2014). Затем антитела очищали хроматографией с иммобилизованным белком G.

Следующие антитела были использованы в примерах:

Антитела IgG1 дикого типа:

IgG1-004-H5L2 (с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 5)

IgG1-005-H1L2 (с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 12)

IgG1-010-H5L2 (с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19)

IgG1-016-H5L2 (с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 26)

IgG1-G28.1 (с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 43 - на основе SEQ ID NO: 1 и 3 в EP2241577)

IgG1-G28.1-K409R-delK (также содержит C-концевую мутацию тяжелой цепи 445-PG-446)

IgG1-37.3 (с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 50 - на основе SEQ ID NO: 55 и 72 в WO2011/112978)

IgG1-b12 ((с последовательностями VH и VL, указанными в SEQ ID NO: 32 и SEQ ID NO: 36 - на основе gp120-специфического антитела b12 [Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5; 230 (3): 812-23])

Антитела IgG1 с мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc:

IgG1-004-H5L2-E430G

IgG1-005-H1L2-E430G

IgG1-010-H5L2-E430G

IgG1-016-H5L2-E430G

IgG1-G28.1-E430G

IgG1-37.3-E430G

IgG1-b12-E430G

IgG1-005-H1L2-K409R-E430G

IgG1-010-H5L2-K409R-E430G

IgG1-016-H5L2-F405L-E430G

IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G

IgG1-004-E430G

IgG1-005-E430G

IgG1-010-E430G

IgG1-016-E430G

IgG1 антитела с мутацией E430S, усиливающей Fc-Fc взаимодействие:

IgG1-010-H5L2-K409R-E430S

IgG1-016-H5L2-F405L-E430S

IgG1 антитела с мутацией E345K, усиливающей Fc-Fc взаимодействие:

IgG1-010-H5L2-K409R-E345K

IgG1-016-H5L2-F405L-E345K

IgG1 антитела с мутацией E345R, усиливающей Fc-Fc взаимодействие:

IgG1-G28.1-E345R

IgG1-b12-E345R

IgG1-010-H5L2-K409R-E345R

IgG1-016-H5L2-F405L-E345R

Биспецифические антитела

bsIgG1-016-H5L2-F405LxIgG1-IgG1-005-H1L2-K409R

bsIgG1-016-H5L2-F405LxIgG1-010-H5L2-K409R

Биспецифические антитела с мутацией E430G, усиливающей Fc-Fc взаимодействие:

bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G

bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G

bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G

bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G

bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G

IgG1 антитело с мутацией S239D-I332E, усиливающей FcγR-взаимодействие:

IgG1-G28.1-S239D-I332E

**Пример 5. Введение мутации, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, в антитела к CD37 приводит к усилению способности de novo индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).**

Определение комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC)

В первом эксперименте опухолевые клетки, выделенные от не получавшего лечение пациента с ХЛЛ (AllCells, Калифорния, США), ресуспендировали в среде RPMI,

содержащей 0,2% БСА (бычьего сывороточного альбумина), и высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, Кат. №650101) при плотности  $0,2 \times 10^5$  клеток/лунку (40 мкл/лунку) и 40 мкл серии концентраций IgG1-G28.1-K409R-delK, IgG1-G28.1-E345R или IgG1-b12-E345R (конечная концентрация антител 0,003-10 мкг/мл). IgG1-b12-E345R (на основе специфического к gp120 антитела b12 [Barbas, CF. J Mol Biol. 1993 Apr 5;230(3):812-23]) использовали в качестве отрицательного контроля. Для IgG1-G28.1-K409R-delK следует отметить, что мутация K409R не влияет на способность к связыванию или к индукции CDC. Аналогично, мутация delK (445-PG-446), которая была введена в антитело для облегчения биохимического анализа, не влияла на связывание мишени или способность к индукции CDC (см. ниже).

После инкубации (комнатная температура, 10 минут при встряхивании) в каждую лунку добавляли 20 мкл объединенной нормальной человеческой сыворотки (NHS Кат. № M0008 Sanquin, Амстердам, Нидерланды), и планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Реакцию останавливали охлаждением планшетов на льду. Затем добавляли пропидиум йодид (PI; 10 мкл раствора 10 мкг/мл; Sigma-Aldrich Chemie BV, Звейндрахт, Нидерланды) и лизис определяли путем измерения процентного содержания мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II; BD Biosciences). Графики были получены с использованием оптимальных значений нелинейного подбора доза-эффект с логарифмически измененными концентрациями в программном обеспечении GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

Во втором эксперименте опухолевые клетки от другого не получавшего лечение пациента с ХЛЛ (AllCells, Калифорния, США) ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 0,2% БСА, высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, Кат. №650101) с плотностью  $0,5 \times 10^5$  клеток/лунку (30 мкл/лунку) и добавляли 50 мкл серии концентраций IgG1-G28.1, IgG1-G28.1-E430G или IgG1-b12 (конечная концентрация антител 0,003-10 мкг/мл) в 3.33x серийных разведениях). После инкубации (комнатная температура, 15 мин) в каждую лунку добавляли 20 мкл объединенной нормальной человеческой сыворотки (NHS, Кат. № M0008 Sanquin, Амстердам, Нидерланды), и планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Реакцию останавливали охлаждением планшетов на льду. Затем добавляли пропидиум йодид (PI; 20 мкл раствора 10 мкг/мл; Sigma-Aldrich Chemie BV, Звейндрахт, Нидерланды), и лизис определяли путем измерения процентного содержания мертвых клеток (соответствующих PI-положительным клеткам) с помощью проточной цитометрии

(FACS Canto II; BD Biosciences). Графики были получены с использованием оптимальных значений нелинейного подбора доза-эффект с логарифмически измененными концентрациями в программном обеспечении GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

Фигуры 1А и 1В показывают, что антитело против CD37 G28.1 без мутации E345R или E430G, усиливающей Fc-Fc-взаимодействие (IgG1-G28.1 или IgG1-G28.1-K409R-delK), не индуцировало CDC на первичных опухолевых клетках от пациентов с ХЛЛ, тогда как G28.1 с мутациями E345R или E430G, усиливающими взаимодействие Fc-Fc (IgG1-G28.1-E345R или IgG1-G28.1-E430G), индуцировало глубокую дозозависимую CDC первичных ХЛЛ клеток.

Количественное определение антигенов клеточной поверхности методом проточной цитометрии (Qifl)

Уровни экспрессии CD37 и мембранных регуляторных белков комплемента (mCRP; CD46, CD55 и CD59) на опухолевых клетках ХЛЛ определяли с использованием набора для калибровки человеческого IgG (Bioscytix, Кат. №CP010). Вкратце, опухолевые клетки, полученные от пациента с ХЛЛ (как в первом эксперименте, описанном выше), ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 0,2% БСА, высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, Кат. № 650101) с плотностью  $0,5 \times 10^5$  клеток/лунку (30 мкл/лунку), центрифугировали и добавляли 50 мкл CD37 (Abcam, кат. №76522) или контрольного мышинового антитела (очищенный мышинный IgG1,к, контроль изотипа, клон МОРС-21, ВД кат. №555746). После инкубации (4°C, 30 мин) в отдельные лунки добавляли 50 мкл калибровочных гранул. После двухкратного промывания гранул и клеток (150 мкл буфера FACS, центрифугирования в течение 3 минут при 300 g при 4°C между этапами промывания), добавляли разведение 50 мкл/лунку вторичного антитела (FITC-конъюгированного), как предусмотрено в наборе калибратора человеческого IgG. После инкубации в темноте (4°C, 45 мин) клетки дважды промывали буфером FACS, и клетки ресуспендировали в 35 мкл буфера FACS и анализировали проточной цитометрией (скринер Intellicyt iQue™). Количество антигена определяли путем расчета способности связывания антител на основе калибровочной кривой в соответствии с рекомендациями производителя.

На Фиг.2 показано, что отмечалась высокая экспрессия CD37 на первичных опухолевых клетках от этого пациента с ХЛЛ. Пациент показал нормальные уровни экспрессии mCRP.

**Пример 6: Связывание CD37-антител и их вариантов с поверхностью клетки, экспрессирующей CD37.**

Связывание с поверхностью клеток, экспрессирующих CD37 (клетки Дауди, клетки СНО, экспрессирующие CD37 макаки-крабоеда), определяли проточной цитометрией. Клетки, ресуспендированные в RPMI, содержащей 0,2% БСА, высевали при 100 000 клеток/лунку в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one Кат. №650101) и центрифугировали в течение 3 минут при 300 g, 4°C. Добавляли серийные разведения (конечная концентрация антител 0,003-10 мкг/мл в серийных разведениях 3.33) CD37 или контрольных антител, и клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C. Планшеты дважды промывали/центрифугировали, используя буфер FACS (ФБР/ 0,1% БСА/ 0,01% азид натрия). Затем клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C с козьим антителом к IgG F(ab')<sub>2</sub> человека, конъюгированным с R-фикоэритрином (PE), (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Уэст-Гроув, Пенсильвания; кат. №: 109-116-098), разбавленным 1/100 в ФБР/0,1% БСА/0,01% азида натрия. Клетки дважды промывали/центрифугировали с использованием буфера FACS, ресуспендировали в 30 мкл буфера FACS и анализировали путем определения средней интенсивности флуоресценции с использованием скринера Intellicyt iQue™ (Вестбург). Кривые связывания были получены с использованием анализа нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая доза-ответ с переменным угловым коэффициентом) в программном обеспечении GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

#### Связывание с клетками Дауди

На Фиг.3 показано, что гуманизированные антитела против CD37 IgG1-004-H5L2, IgG1-005-H1L2, IgG1-010-H5L2 и IgG1-016-H5L2 демонстрировали дозозависимое связывание с клетками Дауди. Введение мутации E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, а для IgG1-005-H1L2 также мутации K409R в эти антитела не влияло на связывание.

На Фиг.4 показано, что введение мутации E430G в IgG1-G28.1 или IgG1-37.3 не влияло на связывание с клетками Дауди.

Для антитела IgG1-016-H5L2 был создан вариант с точечной мутацией в переменном домене для замены свободного цистеина в легкой цепи: IgG1-016-H5L2-LC90S. Этот вариант был также создан с дополнительными мутациями F405L и E430G, которые, как было показано ранее, не влияют на характеристики связывания с мишенью. На Фиг.5 показано, что IgG1-016-H5L2, IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G и IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G продемонстрировали сопоставимое связывание с клетками Дауди, таким образом, что мутация LC90S не влияла на связывание.

### Связывание с СНО клетками, экспрессирующими CD37 макаки-крабоведа

Связывание с клетками СНО, экспрессирующими CD37 макаки-крабоведа, определяли проточной цитометрией, используя метод, описанный выше. На Фиг.6 показано, что IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G продемонстрировали дозозависимое связывание с клетками СНО, экспрессирующими CD37 макаки-крабоведа. IgG1-G28.1 и IgG1-28.1-E430G не связывались с клетками СНО, экспрессирующими CD37 макаки-крабоведа.

**Пример 7: Идентификация антител к CD37, которые не конкурируют за связывание с CD37.**

Конкуренция за связывание (её отсутствие) - определяемая с помощью проточной цитометрии

Антитела к CD37 маркировали с помощью Alexa Fluor 488 NHS Ester (сукцинимидилового эфира). 1 мг антитела к CD37 (растворенного в ФБР) переносили в 1 мл микроцентрифужный флакон (реакционный флакон). Значение pH повышали путем добавления 10% объема 1 М натрий-бикарбонатного буфера (pH 9). Непосредственно перед использованием 1 мг сложного эфира Alexa Fluor 488 NHS (доведенного до комнатной температуры) растворяли в 100 мкл ДМСО. Реакцию мечения инициировали добавлением 10 мкл свежего раствора красителя Alexa на мг антитела. Реакционные пробирки закрывали крышками и осторожно перемешивали путем переворачивания. После 1 часа инкубации при комнатной температуре реакцию гасили добавлением 50 мкл 1М Трис в каждую реакционную пробирку. Непрореагировавший краситель удаляли из антитела, меченного Alexa, гель-фильтрацией с использованием колонок BioRad PDP10, уравновешенных боратным соевым буфером, в соответствии с указаниями производителя. Alexa-меченные антитела хранили при 4°C и защищали от света.

Конкуренцию связывания между различными антителами к CD37 определяли проточной цитометрией. Клетки Raji (ATCC, CCL-86) ресуспендировали в среде Raji (RPMI 1640, 10% ЭТС, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мМ HEPES и 1 мМ пирувата) в концентрации  $1 \times 10^7$  клеток/мл. Затем аликвоты по 30 мкл суспензии клеток переносили в пробирки FACS вместе с аликвотами по 30 мкл (конечная концентрация 40 мкг/мл) растворов немеченых антител. Смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин при легком встряхивании. Затем готовили разведения антител, меченных A488, и после инкубации 10 мкл меченых антител (конечная концентрация антител 4 мкг/мл) переносили в пробирки FACS, содержащие немеченые антитела и клетки. Смесь инкубировали при 37°C в течение 15 мин при легком встряхивании. После инкубации образцы гасили путем добавления 4 мл охлажденного на льду ФБР, центрифугировали в

течение 3 минут при 4°C при 2000 об./мин, дважды удаляли аспирацией надосадочную жидкость и затем ресуспендировали в 125 мкл ФБР. Конкуренцию связывания анализировали путем определения средней интенсивности флуоресценции с использованием BD FACSCalibur (BD Biosciences). Интенсивности флуоресценции были преобразованы в молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома (MESF) для количественного определения.

Фигуры 7А и 8 показывают, что предварительная инкубация клеток Raji с IgG1-005-H1L2-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G блокировала последующее связывание IgG1-005-H1L2-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G, но не IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G.

Предварительная инкубация клеток Raji с IgG1-004-H5L2-E430G существенно снижала последующее связывание IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G, но не IgG1-005-H1L2-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G.

Предварительная инкубация клеток Raji с IgG1-016-H5L2-E430G блокировала последующее связывание IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G, но не IgG1-005-H1L2-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G.

Предварительная инкубация клеток с IgG1-37.3-E430G блокировала последующее связывание всех тестируемых антител. Однако, как обсуждалось выше, предварительная инкубация с IgG1-005-H1L2-E430G или IgG1-010-H5L2-E430G не блокировала связывание IgG1-37.3-E430G.

Предварительная инкубация клеток с IgG1-G28.1-E430G блокировала последующее связывание IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G, но не IgG1-005-H1L2-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G.

Конкуренция связывания (её отсутствие) - определение функциональным скринингом с использованием анализа CDC

Чтобы определить, демонстрируют ли не осуществляющие перекрестное блокирование антитела CD37 усиленную CDC при их объединении, и чтобы подтвердить возможность функционального объединения не-перекрестно-блокирующих антител против CD37, был проведен анализ CDC с использованием индивидуальных антител против CD37 и их комбинаций.

Клетки Raji, ресуспендированные в RPMI, содержащей 0,2% БСА, высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, кат. №650101) при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунку (30 мкл/лунку), и добавляли 50 мкл гуманизированного антитела против CD37, его вариантов, их комбинаций или контрольного антитела IgG1-b12 (конечная концентрация антител 10 мкг/мл, комбинации 5 + 5 мкг/мл). После

инкубации (комнатная температура, 15 минут, при встряхивании) в каждую лунку добавляли 20 мкл объединенной нормальной человеческой сыворотки (NHS, кат. № M0008 Sanquin, Амстердам, Нидерланды), и планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Планшеты центрифугировали (3 минуты, 1200 об./мин) и удаляли надосадочную жидкость. Добавляли пропидиум йодид (PI; 30 мкл раствора 1,67 мкг/мл; Sigma-Aldrich Chemie BV, Звейндрахт, Нидерланды), и лизис определяли путем измерения процентного содержания мертвых клеток (соответствующих PI-позитивных клеток) проточной цитометрией (скринер Intellicyt iQue™, Вестбург). Данные анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (программное обеспечение Graphpad, Сан-Диего, Калифорния, США).

Фигуры 7B и 7C показывают, что комбинация IgG1-004-H5L2 плюс IgG1-010-H5L2 (с мутацией E430G или без нее) и комбинация IgG1-005-H1L2 плюс IgG1-016-H5L2 (с мутацией E430G или без нее) индуцируют усиление CDC, по сравнению с их индивидуальными аналогами. Комбинация IgG1-004-H5L2 плюс IgG1-016-H5L2 (с мутацией E430G или без нее) не индуцировала усиление CDC по сравнению с их индивидуальными аналогами.

На фигурах 7D и E показано, что комбинация IgG1-004-H5L2 плюс IgG1-005-H1L2 (с мутацией E430G или без нее) и комбинация IgG1-010-H5L2 плюс IgG1-016-H5L2 (с мутацией E430G или без нее) усиливают CDC по сравнению с их индивидуальными аналогами. Комбинация IgG1-005-H1L2 плюс IgG1-010-H5L2 (с мутацией E430G или без нее) не индуцировала усиление CDC по сравнению с их индивидуальными аналогами.

Фигуры 7F и G показывают, что комбинация IgG1-37.3 плюс IgG1-005-H1L2 (с мутацией E430G или без нее) и комбинация IgG1-37.3 плюс IgG1-010-H5L2 (с мутацией E430G или без нее) индуцировали усиление CDC по сравнению с их индивидуальными аналогами.

Таким образом, исследования функциональной комбинации подтвердили результаты исследований конкуренции связывания для описанных антител против CD37 и показали, что не-перекрестно-блокирующие антитела против CD37 можно функционально комбинировать.

**Пример 8. Введение мутации, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, в гуманизированные антитела против CD37 приводит к повышенной способности *de novo* индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).**

Клетки Дауди, ресуспендированные в RPMI, содержащей 0,2% БСА, высевали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one, кат. №650101) при плотности  $1 \times 10^5$  клеток/лунку (30 мкл/лунку), и добавляли 50 мкл серии

концентраций гуманизированных антител против CD37 и их вариантов или контрольного антитела IgG1-b12 (конечная концентрация антител 0,003-10 мкг/мл в серийных разведениях 3.33x). После инкубации (комнатная температура, 15 мин) в каждую лунку добавляли 20 мкл объединенной нормальной человеческой сыворотки (NHS, кат. № M0008 Sanquin, Амстердам, Нидерланды), и планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Планшеты центрифугировали (3 минуты, 1200 об./мин) и удаляли надосадочную жидкость. Добавляли пропидиум йодид (PI; 30 мкл раствора 1,67 мкг/мл; Sigma-Aldrich Chemie BV, Звейндрахт, Нидерланды) и лизис определяли путем измерения процентного содержания мертвых клеток (соответствующих PI-позитивных клеток) проточной цитометрией (скринер Intellicyt iQue™, Вестбург). Графики были получены с использованием оптимальных значений нелинейного подбора доза-эффект с логарифмически измененными концентрациями в программном обеспечении GraphPad Prism V6.04 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На Фиг.9 показано, что IgG1-004-H5L2, IgG1-005-H1L2, IgG1-010-H5L2 и IgG1-016-H5L2 не индуцировали CDC в клетках Дауди. После введения мутации E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, эти антитела (IgG1-004-H5L2-E430G, IgG1-005-H1L2-E430G, IgG1-010-H5L2-E430G и IgG1-016-H5L2-E430G) индуцировали выраженную дозо-зависимую CDC клеток Дауди.

На Фиг.10А показано, что IgG1-G28.1 и IgG1-37.3 не индуцировали CDC на клетках Дауди. После введения мутации E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, эти антитела (IgG1-G28.1-E430G и IgG1-37.3-E430G) индуцировали выраженную дозозависимую CDC клеток Дауди.

Для антитела IgG1-016-H5L2 был создан вариант с точечной мутацией в переменном домене для замены свободного цистеина в легкой цепи: IgG1-016-H5L2-LC90S. Кроме того, этот вариант также генерировали с мутацией F405L (ранее было показано, что она не влияет на связывание мишени или CDC) и мутацией E430G, усиливающей взаимодействие Fc-Fc. На фигуре 11 показано, что IgG1-016-H5L2-E430G, IgG1-016-H5L2-F405L-E430G и IgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430G продемонстрировали сопоставимую активность в анализе CDC *in vitro*, таким образом, мутация LC90S не влияет на способность к индукции CDC. IgG1-016-H5L2 не индуцировало CDC на клетках Дауди.

Кроме того, введение других мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc, E345K, E345R, E430S и RRGY, в IgG1-010-H5L2 и IgG1-016-H5L2 привело к выраженной CDC клеток Дауди. На фигурах 10B и 10C показано, что максимальный лизис клеток Дауди был сопоставим для всех протестированных мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-

Fc.

**Пример 9: Биспецифические антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, более эффективны в индукции CDC, чем моноспецифичные двухвалентные антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, благодаря одновалентному связыванию и двойному нацеливанию на эпитоп.**

Мутации F405L или K409R были введены в гуманизированные антитела против CD37, содержащие мутацию E430G, для создания биспецифических антител (bsIgG1) с двумя CD37-специфическими Fab-плечами, которые не конкурируют за связывание с CD37. Способность биспецифических CD37-антител, содержащих мутацию E430G, индуцировать CDC определяли, как описано выше, и сравнивали со способностью моноспецифических двухвалентных антител против CD37, содержащих мутацию E430G, комбинации двух моноспецифических двухвалентных антител против CD37, содержащих мутацию E430G, которые не конкурируют за связывание с CD37 (конечная концентрация объединенных антител вместе идентична концентрации отдельных биспецифических антител), одновалентных антител против CD37, содержащих мутацию E430G (то есть биспецифических антител, содержащих одно CD37-специфическое Fab-плечо и одно не связывающее Fab-плечо, полученных из IgG1-b12 и содержащих мутацию E430G) или комбинации двух одновалентных антител против CD37, содержащих мутацию E430G, которые не конкурируют за связывание с CD37.

#### CDC на клетках Дауди

На фигуре 12А показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G более эффективно, чем IgG1-005-H1L2-E430G или IgG1-016-H5L2-E430G, при индукции CDC на клетках Дауди. Биспецифическое bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G было также более сильным, чем комбинация IgG1-005-H1L2-K409R-E430G плюс IgG1-016-H5L2-F405L-E405L. Одновалентные CD37-связывающие антитела bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G также индуцировали CDC на клетках Дауди, но менее эффективно, чем bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G.

На фигуре 12В показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G сильнее индуцировало CDC на клетках Дауди, чем IgG1-010-H5L2-E430G или IgG1-016-H5L2-E430G. Биспецифическое bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G также был более активно, чем комбинация IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G. Одновалентные связывающие антитела bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-

K409R-E430G также индуцируют CDC на клетках Дауди, при этом bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G является менее активным, а bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G является одинаково активным, по сравнению с bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx014-HGL2.

Способность индуцировать CDC для биспецифических антител против CD37, содержащих мутацию E430G, также сравнивали с способностью биспецифических антител против CD37 без мутации E430G. На фигуре 13 показано, что bsIgG1-016-H5L2-F405Lx005-H1L2-K409R, а также bsIgG1-016-H5L2-F405Lx010-H5L2-K409R были способны индуцировать CDC на клетках Дауди, но были менее активными, по сравнению с их аналогами, содержащими E430G, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

#### CDC на клетках OCI-Ly-7

На фигуре 12С показано, что одновалентные связывающие антитела bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G были более эффективными в отношении индукции CDC на клетках OCI-Ly-7 по сравнению с их моноспецифическими двухвалентными связывающими аналогами, IgG1-016-H5L2-E430G и IgG1-010-H5L2-E430G. Комбинация одновалентных связывающих антител (bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G плюс bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G) была более эффективной, чем комбинация двухвалентных антител (IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G), как было продемонстрировано стабильным снижением EC50 в двух независимых экспериментах (фиг.12D). Кроме того, bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G было более эффективным в индукции CDC на клетках OCI-Ly-7, чем комбинация двухвалентных антител (IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G), о чем свидетельствует постоянное снижение EC50 в трех независимых экспериментах (фиг. 12E).

Активность комбинации одновалентных связывающих антител (bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G плюс bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G5-H6S1-B4-B6G5-L5-L5-L5-H5S-5) F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G в индукции CDC в клетках OCI-Ly-7 была сопоставимой.

#### CDC на первичных опухолевых клетках ХЛЛ

Способность биспецифических CD37-антител, содержащих мутацию E430G, индуцировать CDC в опухолевых клетках, полученных от пациента с ХЛЛ, определяли, как описано выше, и сравнивали со способностью для CD37-антител, содержащих мутацию E430G, или комбинации CD37-антител, содержащих мутацию E430G, или

одновалентных антител к CD37, содержащих мутацию E430G.

На фигуре 14А показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G было более активным, чем IgG1-005-H1L2-K409R-E430G или IgG1-016-H5L2-F405L-E430G в индукции CDC на опухолевых клетках ХЛЛ. Биспецифическое bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G было также более активным, чем комбинация IgG1-005-H1L2-K409R-E430G плюс IgG1-016-H5L2-F405L-E430G. Одновалентные связывающие антитела bsIgG1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G и bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G также индуцировали CDC на первичных опухолевых клетках ХЛЛ, при этом они были менее эффективными, чем bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G.

На фигуре 14В показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G было более эффективным, чем IgG1-010-H5L2-E430G или IgG1-016-H5L2-E430G, в индукции CDC первичных опухолевых клеток ХЛЛ. Биспецифическое bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G также более активно, чем комбинация IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G. Одновалентные связывающие антитела bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G также индуцировали CDC на первичных опухолевых клетках, при этом bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G было менее активным, а bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G было одинаково активным по сравнению с bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G.

**Пример 10. Биспецифические антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, индуцируют CDC на различных линиях клеток В-клеточной лимфомы с широким диапазоном экспрессии CD37.**

Способность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, при концентрации 10 мкг/мл, индуцировать CDC (как описано выше) определяли для ряда линий клеток В-лимфомы, происходящих от различных подтипов В-клеточной лимфомы. Уровни экспрессии молекул CD37 на клеточной поверхности этих клеточных линий определяли количественной проточной цитометрией, как описано выше.

В Таблице 3 приведен обзор протестированных клеточных линий.

**Таблица 3: Линии клеток В-клеточной лимфомы.**

Клеточная линия	Тип лимфомы	Источник
JVM-2	МКЛ	DSMZ; ACC 12
JVM-13	МКЛ	ATCC; CRL-3003
Jeko-1	МКЛ	DSMZ; ACC 553
Z-138	МКЛ	ATCC; CRL-3001

Daudi	Беркитта	ATCC; CCL-213
Raji	Беркитта	ATCC; CCL-86
Wien-133	Беркитта	BioAnaLab, Oxford, U.K
SU-DHL-8	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 573
OCI-Ly19	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 528
OCI-Ly7	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 688
SU-DHL-4	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 495
RC-K8	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 561
U-2932	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 633
WIL-2S	Плазмобластная	ATCC; CRL-8885
RI-1	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 585
WSU-DLCL2	ДКБКЛ	DSMZ; ACC 575

На фигуре 15 показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G индуцировало CDC в широком диапазоне клеточных линий В-клеточной лимфомы, полученных из различных типов В-клеточной лимфомы.

**Пример 11. Биспецифические антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, более эффективны в индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC).**

#### Маркировка клеток-мишеней

Способность антител к CD37 индуцировать ADCC определяли анализом высвобождения хрома. Клетки Дауди или Raji собирали ( $5 \times 10^6$  клеток/мл) в 1 мл культуральной среды (RPMI 1640 с добавлением 10% донорской бычьей сыворотки с железом (DBSI; ThermoFischer, кат. №10371029) и смесью пенициллина и стрептомицина (pen/strep), к которому добавляли 100 мкКи  $^{51}\text{Cr}$  (Хром-51; PerkinElmer, кат. №NEZ030005MC). Клетки инкубировали на водяной бане при  $37^\circ\text{C}$  в течение 1 часа при встряхивании. После промывания клеток (дважды в ФБР, 1500 об./мин, 5 минут) их ресуспендировали в RPMI 1640/10% DBSI/pen/strep и подсчитывали путем исключения трипанового синего. Клетки разбавляли до плотности  $1 \times 10^5$  клеток/мл.

#### Подготовка эффекторных клеток

Мононуклеарные клетки периферической крови от здоровых добровольцев (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) были выделены из 45 мл свежеприготовленной гепаринизированной крови (лейкоцитарный слой) с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла (Bio Whittaker; среда для выделения лимфоцитов, кат. №17-829E) в соответствии с инструкциями производителя. После ресуспендирования клеток в RPMI 1640/10% DBSI/ pen/strep клетки подсчитывали путем исключения трипанового синего и разбавляли до плотности  $1 \times 10^7$  клеток/мл.

#### Процедура анализа ADCC

50 мкл меченных  $^{51}\text{Cr}$  клеток-мишеней вносили пипеткой в 96-луночные

круглодонные планшеты для микротитрования (Greiner Bio-One; кат. №650101) и добавляли 50 мкл серии концентраций (1,5-5000 нг/мл конечных концентраций в 3-кратных разведениях) CD37 или контрольных антител, разведенные в RPMI 1640/10% DBSI/ pen/strep. Клетки инкубировали при комнатной температуре (КТ) в течение 15 минут и добавляли 50 мкл эффекторных клеток, в результате чего соотношение эффектор: мишень составляло 100:1. Клетки инкубировали в течение 4 часов при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Для определения максимального лизиса 50 мкл меченных <sup>51</sup>Сг клеток Дауди (5000 клеток) инкубировали с 100 мкл 5% Triton-X100; для определения спонтанного лизиса (фоновый лизис) 5000 меченных <sup>51</sup>Сг клеток Дауди инкубировали в среде объемом 150 мкл без каких-либо антител или эффекторных клеток. Уровень антитело-независимого лизиса клеток определяли путем инкубации 5000 клеток Дауди с 500 000 МНКПК без антител. Планшеты центрифугировали (1200 об./мин, 10 минут), и 25 мкл надосадочной жидкости переносили в 100 мкл раствора Microscint-40 (Packard, кат. №6013641) в 96-луночных планшетах. Планшеты закрывали и встряхивали в течение 15 минут при 800 об./мин, и высвобожденный <sup>51</sup>Сг подсчитывали с использованием сцинтилляционного счетчика (TopCount®, PerkinElmer). Процент специфического лизиса рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ специфического лизиса} = (\text{срм в образце} - \text{срм в результате самопроизвольного лизиса}) / (\text{срм для максимального уровня лизиса} - \text{срм в результате самопроизвольного лизиса}),$$
 где срм обозначает количество импульсов в минуту.

На фигуре 16А показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G было более эффективным, чем IgG1-005-H1L2-K409R-E430G or IgG1-016-H5L2-F409L-E430G, или чем комбинация IgG1-005-H1L2-K409R-E430G плюс IgG1-016-H5L2-F405L-E430G в индукции ADCC на клетках Дауди.

На фигуре 16В показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G более эффективно, чем IgG1-010-H5L2-E430G или IgG1-016-H5L2-E430G или комбинация IgG1-010-H5L2-E430G плюс IgG1-016-H5L2-E430G в индукции ADCC на клетках Дауди.

На фигуре 16С показаны аналогичные результаты, как на фигуре 16В для МНКПК от другого донора, и, кроме того, показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G было более эффективным, чем одновалентные связывающие антитела bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G и bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G в индукции ADCC на клетках Raji.

**Пример 12: Биспецифические антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, индуцируют мощный эффект CDC ex vivo в**

**первичных опухолевых клетках у пациентов с различными В-клеточными неоплазиями.**

CDC-эффективность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G анализировали с использованием первичных опухолевых клеток, полученных из пяти различных В-клеточных неоплазий: хронической лимфоцитарной лейкемии (ХЛЛ), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКБКЛ), мантийно-клеточной лимфомы (МКЛ) и неходжкинской лимфомы (без дополнительной классификации). Все образцы от пациентов были получены после письменного информированного согласия и сохранены с использованием протоколов, утвержденных Медицинским этическим комитетом VUmс в соответствии с Хельсинкской декларацией. Мононуклеарные клетки костного мозга пациентов (МНККМ) или мононуклеарные клетки периферической крови (МНКПК) выделяли центрифугированием в градиенте плотности (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) из аспириатов костного мозга или образцов периферической крови пациентов. Клетки либо использовали непосредственно, либо хранили в жидком азоте до дальнейшего использования.

Ткань лимфатического узла пациента рассекали на мелкие фрагменты и собирали в среду  $\alpha$ -MEM (ThermoFischer Scientific, Уолтем, Массачусетс), содержащую 1% пенициллина-стрептомицина, 0,2% гепарина и 5% лизата тромбоцитов, и оставляли на ночь при 37°C. После инкубации собирали надосадочную жидкость (не-стромальный клеточный компартмент, включающий опухолевые клетки), и клетки фильтровали с использованием 70 мкМ Easy Strainer (Greiner Bio-one). Клетки подсчитывали, ресуспендировали в среде RPMI 1640, содержащей 25% инактивированной нагреванием ЭТС и 10% ДМСО, и замораживали в жидком азоте до дальнейшего использования.

Уровни экспрессии CD37 и мембранных регуляторных белков комплемента (mCRP; CD46, CD55 и CD59) на изолированных клетках пациента определяли с использованием QifiKit (DAKO, кат. № K007811). Клетки инкубировали с очищенными антителами CD37 (BD, кат. №555456), CD46 (BioLegend, кат. №352404), CD55 (BioLegend, кат. №311302), CD59 (BioLegend, кат. №304702) и b12 (Genmab) при 4°C в течение 30 мин. После этого был использован метод, предоставленный производителем QifiKit. После заключительного этапа процедуры набора Qifi клетки инкубировали с маркерами, специфичными для клеток лимфомы, для идентификации опухолевых клеток. На фигуре 17 показаны уровни экспрессии для каждого показателя.

Опухолевые клетки, полученные от пациента, опсонизировали 10 мкг/мл или 100 мкг/мл bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G, и индукцию CDC оценивали в присутствии 20% объединенной NHS. Следующие клеточные маркеры были

использованы для идентификации различных клеточных популяций: CD45-KO (Beckman Coulter B36294), CD19-PC7 (Beckman Coulter, кат. № IM3628), CD3-V450 (BD, кат. №560365), CD5-APC (BD, кат. №345783), CD5-PE (DAKO, кат. №R084201), CD10-APC-H7 (BD, кат. №655404), CD10-PE (DAKO, кат. №R084201), CD23-FITC (Biolegend, кат. № 338505), лямбда-APC-H7 (BD, кат. №656648), каппа-PE (DAKO, кат. №R043601) и лямбда-FITC (Emelca Bioscience CYT-LAMBF). В популяции клеток CD45+ злокачественные В-клетки определяли различными маркерами в зависимости от показаний: CD3-/CD19+/CD5+ (ХЛЛ), CD3-/CD19+/CD10+ (ФЛ, ДКБКЛ), CD3-/CD19+/CD5+/CD23- (МКЛ). В случае, если злокачественные В-клетки не могли быть идентифицированы на основе этих маркеров, злокачественные клетки были идентифицированы на основе клональности с использованием окрашивания каппа/лямбда. В нескольких образцах злокачественные В-клетки также не могли быть идентифицированы на основе клональности; в этих случаях оценивали общую популяцию В-клеток без различия между нормальными и злокачественными В-клетками. Лизис рассчитывали, как долю положительных по 7-аминоактиномицину D (7-AAD; BD, кат. №555816) злокачественных В-клеток (%), определенную с помощью проточного цитометра LSRFortessa (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния).

На фигуре 18 показано, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G обладает высокой эффективностью (лизис более 50%) в индукции CDC в опухолевых клетках, полученных у пациентов с ХЛЛ, ФЛ, МКЛ, ДКБКЛ или В-НХЛ (без дополнительной классификации). В клетках от одного пациента с рецидивирующей/рефрактерной ФЛ bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405Lx010-H5L2-K409R-E430G было менее способным индуцировать CDC.

**Пример 13: Связывание биспецифического антитела к CD37 с мутацией, усиливающей Fc-Fc-взаимодействие, с В-клетками человека или макаки-крабоеда в цельной крови, и индукция цитотоксичности в В-клетках в цельной крови.**

#### Связывание с В-клетками человека или макаки-крабоеда

Связывание с В-клетками человека или макаки-крабоеда определяли в анализе связывания цельной крови. Гепаринизированную кровь человека от здоровых добровольцев получали из UMC Utrecht (Утрехт, Нидерланды), обработанную гирудином кровь от яванских макак получали от Covance (Мюнстер, Германия). Аликвоты крови добавляли в лунки 96-луночного круглодонного планшета (Greiner Bio-one, кат. №65010; 35 мкл/лунку). Эритроциты (RBC) лизировали добавлением 100 мкл буфера для лизиса RBC (10 mM  $\text{KHCO}_3$  [Sigma P9144], 0,1 mM ЭДТА [Fluka 03620] и 0,15 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [Sigma A5666]) и инкубировали на льду до завершения лизиса эритроцитов. После

центрифугирования в течение 3 минут при 300 g клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C с серийными разведениями (конечная концентрация антител 0,014-30 мкг/мл в 3 серийных разведениях) Alexa-488-меченного bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G или Alexa-488-меченного контрольного IgG1 (IgG1-b12) и антитела с прямой меткой для идентификации В-клеток (из смеси антител для дальнейшей идентификации популяций клеток крови):

Для В-клеток крови человека использовали следующее антитело:

Целевой белок	Клон	Метка	Целевые клетки	Поставщик	Кат. №
CD19	H1B19	BV711	В-клетки	Biolegend	302245

Для В-клеток крови макаки-крабоведа использовали следующее антитело:

Целевой белок	Клон	Метка	Целевые клетки	Поставщик	Кат. №
CD19	J3-119	PE	В-клетки	Beckman Coulter	A07769

Клетки осаждали и дважды промывали в 150 мкл буфера FACS и ресуспендировали в 150 мкл TO-PRO-3 (конечная концентрация 0,2 мкМ; Molecular Probes, кат. №T3605). Образцы анализировали проточной цитометрией с использованием проточного цитометра LSRFortessa. Связывание выражали как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции A488 для жизнеспособных В-клеток TO-PRO-3-/CD14-/CD19+ (человека) или жизнеспособных В-клеток TO-PRO-3-/CD14-/CD19+/CD20+ (макаки-крабоведа). Логарифмически преобразованные данные анализировали с использованием значений наилучшего нелинейного соответствия доза-ответ в GraphPad PRISM.

На фигуре 19 показано зависимое от концентрации связывание bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G с В-клетками в (А) крови человека и (В) крови макаки-крабоведа для одного репрезентативного донора/животного. Средние значения  $EC_{50}$  для связывания с В-клетками человека и макаки-крабоведа были в том же диапазоне ( $[0,85 \text{ мкг/мл} \pm 0,284$  на основе связывания с В-клетками в крови от 6 людей-доноров] и  $[0,63 \text{ мкг/мл} \pm 0,228$  на основе связывания с В-клетками в крови от 4 животных], соответственно), что указывает на то, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G демонстрирует сопоставимое связывание с CD37 человека и макаки-крабоведа.

#### Цитотоксичность по отношению к В-клеткам человека или макаки-крабоведа

Цитотоксичность по отношению к В-клеткам человека или макаки-крабоведа определяли в анализе цитотоксичности цельной крови. Обработанная гирудином кровь человека от здоровых добровольцев была получена из UMC Utrecht (Утрехт,

Нидерланды), обработанная гирудином кровь от макак-крабоедов была получена от Covance (Мюнстер, Германия). Кровь отбирали в лунки 96-луночного круглодонного планшета, 35 мкл/лунку.

Добавляли серийные разведения (конечная концентрация антител 0,0005-10 мкг/мл в 3 серийных разведениях; конечный объем 100 мкл/лунку) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G или IgG1-b12. В анализах цитотоксичности с использованием цельной крови человека в качестве эталона было включено моноклональное CD37-специфическое антитело IgG1-G28.1-S239D-I332E с усиленным FcγR-взаимодействием. Образцы инкубировали при 37°C в течение 4 часов. После этого эритроциты лизировали, как описано выше, и образцы окрашивали для идентификации В-клеток, как описано выше. Клетки осаждали и дважды промывали в 150 мкл буфера FACS и ресуспендировали в 150 мкл TO-PRO-3 (конечная концентрация 0,2 мкМ; Molecular Probes, кат. №Т3605). Образцы анализировали проточной цитометрией с использованием проточного цитометра LSRFortessa. После исключения дублетов определяли процент жизнеспособных TO-PRO-3-/CD14-/CD19+ В-клеток (человека) или жизнеспособных TO-PRO-3-/CD14-/CD19+/CD20+ В-клеток (макаки-крабоеда). Процент истощения В-клеток рассчитывали следующим образом: % истощения В-клеток = 100 x [(% В-клеток без Ат в контроле - % В-клеток в образце) / (% В-клеток без Ат в контроле)]. Логарифмически преобразованные данные были проанализированы с использованием значений наилучшего нелинейного соответствия доза-ответ в GraphPad PRISM.

На фигуре 20 показана зависимость от концентрации цитотоксичность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G для В-клеток в крови (А) человека и (В) макаки-крабоеда для одного репрезентативного донора/ животного.

На основании EC<sub>50</sub> способность bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G индуцировать цитотоксичность в клетках В человека и макаки-крабоеда была сопоставимой: среднее значение EC<sub>50</sub> для цитотоксичности для В-клеток человека (в крови от 6 доноров) - 0,077 мкг/мл ± 0,039; среднее значение EC<sub>50</sub> для цитотоксичности по отношению к В-клеткам макаки-крабоеда (в крови 4 животных) составляло 0,043 мкг/мл ± 0,019.

На фигуре 20А также показана цитотоксичность моноклонального антитела IgG1-G28.1-S239D-I332E с усиленным FcγR-взаимодействием, по отношению к В-клеткам человека для репрезентативного отвечающего донора, которое показало более низкую цитотоксичность, чем bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G. В В-клетках от 3 отвечающих доноров было измерено максимальное истощение В-клеток на 50% для IgG1-G28.1-S239D-I332E, тогда как у 3 других доноров цитотоксичность для В-

клеток этим с антителом не определялась. BsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G индуцировало цитотоксичность в 93-99% В-клеток у 6/6 доноров. Связывание IgG1-G28.1-S239D-I332E с CD37, экспрессируемым на клетках Дауди, было сопоставимо с таковым у bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G (данные не показаны).

**Пример 14: Выраженная активность CDC для комбинации биспецифического антитела к CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, с CD20-специфическим антителом.**

Способность индуцировать CDC тестировали для комбинации bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и антитела против CD20 (IgG1-CD20-ofa; офатумумаб) на опухолевых клетках ХЛЛ, полученных от пациента, от ConversantBio (Хантсвилл, Алабама, США). Полученные от пациентов МНКПК ресуспендировали в RPMI, содержащей 0,2% БСА (бычий сывороточный альбумин), и помещали в полистирольные 96-луночные круглодонные планшеты (Greiner bio-one кат. №650101) с плотностью  $0,1 \times 10^6$  клеток/лунку (30 мкл/лунку) и 50 мкл серии концентраций bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G (0,0625-0,05 мкг/мл) и IgG1-CD20-ofa (1-8 мкг/мл) в 2-кратных разведениях. BsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и IgG1-CD20-ofa объединяли в концентрациях антител, которые основывались на относительной активности (разнице в  $EC_{50}$ ) каждого из антител, смешивая две концентрации, которые будут в среднем по отдельности достигать того же эффекта. IgG1-b12 использовали в качестве отрицательного контроля.

После инкубации (КТ, 15 мин при встряхивании) в каждую лунку добавляли 20 мкл объединенной нормальной человеческой сыворотки (NHS, кат. №M0008 Sanquin, Амстердам, Нидерланды) и планшеты инкубировали при 37°C в течение 45 минут. Реакцию останавливали охлаждением планшетов на льду. После центрифугирования в течение 3 минут при 300 g клетки дважды промывали 150 мкл буфера FACS и инкубировали в течение 30 минут при 4°C с меченым R-фикоэритрином (PE) мышинным антителом против человеческого IgG1-CD19 (клон J3-119, Beckman Coulter, кат. № A07769, 1:50 разбавленный из исходного раствора) для определения В-клеток опухоли и TO-PRO-3 (конечная концентрация 0,2 мкМ; Molecular Probes, кат. №T3605) для идентификации мертвых клеток. Клетки осаждали и дважды промывали в 150 мкл буфера FACS и анализировали с помощью проточной цитометрии с использованием проточного цитометра LSRFortessa. Процент жизнеспособных клеток рассчитывали следующим образом: % жизнеспособных клеток =  $100 \times (\text{число TO-PRO-3} \text{ отрицательных результатов}) / \text{общее число результатов}$ .

На фигурах 21A-D показано, что как bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, так и офатумумаб индуцировали CDC в опухолевых клетках, полученных от 2 пациентов с ХЛЛ, причем активность CDC повышалась с увеличением уровней дозы. Комбинация bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G с офатумумабом приводила к повышенной активности CDC при всех протестированных концентрациях для обоих протестированных пациентов с ХЛЛ, хотя эти эффекты были менее выражены при более высоких концентрациях антител, где почти полный лизис клеток был вызван отдельными агентами (фиг. 21A и B). Эти результаты показывают, что добавление офатумумаба к bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G позволяет улучшить CDC-опосредованный лизис опухолевых клеток в злокачественных В-клетках, полученных от пациентов с ХЛЛ.

**Пример 15. Противоопухолевая активность биспецифического антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, на моделях ксенотрансплантатов В-клеточных неоплазий.**

Противоопухолевая активность на модели подкожного ксенотрансплантата хронического В-клеточного лейкоза человека JVM-3

Клетки JVM-3 ( $1 \times 10^7$ ) инокулировали в правый бок мышей CB17.SCID, и лечение антителами (3 еженедельные дозы по 0,1; 0,3; 1; 3 или 10 мг/кг, при внутривенном введении; IgG1-b12 использовали в качестве отрицательного контроля (дозировка 10 мг/кг) начинали, когда опухоли достигали среднего объема примерно  $158 \text{ мм}^3$ . Объемы опухолей измеряли два раза в неделю в двух измерениях, используя штангенциркуль, и объем выражали в  $\text{мм}^3$  по формуле:  $O = (D \times W \times W) / 2$ , где O - объем опухоли, D - длина опухоли (самый длинный размер опухоли) и W - ширина опухоли (самый длинный размер опухоли, перпендикулярный D).

На фигуре 22A показан объем опухоли на группу доз с течением времени, на фигуре 22B показаны объемы опухоли на мышью на группу доз на 25 день, когда все группы были завершены. Три еженедельные дозы bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G в дозировке 1, 3 или 10 мг/кг значительно снижали рост опухолей из клеток JVM-3, тогда дозировки 0,1 или 0,3 мг/кг не влияли на рост опухоли (тест Манна-Уитни,  $p < 0,01$ ).

Противоопухолевая активность на модели внутривенного ксенотрансплантата лимфомы Дауди-luc Беркитта

В день 0 мышам SCID (C.B-17/IcrHan®Hsd-Prkdcscid; Harlan) внутривенно вводили клетки Дауди-luc (трансфицированные люциферазой клетки Дауди,  $2,5 \times 10^6$  клеток/мышь). На 14, 21 и 28 день мышам внутрибрюшинно вводили 0,1; 0,3; 1; 3 или 10 мг/кг bsIgG1-

016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G. IgG1-b12 использовали в качестве отрицательного контрольного антитела в дозе 10 мг/кг. Рост опухоли оценивали еженедельно (начиная со дня 2) с помощью биолюминесцентной визуализации (BLI). Мышам вводили внутривенно 100 мкл D-люциферина светлячков (30 мг/мл; Caliper LifeSciences, кат. № 119222), и биолюминесценцию (яркость в ф/с/см<sup>2</sup>/кв.рад. [фотонов в секунду на см<sup>2</sup> на квадратный радиан]) измеряли под изофлурановой анестезией с использованием системы биолюминесцентной визуализации Biospace (PerkinElmer; изображения для мышей были получены с участка спины).

На фигуре 23А показана активность люциферазы (биолюминесценция как мера объема опухоли) на группу доз во времени, на фигуре 23В показана активность люциферазы на мышью на группу доз на 36-й день, когда все группы были еще завершены. Три еженедельные дозы bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G в дозировке 0,1; 0,3; 1; 3 или 10 мг/кг значительно снижали рост клеток Дауди-luc in vivo (односторонний дисперсионный анализ, без поправки критерия наименьшей значимой разницы Фишера).

**Пример 16. Оценка плазменного клиренса биспецифического антитела против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, у мышей SCID.**

Самкам мышей SCID в возрасте 11-12 недель (C.B-17/IcrHan<sup>o</sup>Hsd-Prkdcscid; Harlan) (3 мыши на группу) вводили внутривенно (в/в) однократную дозу 100 мкг (5 мг/кг) или 500 мкг (25 мг/кг) bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G или IgG1-b12. Эксперимент был разработан для изучения клиренса антител при отсутствии мишень-опосредованного клиренса, поскольку ни bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G, ни IgG1-b12 не демонстрируют перекрестную реактивность с белками мыши.

Образцы крови 50-100 мкл отбирали из подкожной вены через 10 минут, 4 часа, 24 часа, 2 дня, 7 или 8 дней, 14 дней и 21 день после введения антитела. Кровь собирали во флаконы с гепарином и центрифугировали в течение 5 минут при 10000 g. Образцы плазмы разводили 1:50 для мышей, которым вводили 5 мг/кг (20 мкл образца в 980 мкл PBSA (ФБР с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА)), и 1:20 для мышей, которым вводили 25 мг/кг (20 мкл образца в 380 мкл PBSA) и хранили при -20°C до определения концентраций мАт.

Концентрации человеческого IgG определяли с помощью сэндвич-ИФА. Мышиные антитела против человеческого IgG-каппа, клон МН16 (CLB Sanquin, Нидерланды; кат. №М1268), наносили в количестве 100 мкл и инкубировали в течение ночи при 4°C в 96-луночных планшетах для ИФА Microton (Грейнер, Германия) в концентрации 2 мкг/мл, и

использовали в качестве захватывающего антитела. После блокирования планшетов PBSA в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ), добавляли образцы, серийно разведенные в PBSA и инкубировали на шейкере для планшетов в течение 1 часа при КТ. Планшеты трижды промывали 300 мкл PBST (ФБР с добавлением 0,05% Tween 20) и затем инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре с козым антителом к человеческому IgG-иммуноглобулину (Jackson, Уэст-Грейс, Пенсильвания; кат. №109-035-098; 1:10000 в PBST с добавлением 0,2% БСА). Планшеты снова трижды промывали 300 мкл PBST перед инкубацией с 2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоной кислотой) (ABTS; Roche, Маннхейм, Германия), защищая от света. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2% щавелевой кислоты. Абсорбцию измеряли посредством ридера для микропланшетов (Biotek, Виноски, Вермонт) при 405 нм. Концентрацию человеческого IgG рассчитывали, используя введенный материал для контрольной кривой. В качестве контроля планшетов был включен очищенный человеческий IgG1 (участок связывания, кат. №BP078). Концентрации человеческого IgG (в мкг/мл) наносили на график (фиг. 24А и 24С), и площадь под кривой (AUC) рассчитывали с использованием Graphpad prism 6.0. Клиренс IgG до последнего дня забора крови (21 день) определяли по формуле  $D \times 1.000 / AUC$ , в которой D – введенная доза (1 мг/кг) (фиг.24В и 24D).

Не было существенных различий между показателями плазменного клиренса bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G и IgG1-b12, что свидетельствует о том, что bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G показало сопоставимый фармакокинетический профиль с человеческим IgG1 дикого типа в отсутствие связывания с мишенью.

**Пример 17: Определение вклада аминокислотных остатков CD37 в связывание антител против CD37 с использованием аланинового сканирования.**

#### Конструирование библиотеки

Была синтезирована библиотека CD37 с одним аланиновым остатком (Geneart), в которой все аминокислотные (aa) остатки во внеклеточных доменах человеческого CD37 (UniProt P11049) были индивидуально мутированы в аланины, за исключением положений, уже содержащих аланины или цистеины. Цистеины не были мутированы, чтобы минимизировать вероятность структурного разрушения антигена. Библиотеку клонировали в экспрессирующий вектор pMAC, содержащий экспрессионную кассету CMV/TK-polyA, ген устойчивости к Amp и источник репликации pBR322.

#### Получение и скрининг библиотеки

CD37 дикого типа и аланиновые мутанты экспрессировали индивидуально в

клетках FreeStyle HEK293 в соответствии с инструкциями производителя (Thermo Scientific). Через день после трансфекции клетки собирали. Примерно 100000 клеток инкубировали с 20 мкл конъюгированного с Alexa488 bsIgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G (одновалентное связывание 010) или с конъюгированным с Alexa488 bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G (одновалентное связывание 016) в концентрации 3 мкг/мл в буфере FACS (ФБР + 0,1% (масс./об.) бычьего сывороточного альбумина (БСА) + 0,02% (масс./об.) азида натрия). Клетки инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали, добавляя 150 мкл буфера FACS и удаляя надосадочную жидкость после центрифугирования. Клетки ресуспендировали в 20 мкл свежего буфера FACS и хранили при 4°C до анализа методом проточной цитометрии с использованием скринера iQue (IntelliCyt). Весь эксперимент выполняли 2 раза.

#### Анализ данных

Для каждого образца среднее связывание антител на клетку определяли как среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции (gMFI) для популяции клеток без гейтинга. На gMFI влияет аффинность антитела к мутанту CD37 и уровень экспрессии мутанта CD37 на клетку. Поскольку специфические аланиновые мутации могут влиять на уровень поверхностной экспрессии мутанта CD37, и для коррекции различия в экспрессии для каждого мутанта CD37 в целом, данные были нормализованы относительно интенсивности связывания неконкурентного CD37-специфического контрольного антитела (в этом примере антитела одновалентного связывания 010 и одновалентного связывания 016 были неконкурентными антителами, и одно антитело использовали в качестве контроля для другого антитела), с использованием следующего уравнения:

**Нормализованное значение gMFI (положение aa) =  $\text{Log}_{10} \frac{\text{gMFI (опытного антитела)}}{\text{gMFI (контрольного антитела)}}$**  При этом

«положение aa» относится к конкретному положению аланинового мутанта либо в CD37, либо в CD37 дикого типа (wt).

Чтобы выразить уменьшение или усиление связывания антител, стандартную оценку определяли согласно следующему расчету:

$$z - \text{оценка (кратное изменение)} = \frac{\text{Нормализованное значение gMFI (положение aa)} - \mu}{\sigma}$$

Где  $\mu$  и  $\sigma$  являются средним значением и стандартным отклонением (SD) нормализованного значения gMFI для всех мутантов.

Усиление связывания в большинстве случаев будет вызвано потерей связывания

эталонного антитела со специфическими аланиновыми мутантами. Используя эти расчеты, положения аминокислот, для которых при замене аминокислоты на аланин не будет потери или усиления связывания с конкретным антителом, дадут значение z-оценки «0», усиление связывания приведет к значению «z-оценки > 0», а снижение связывания приведет к значению по «z-оценке < 0». Для коррекции изменения образца только «аминокислотные остатки CD37, у которых значение по z-оценке было ниже -1,5, считались «мутантов с потерей связывания». В случае, если gMFI контрольного антитела для конкретного мутанта CD37 было ниже, чем среднее значение  $gMFI - 2.5 \times SD$  среднего значения gMFI контрольного антитела, данные исключали из анализа (поскольку для этих мутантов CD37 предполагалось, что уровни экспрессии не были достаточными).

На фигуре 25 показано значение «z-оценки (кратного изменения)» антител против CD37 к вариантам CD37 с мутациями Ала в положениях с 42 по 131 (согласно SEQ ID NO: 94). Результаты показывают, что:

- связывание антитела 010 по меньшей мере зависит от Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 и P199 человеческого CD37;
- связывание антитела 016 по меньшей мере зависит от E124, F162, Q163, V164, L165 и H175 человеческого CD37.

### **В итоге**

Таким образом, биспецифические антитела, состоящие из двух CD37-специфических антител, которые не конкурируют за связывание мишени, с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, показали наиболее благоприятную комбинацию активности CDC и активности ADCC в CD37-позитивных опухолевых клетках. Для обоих эффекторных механизмов биспецифические антитела с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, показали более высокую эффективность по сравнению с комбинацией двух неконкурентных антител CD37, содержащих мутацию, усиливающую взаимодействие Fc-Fc, или с одиночными антителами к CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc.

**Пример 18. Оценка *in vitro* активности CDC смесей новых усиленных гексамеризацией антител против CD37 с клинически установленными продуктами антител против CD20 на клетках Raji.**

CDC-активность смесей антител против CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, IgG1-37.3-E430G, IgG1-G28.1-E430G, IgG1-004-E430G, IgG1-005-E430G, IgG1-010-E430G и IgG1-016-E430G (последнее из 4 – химерное антитело кролика/человека), а также клинически установленных продуктов моноклональных антител, нацеленных на CD20, MabThera (ритуксимаб; Roche, H0124B08), Arzerra (офатумумаб;

Novartis; C656294) и Gazyva (обинутузумаб, GA101; (D287-41A (GACD20)) тестировали *in vitro* с использованием клеток Raji лимфомы Беркитта. Клетки Raji (ATCC, кат. № CCL-86) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием ЭТС, 1 ед./мл пенициллина, 1 мкг/мл стрептомицина и 4 мМ L-глутамина.  $0,1 \times 10^6$  клеток Raji предварительно инкубировали с антителами в общем объеме 80 мкл RPMI/ 0,2% БСА на лунку в течение 15 минут на шейкере при комнатной температуре. Затем NHS добавляли к предварительно инкубированным клеткам до конечного объема 100 мкл (конечные концентрации антител 10 мкг/мл; 20% NHS) и инкубировали в течение 45 минут при 37°C. Для всех протестированных общих концентраций антител были анализированы различные соотношения двух антител в смесях (1:0 – 3:1 – 1:1 – 1:3 – 0:1). Планшеты центрифугировали и клетки ресуспендировали в 30 мкл PI (2 мкг/мл). Лизис рассчитывали, как долю PI-положительных клеток (%), определенную с помощью проточной цитометрии на скринере iQue (Intellicyt). Данные были проанализированы и нанесены на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

Смеси тестируемых антител к CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и клинически установленных продуктов антител к CD20 показали повышенную дозозависимую активность CDC по сравнению с той же концентрацией отдельных антител на клетках Raji (фиг.8). Наблюдалась небольшая разница в активности CDC при различных протестированных соотношениях двух антител в смесях (1:3, 1:1 или 3:1). Эти данные указывают на то, что смесь усиленного гексамеризацией антитела CD37 с мутацией, усиливающей взаимодействие Fc-Fc, и клинически установленного продукта антитела к CD20, такого как MabThera, Arzerra (антитела против CD20 I типа) или Gazyva (антитело против CD20 II типа), позволяет улучшить терапевтический потенциал у пациентов с В-клеточными неоплазиями, которые часто становятся невосприимчивыми к стандартной терапии, направленной на CD20.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Биспецифическое антитело, содержащее первую и вторую антигенсвязывающую область, связывающуюся с CD37 человека, имеющим последовательность SEQ ID NO: 62, и первую и вторую Fc область иммуноглобулина человека, где первая и вторая антигенсвязывающие области связывают разные эпитопы на CD37, и где первая и вторая Fc области содержат одну или несколько аминокислотных мутаций, которые усиливают Fc-Fc взаимодействие между биспецифическими антителами при связывании с мембраносвязанной мишенью по сравнению с Fc-Fc взаимодействием между биспецифическими антителами, не имеющими указанную мутацию (мутации).

2. Биспецифическое антитело по п.1, где указанная первая антигенсвязывающая область получена из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с антителом против CD37, содержащим CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20,

VL CDR2: KAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. [010]

3. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная первая антигенсвязывающая область связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и антитело против CD37, содержащее CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20,

VL CDR2: KAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. [010]

4. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 16,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 17,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 18,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 20,

VL CDR2: KAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21. [010]

5. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит VH и VL последовательности:

(i) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 15, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, или

(ii) VH последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностью SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 19.

6. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1-6, в котором указанная первая антигенсвязывающая область связывается с функциональным эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из Y182, D189, T191, I192, D194, K195, V196, I197 и P199 из SEQ ID NO: 62 (CD37).

7. Биспецифическое антитело по п.1, в котором указанная первая антигенсвязывающая область получена из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с антителом против CD37, содержащим CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13,

VL CDR2 последовательность: AAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. [005].

8. Биспецифическое антитело по п.1 или п.7, в котором указанная первая антигенсвязывающая область связывается с тем же эпитопом на CD37 человека, что и антитело против CD37, содержащее CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13,

VL CDR2 последовательность: AAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. [005].

9. Биспецифическое антитело по п.п.1, 7 или 8, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит CDR последовательности:

VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 10,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 11,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13,  
VL CDR2 последовательность: AAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14. [005].

10. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1 или 7-9, где указанная первая антигенсвязывающая область содержит VH и VL последовательности:

(i) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 8, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 12, или

(ii) VH последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностью из SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 12.

11. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область получена из антитела, которое конкурирует за связывание человеческого CD37 с антителом против CD37, содержащим CDR последовательности, выбранные из группы, включающей:

(i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,  
VL CDR2 последовательность: YAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]

(ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,  
VL CDR2 последовательность: EAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]

(iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,

VL CDR2 последовательность: FAK, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1], и  
(iv) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,  
VL CDR2 последовательность: VAT, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3].

12. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором указанная вторая антигенсвязывающая область связывается с тем же эпитопом на человеческом CD37, что и антитело против CD37, содержащее CDR последовательности, выбранные из группы, включающей:

(i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,  
VL CDR2 последовательность: YAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]  
(ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,  
VL CDR2 последовательность: EAS, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]  
(iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,  
VL CDR2 последовательность: FAK, и  
VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1], и  
(iv) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,  
VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,  
VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,  
VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,  
VL CDR2 последовательность: VAT, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3].

13. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная вторая антигенсвязывающая область связывается с функциональным эпитопом, содержащим одну или несколько аминокислот, выбранных из группы, состоящей из E124, F162, Q163, V164, L165 и H175 из SEQ ID NO: 62 (CD37).

14. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная вторая антигенсвязывающая область содержит CDR последовательности, выбранные из группы, включающей:

(i) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 23,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 24,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 25,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27,

VL CDR2 последовательность: YAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 28; [016]

(ii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 2,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 6,

VL CDR2 последовательность: EAS, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 7; [004]

(iii) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 40,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 41,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 42,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 44,

VL CDR2: FAK, и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 45; [G28.1] и

(iv) VH CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47,

VH CDR2 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48,

VH CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49,

VL CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 51,

VL CDR2 последовательность: VAT и

VL CDR3 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 52. [37.3].

15. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где указанная вторая антигенсвязывающая область содержит VH и VL последовательности, выбранные из группы, включающей:

(i) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 26, или

(ii) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 5, или

(iii) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 39, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 43, или

(iv) VH последовательность, указанную в SEQ ID NO: 46, и VL последовательность, указанную в SEQ ID NO: 50, или

(v) VH последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность, и VL последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность, такую как по меньшей мере 95% идентичность, такую как по меньшей мере 98% идентичность, такую как по меньшей мере 99% идентичность с VH последовательностью и VL последовательностью, соответственно, как указано в любом из (i) - (iv).

16. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором одна или несколько мутаций, усиливающих Fc-Fc взаимодействие в указанных первой и второй Fc областях, представляют собой аминокислотные замены.

17. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором одна или несколько мутаций, усиливающих взаимодействие Fc-Fc в указанных первой и второй областях Fc, представляют собой аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным положениям 430, 440 и 345 в человеческом IgG1 при использовании системы нумерации EU.

18. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее по меньшей мере одну замену в указанных первой и второй Fc областях, выбранную из группы, включающей E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W.

19. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее по меньшей мере одну замену в указанных первой и второй Fc областях, выбранную из E430G или E345K, предпочтительно E430G.

20. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, в котором указанные мутации, усиливающие Fc-Fc взаимодействие в указанных первой и второй Fc областях, являются идентичными заменами в указанных первой и второй Fc областях.

21. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где биспецифическое антитело представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, или их

комбинацию, предпочтительно, это изотип IgG1.

22. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, представляющее собой полноразмерное антитело.

23. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, являющееся человеческим, гуманизированным или химерным антителом, или их комбинацией.

24. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, связывающее CD37 человека и макаки-крабоеда, имеющие последовательности, указанные в SEQ ID NO: 62 и SEQ ID NO: 63, соответственно.

25. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, где

А) первая Fc область содержит дополнительную мутацию, соответствующую F405L в человеческом IgG1, а вторая Fc область содержит дополнительную мутацию, соответствующую K409R в человеческом IgG1, или

В) вторая Fc область содержит дополнительную мутацию, соответствующую F405L в человеческом IgG1, а первая Fc область содержит дополнительную мутацию, соответствующую K409R в человеческом IgG1,

при использовании нумерации EU.

26. Биспецифическое антитело по любому из предыдущих пунктов, которое имеет повышенную CDC функцию, или повышенные CDC и ADCC эффекторные функции, по сравнению с идентичным биспецифическим антителом, но не имеющим мутаций, усиливающих Fc-Fc взаимодействие.

27. Анти-CD37 антитело, связывающееся с тем же эпитопом на CD37 человека, что и анти-CD37 антитело, которое включает:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005].

28. Анти-CD37-антитело по п.27, которое включает:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 16, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 17, и последовательность CDR3,

указанную в SEQ ID NO: 18, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 20, и последовательность CDR2: KAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 21 [010]; или

(ii) VH область, содержащая последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 9, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 10, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 11, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 113, и последовательность CDR2: AAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 14 [005].

29. Анти-CD37 антитело, которое связывается с CD37 человека, включающее:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 23, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 24, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 25, и VL область, содержащую CDR1 последовательность, указанную в SEQ ID NO: 27, и последовательность CDR2: YAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 28; [016], или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 4, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 6, и последовательность CDR2: EAS, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 7. [004]

30. Антитело по любому из п.п.27-29, где указанное антитело включает Fc область, которая содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, усиливающих Fc-Fc взаимодействие между антителами при связывании с мишенью, по сравнению с Fc-Fc взаимодействием между антителами, не имеющими указанной мутации (мутаций).

31. Антитело по п.30, в котором одна или несколько аминокислотных мутаций в Fc области антитела представляют собой аминокислотные замены в одном или нескольких положениях, соответствующих аминокислотным положениям 430, 440 и 345 в IgG1 человека при использовании системы нумерации EU.

32. Антитело по п.31, содержащее по меньшей мере одну аминокислотную замену в Fc области, выбранную из группы, включающей E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W.

33. Антитело по п.32, содержащее по меньшей мере одну замену в указанной Fc области, выбранную из E430G или E345K, предпочтительно E430G.

34. Антитело по любому из п.п.27-33, содержащее мутацию, соответствующую F405L или K409R в человеческом IgG1.

35. Анти-CD37 антитело, которое связывается с CD37 человека, включающее:

(i) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 40, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 41, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 42, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 44, и последовательность CDR2: FAK, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 45 [G28.1], или

(ii) VH область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 47, последовательность CDR2, указанную в SEQ ID NO: 48, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 49, и VL область, содержащую последовательность CDR1, указанную в SEQ ID NO: 51, и последовательность CDR2: VAT, и последовательность CDR3, указанную в SEQ ID NO: 52 [37.3];

(iii) и где антитело из (i) или (ii) включает Fc область, содержащую по меньшей мере одну аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей E430G, E345K, E430S, E430F, E430T, E345Q, E345R, E345Y, S440Y и S440W; и

(iv) где при необходимости Fc область дополнительно содержит мутацию либо K409R, либо F405L.

36. Антитело по любому из п.п.27-35, представляющее собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

37. Антитело по любому из п.п.27-36, являющееся человеческим, гуманизированным или химерным антителом.

38. Антитело по любому из п.п.27-37, связывающееся как с CD37 человека, так и с CD37 макаки-крабеда.

39. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26 или антитело по любому из п.п.27-38 и фармацевтически приемлемый носитель.

40. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26, или антитело по любому из п.п.27-38, или композиция по п.39 для применения в качестве медикамента.

41. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26, или антитело по любому из п.п.27-38, или композиция по п.39 для применения при лечении рака, аутоиммунного заболевания или воспалительных расстройств.

42. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26, или антитело по любому из п.п.27-38, или композиция по п.39 для применения при лечении аллергии, отторжения трансплантата или В-клеточной неоплазии, такой как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийно-клеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКБКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

43. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26, или антитело по любому из п.п.27-38, или композиция по п.39 для применения по любому из п.п.40-42 в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.

44. Биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26, или антитело по любому из п.п.27-38, или композиция по п.39 для применения по любому из п.п.40-43, где один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбраны из группы, включающей доксорубин, цисплатин, блеомицин, кармустин, циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин, винкристин, флударабин, ибрутиниб и анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб или офатумумаб.

45. Биспецифическое антитело по любому из п.п.43-44 или антитело по п.п.43-44 или композиция по п.п.43-44 для применения по п.43-44, где дополнительный терапевтический агент представляет собой анти-CD20 антитело, способное к связыванию с человеческим CD20, включающее последовательности CDR, выбранные из группы, состоящей из:

i) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 75,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 76,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 77,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 79

VL CDR2 последовательности DAS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 80;

ii) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 82,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 83,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 84,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 85

VL CDR2 последовательности DAS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 86;

iii) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 95,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 96,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 97,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 99,

VL CDR2 последовательности ATS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 100;

iv) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 88,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 89,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 90,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 92

VL CDR2 последовательности DAS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 93; и

v) VH CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 102,

VH CDR2 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 103,

VH CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 104,

VL CDR1 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 106,

VL CDR2 последовательности QMS, и

VL CDR3 последовательности, указанной в SEQ ID NO: 107.

46. Применение биспецифического антитела по любому из п.п.1-26, или антитела по любому из п.п.27-38, или композиции по п.39 для изготовления медикамента.

47. Применение по п.46 для изготовления медикамента для лечения рака, аутоиммунного заболевания или воспалительного заболевания.

48. Применение по п.47 для изготовления медикамента для лечения аллергии, отторжения трансплантата или В-клеточной неоплазии, такой как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийно-клеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКБКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

49. Применение по любому из п.п.46-48 в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами.

50. Применение по п.49, в котором один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбраны из группы, включающей доксорубицин, цисплатин, блеомицин, кармустин, циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин, винкристин, флударабин, ибрутиниб и анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб или офатумумаб.

51. Способ индукции гибели клеток или ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей CD37, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества биспецифического антитела по любому из п.п.1-26, или антитела по любому из п.п.27-38, или композиции по п.39.

52. Способ лечения индивидуума, имеющего аллергию, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, отторжение трансплантата или В-клеточную неоплазию, такую как неходжкинская лимфома (НХЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), фолликулярная лимфома (ФЛ), мантийно-клеточная лимфома (МКЛ), плазмоклеточный лейкоз (ПКЛ), диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома

(ДКБКЛ) или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), включающий введение указанному индивидууму эффективного количества биспецифического антитела по любому из п.п.1-25, или антитела по любому из п.п.27-38, или композиции по п.39.

53. Способ по любому из п.п.51-52, включающий введение одного или нескольких дополнительных терапевтических агентов в комбинации с указанным антителом или указанным биспецифическим антителом.

54. Способ по п.53, в котором один или несколько дополнительных терапевтических агентов выбраны из группы, включающей доксорубин, цисплатин, блеомицин, кармустин, циклофосфамид, хлорамбуцил, бендамустин, винкристин, флударабин, ибрутиниб и анти-CD20 антитело, такое как ритуксимаб или офатумумаб.

55. Нуклеиновокислотная конструкция, кодирующая одну или несколько последовательностей, выбранных из группы, включающей SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6a, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 13a, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 20a, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 27a, 28, 29, 30, 30a и 31, как указано в Таблице 1.

56. Нуклеиновокислотная конструкция, кодирующая биспецифическое антитело по любому из п.п.1-26 или антитело по любому из п.п.27-38.

57. Вектор экспрессии, содержащий одну или несколько нуклеиновокислотных конструкций по п.п. 55-56.

58. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.57.

59. Клетка-хозяин по п.58, представляющая собой рекомбинантную клетку-хозяина, такую как рекомбинантная прокариотическая клетка, рекомбинантная эукариотическая клетка или рекомбинантная микробная клетка-хозяин.

60. Антиидиотипическое антитело, которое связывается с антителом по любому из п.п.27-38.

61. Способ *in vitro* для обнаружения присутствия человеческого антигена CD37 или клетки, экспрессирующей человеческий CD37, в образце, где указанный способ включает:

(i) обеспечение контакта образца с биспецифическим антителом по любому из п.п.1-26 или антителом по любому из п.п.27-38 в условиях, которые обеспечивают формирование комплекса между антителом или биспецифическим антителом и CD37; и

(ii) детекцию формирования комплекса.

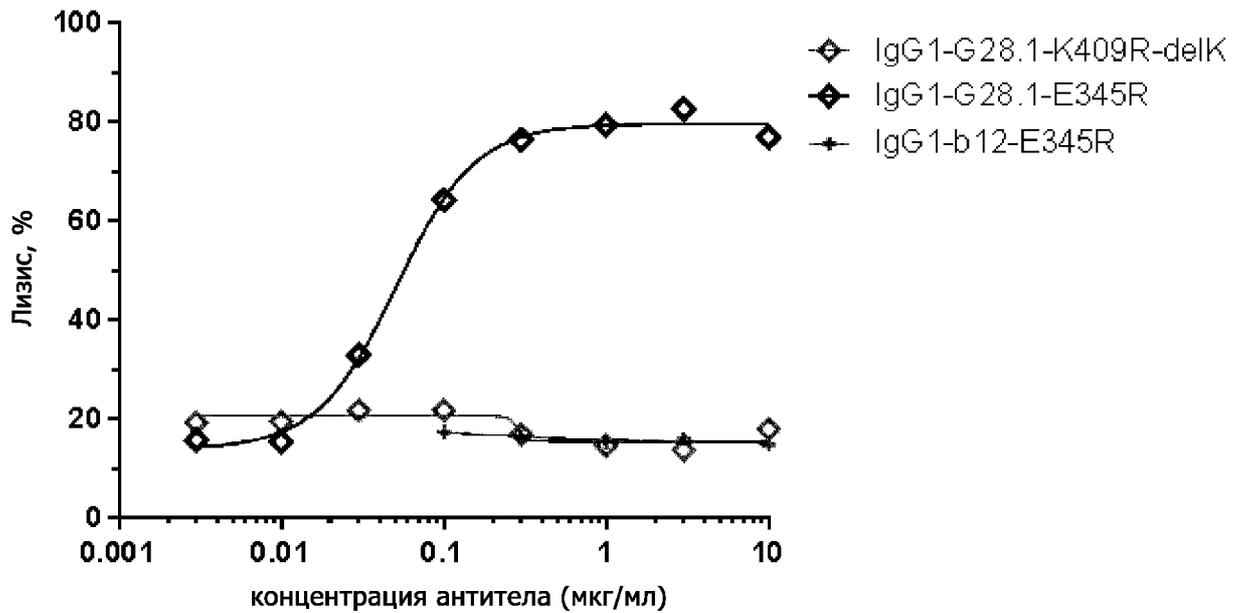
62. Способ *in vivo* для обнаружения присутствия человеческого антигена CD37 или клетки, экспрессирующей человеческий CD37 у субъекта, где указанный способ включает:

(i) применение биспецифического антитела по любому из п.п.1-26 или антитела по любому из п.п.27-38 в условиях, которые обеспечивают формирование комплекса между антителом или биспецифическим антителом и CD37; и

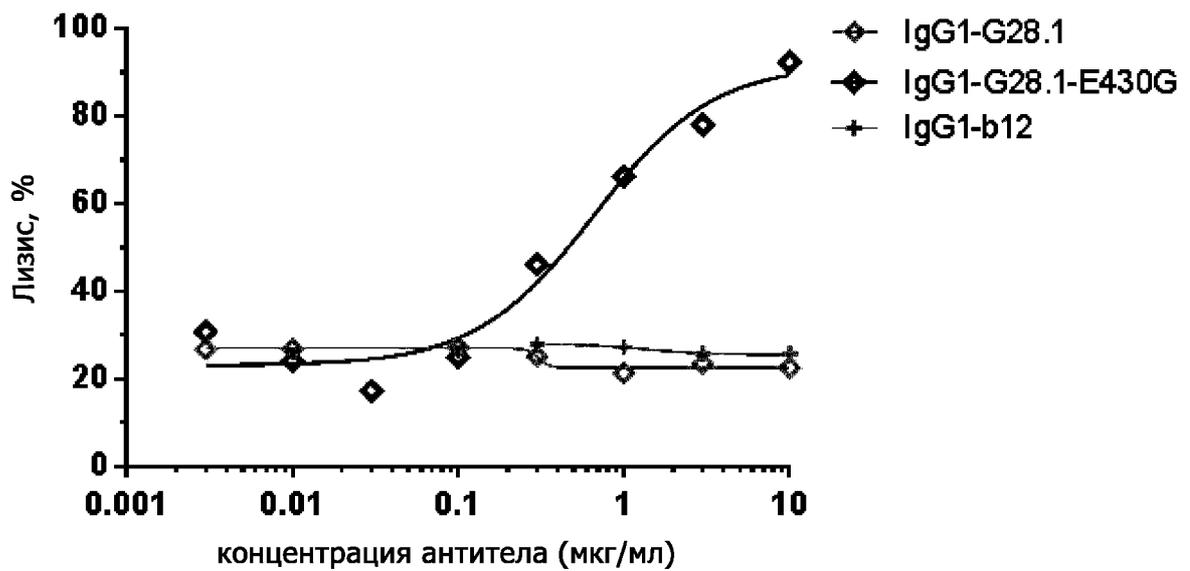
(ii) детекцию формирования комплекса.

## Фиг. 1

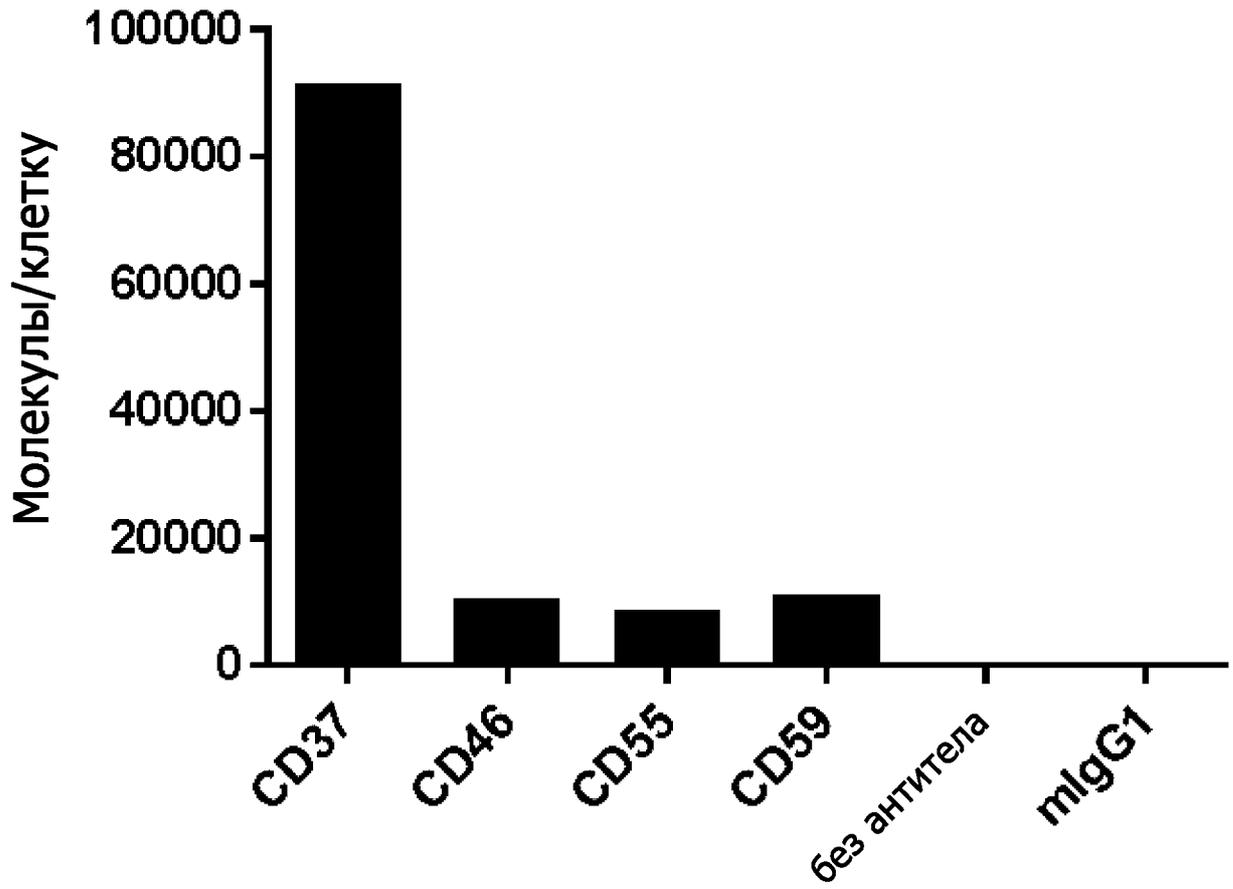
А



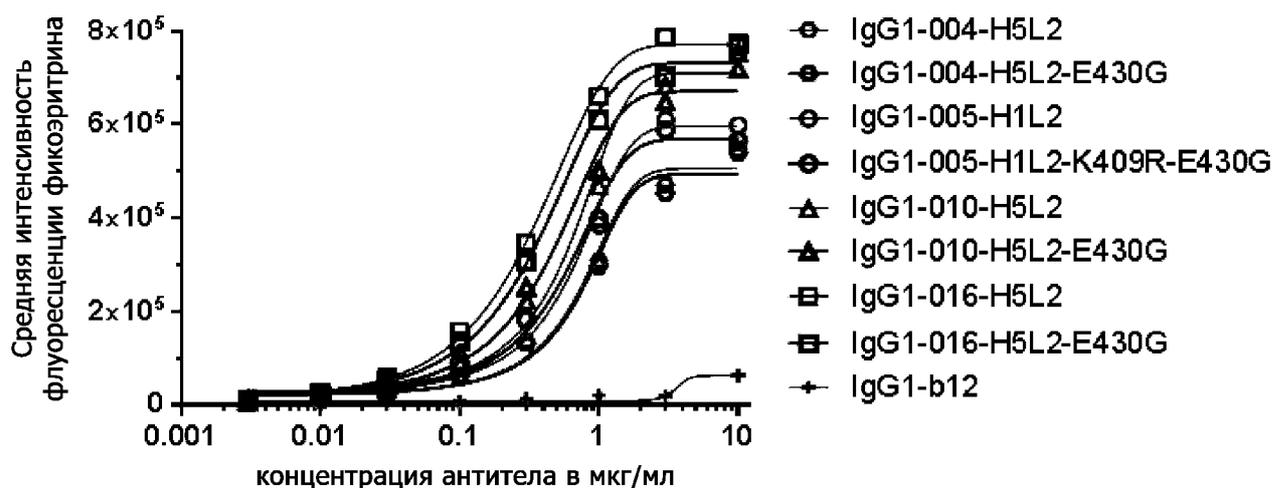
В



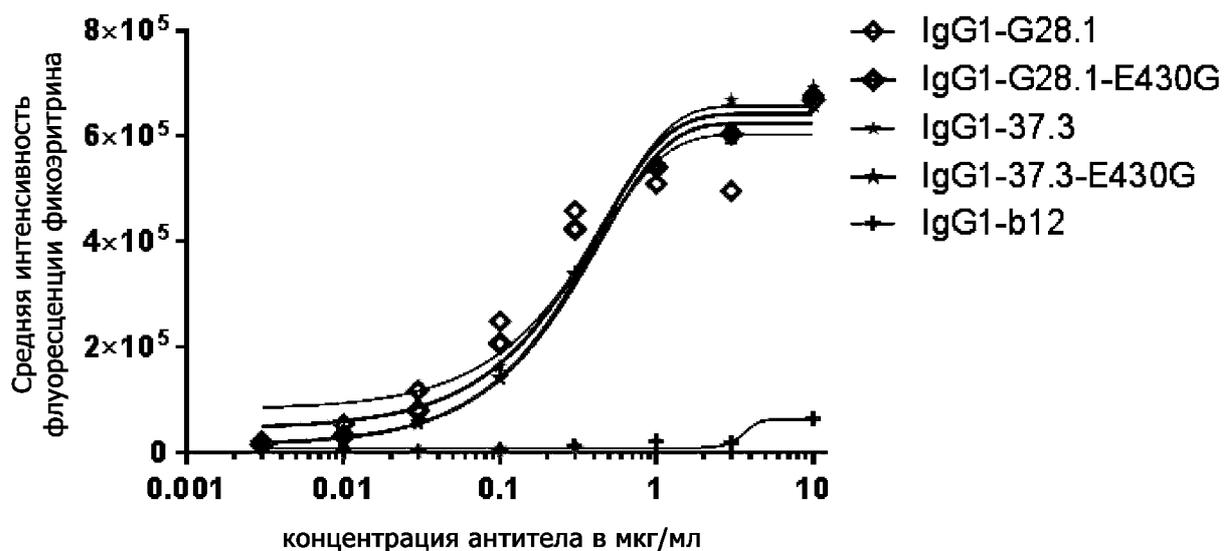
Фиг. 2



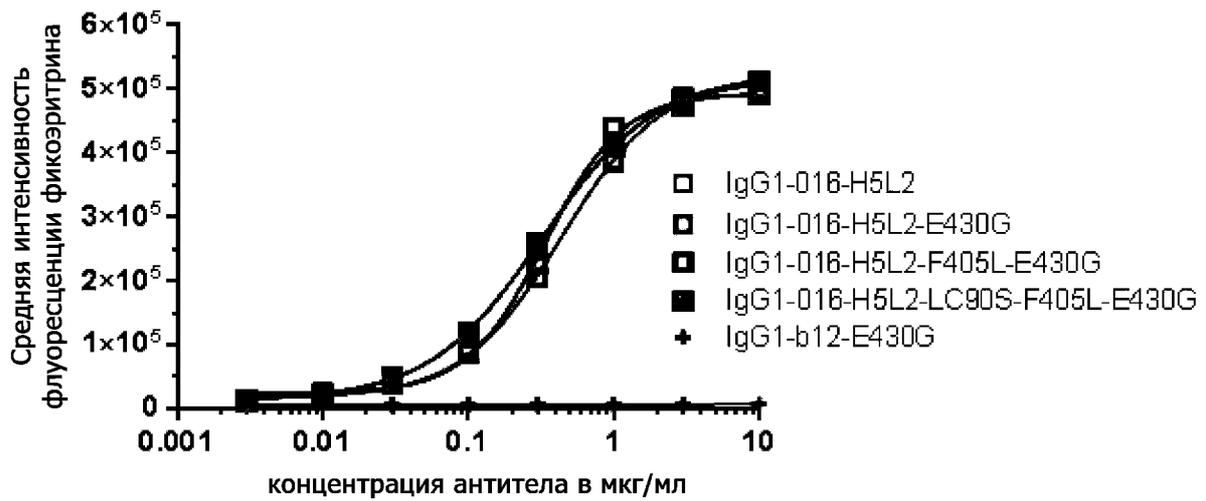
Фиг. 3



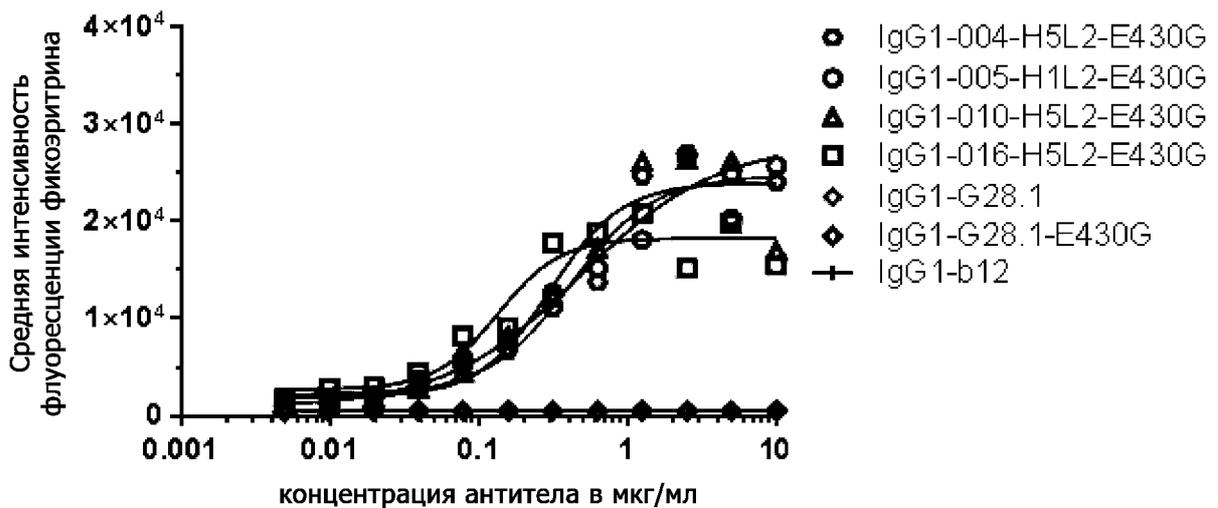
Фиг. 4



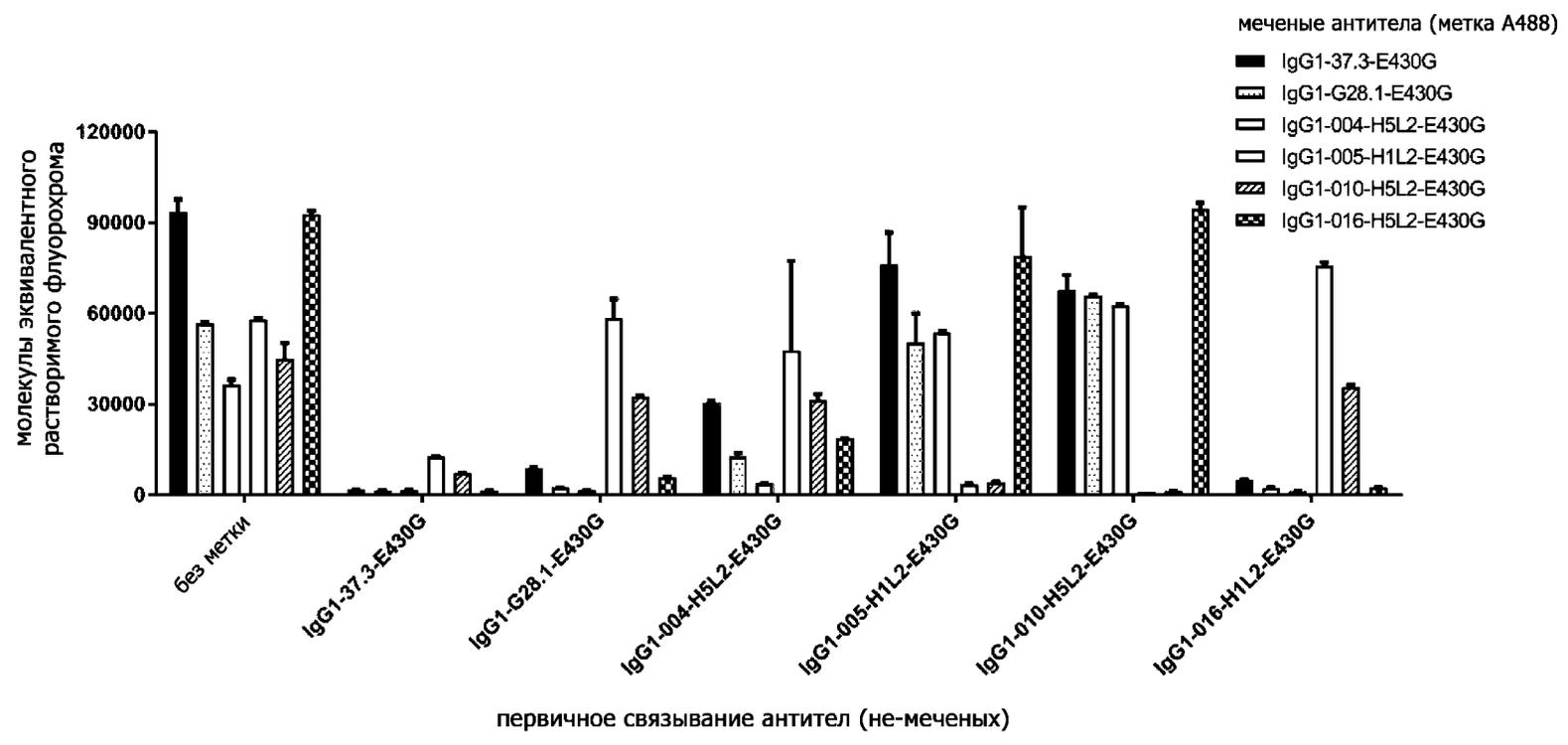
Фиг. 5



Фиг. 6

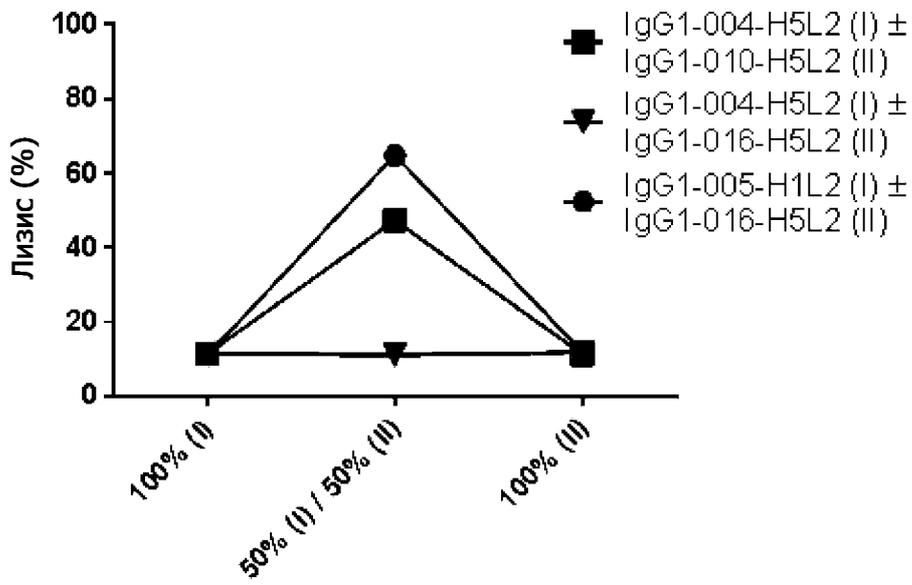


А  
ФИГ. 7

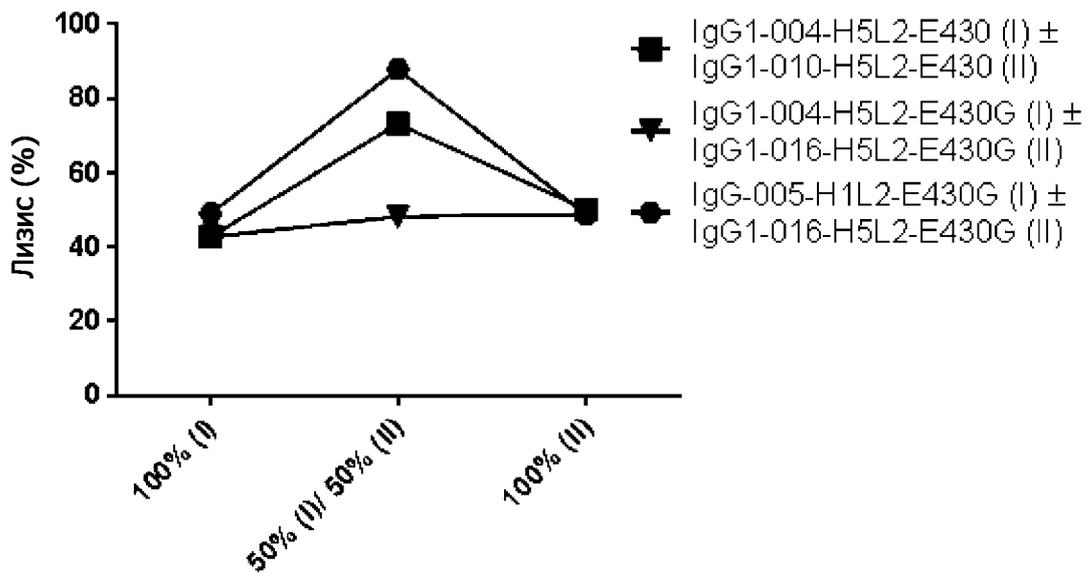


## Фиг. 7

B

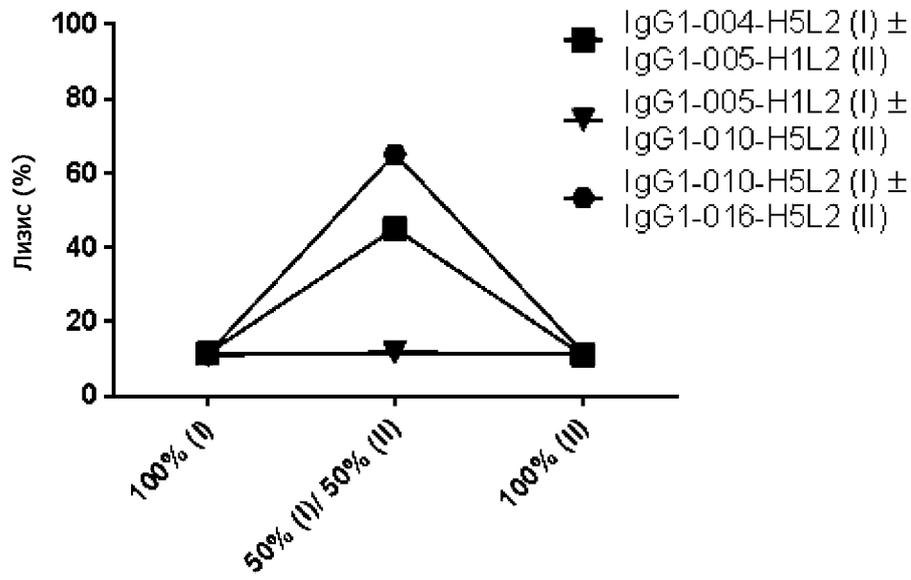


C

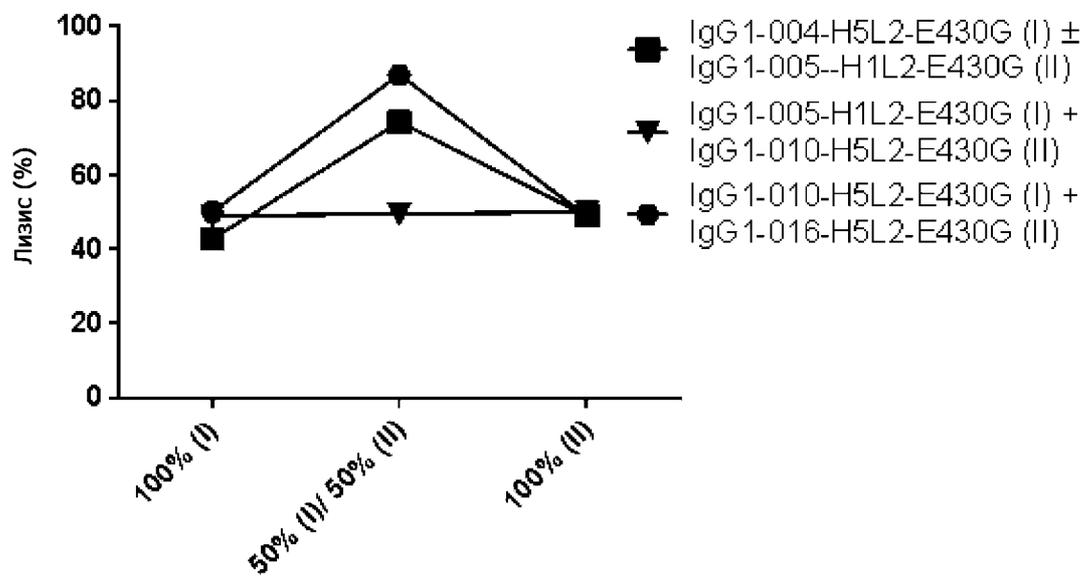


## Фиг. 7

D

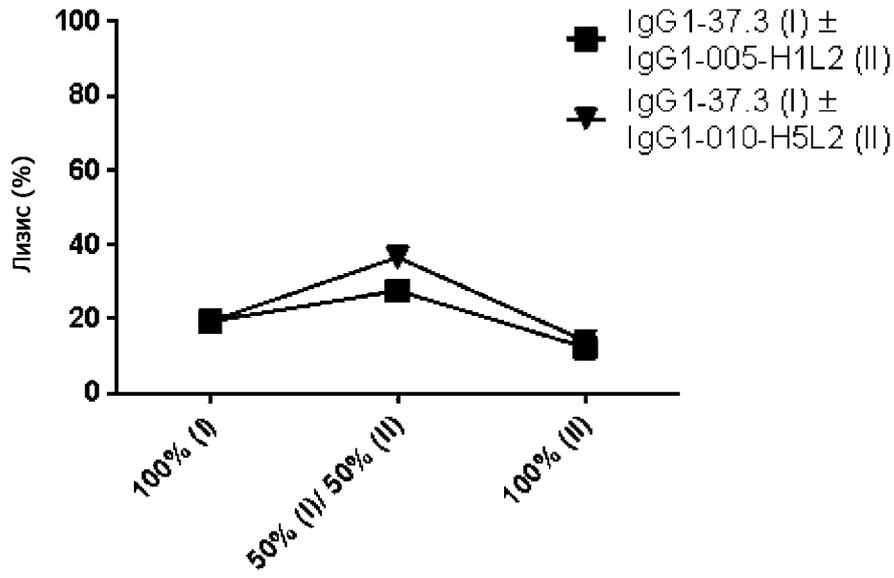


E

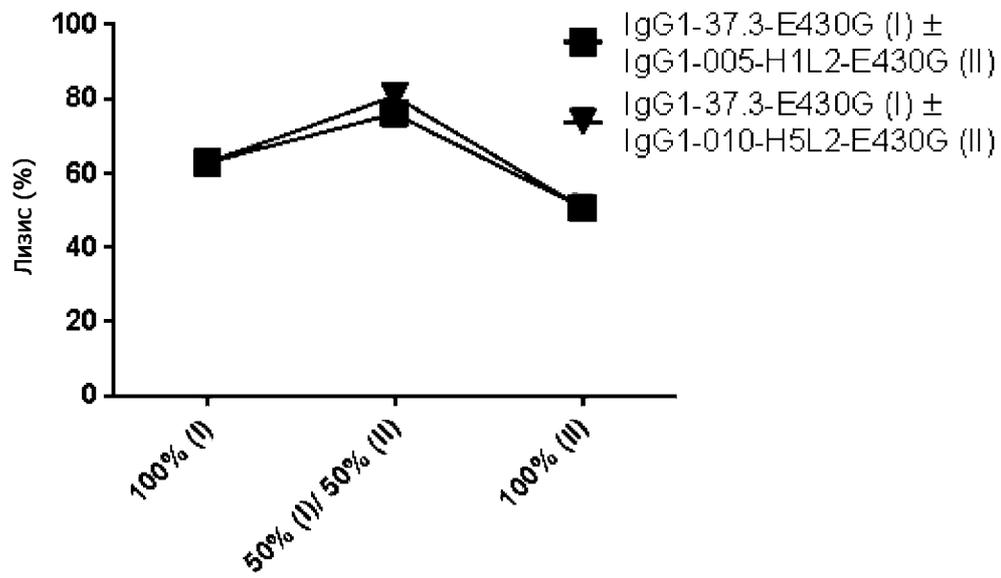


## Фиг. 7

F



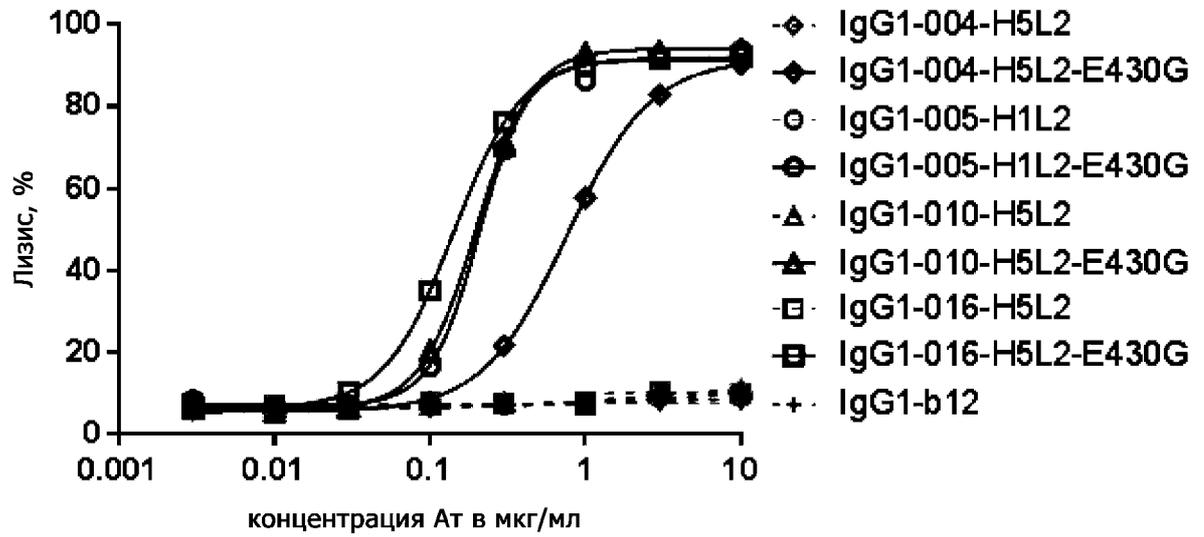
G



первичное связывающее Ат (без метки) антитела-зонды (меченые)	IgG1-37.3- E430G	IgG1-G28.1- E430G	IgG1-004- H5L2-E430G	IgG1-005- H1L2-E430G	IgG1-010- H5L2-E430G	IgG1-016- H5L2-E430G
IgG1-37.3-E430G						
IgG1-G28.1-E430G						
IgG1-004-H5L2-E430G						
IgG1-005-H1L2-E430G						
IgG1-010-H5L2-E430G						
IgG1-016-H5L2-E430G						

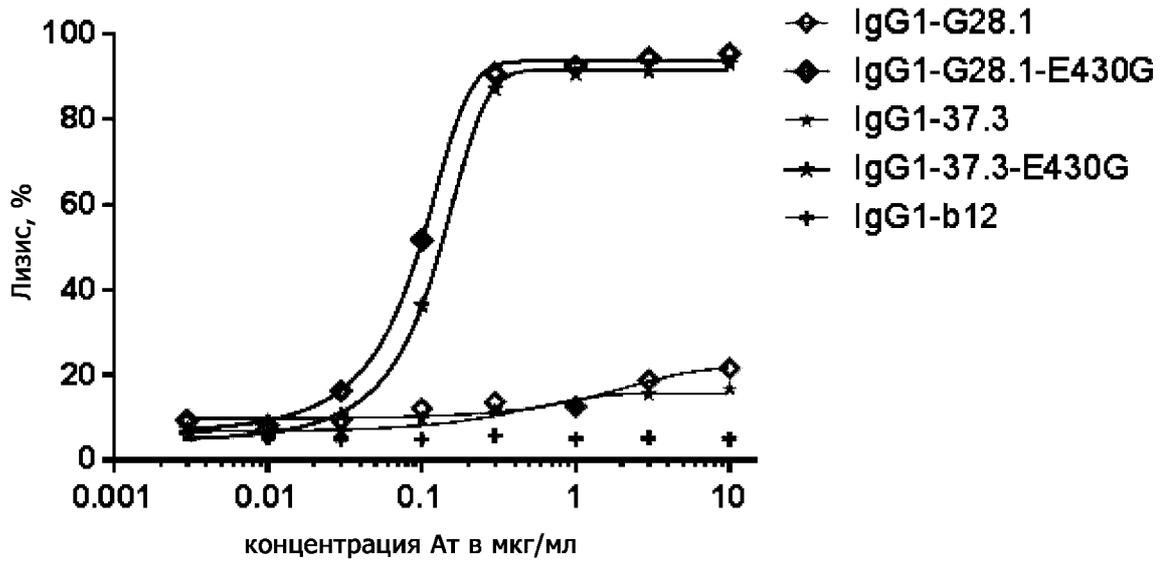
**Фиг. 8**

Фиг. 9

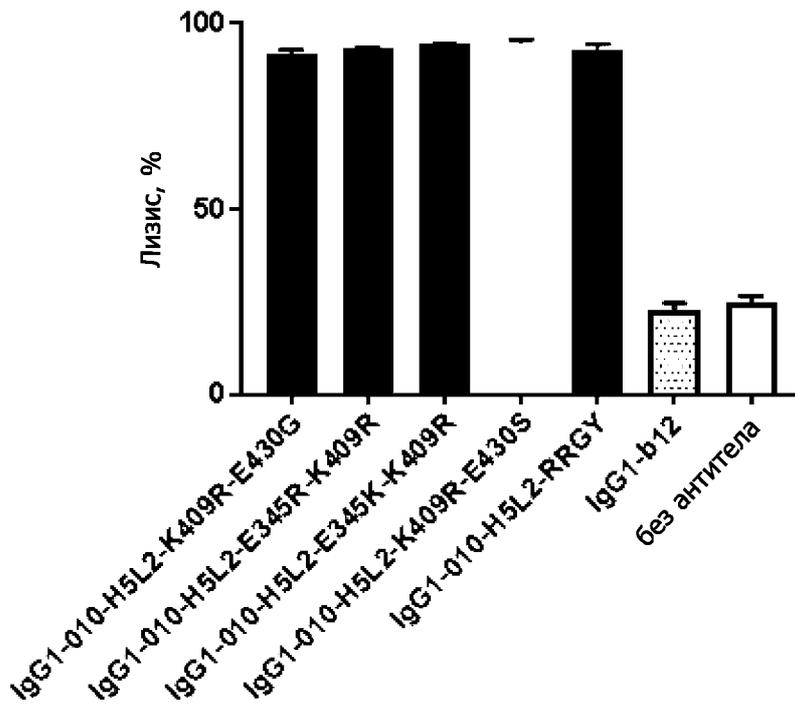


## Фиг. 10

А

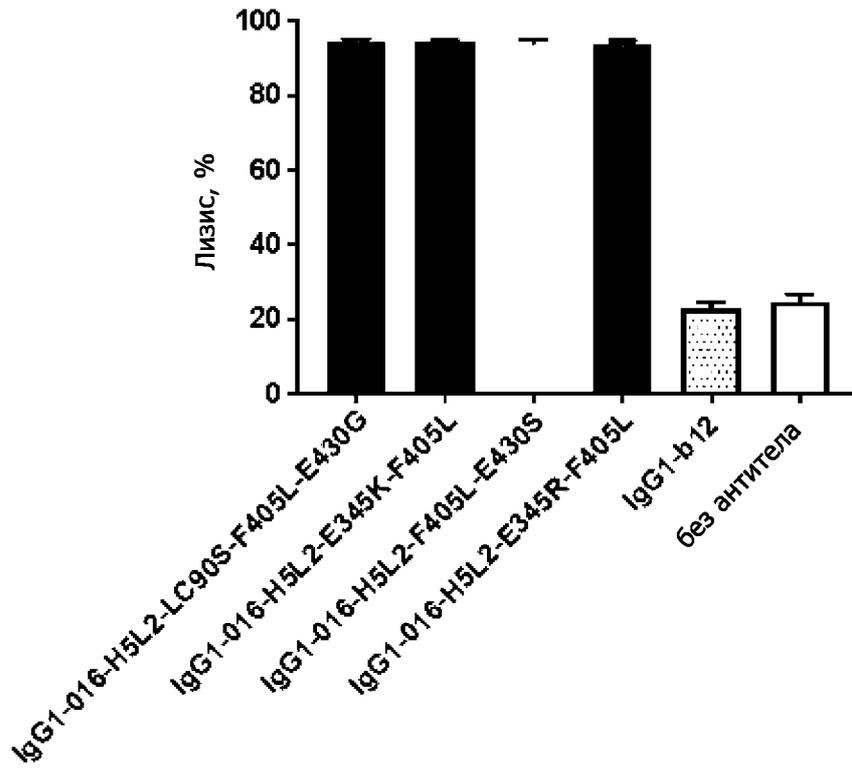


В

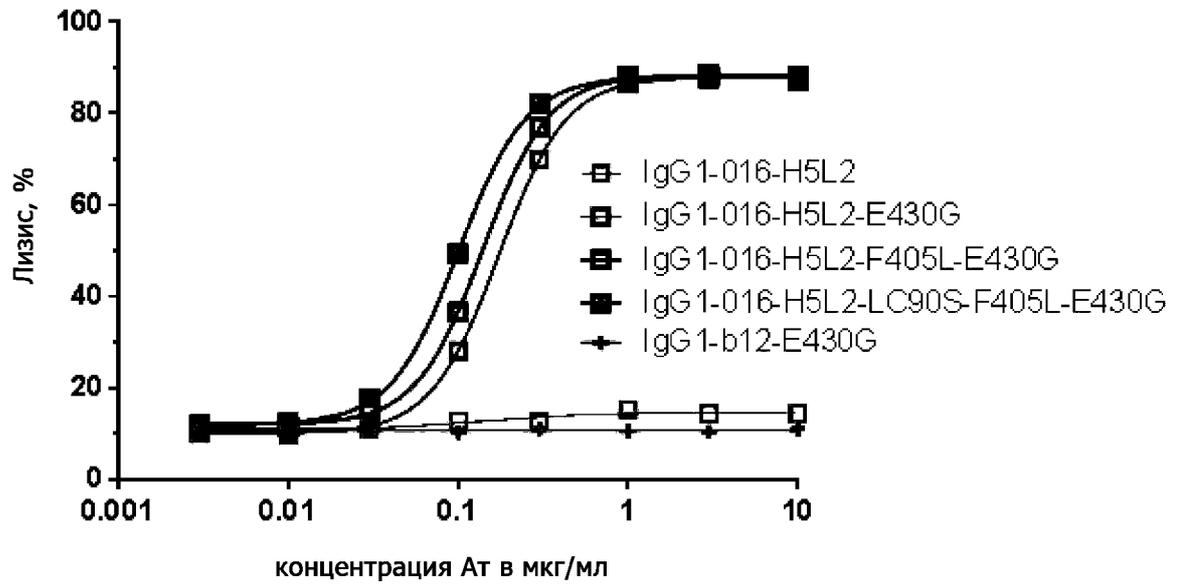


## Фиг. 10

с

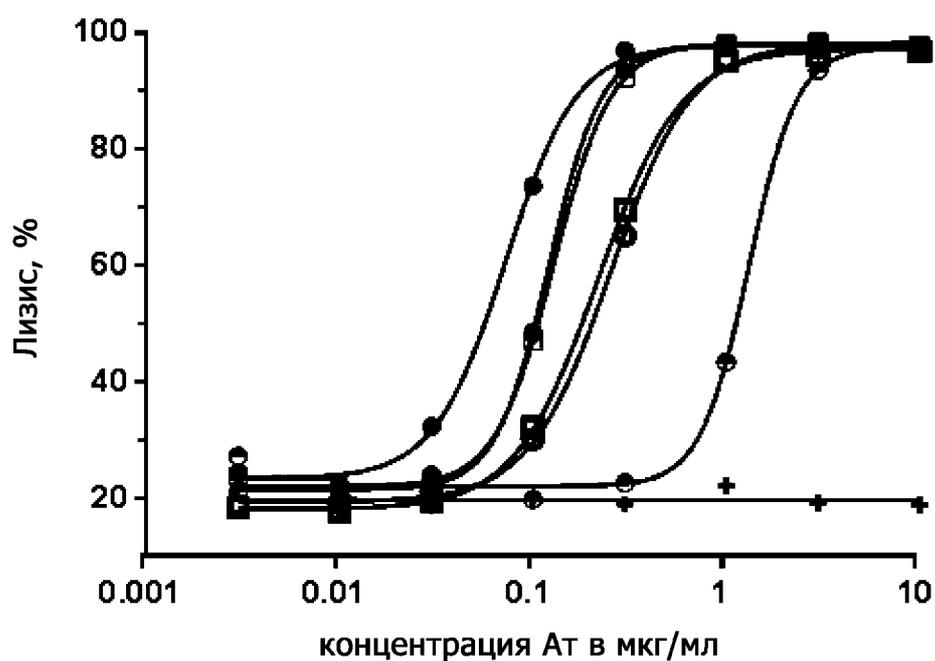


Фиг. 11



## Фиг. 12

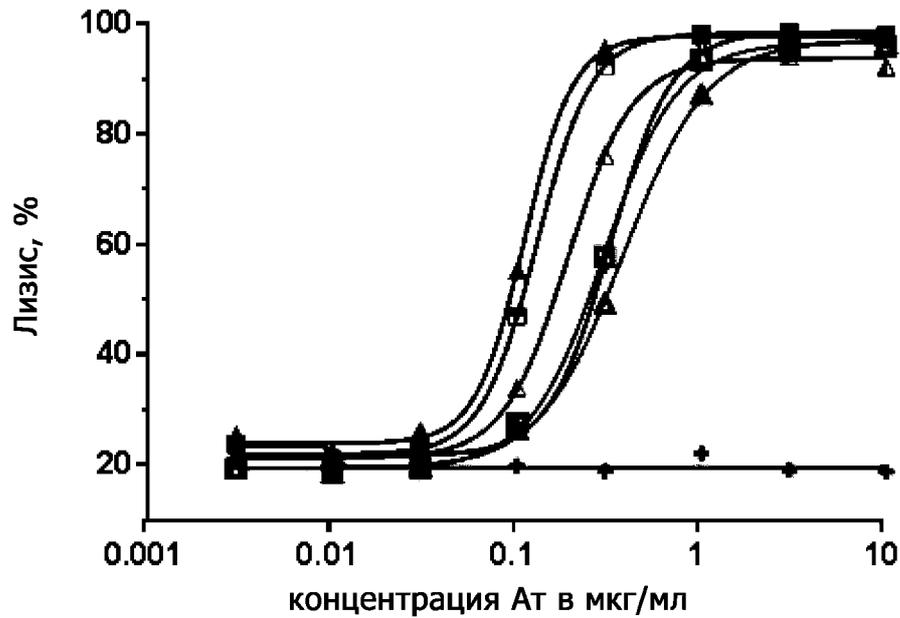
А



- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G
- IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- ⊖ IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G + IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- bslgG 1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- ⊖ bslgG 1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- bslgG 1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- + IgG 1-b12-E430G

## Фиг. 12

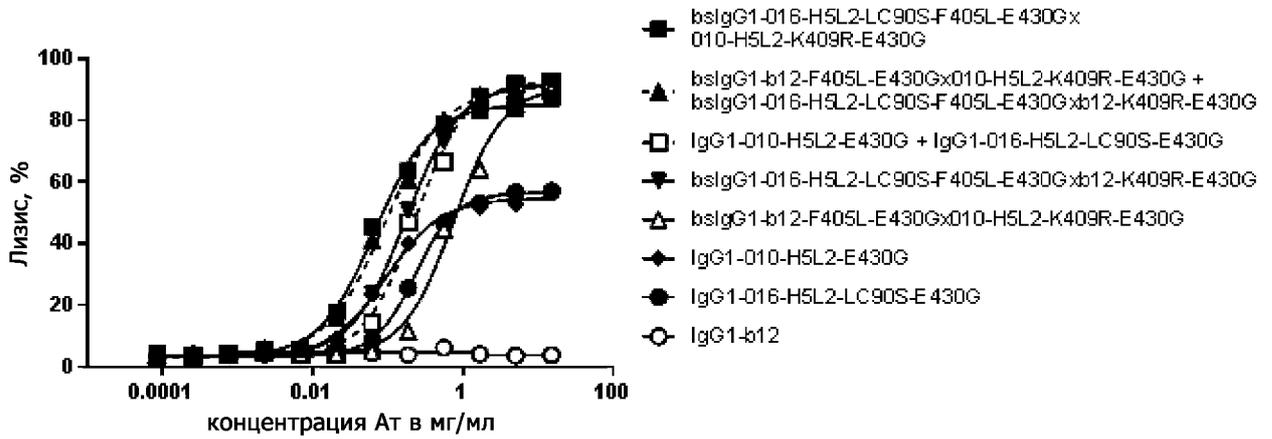
B



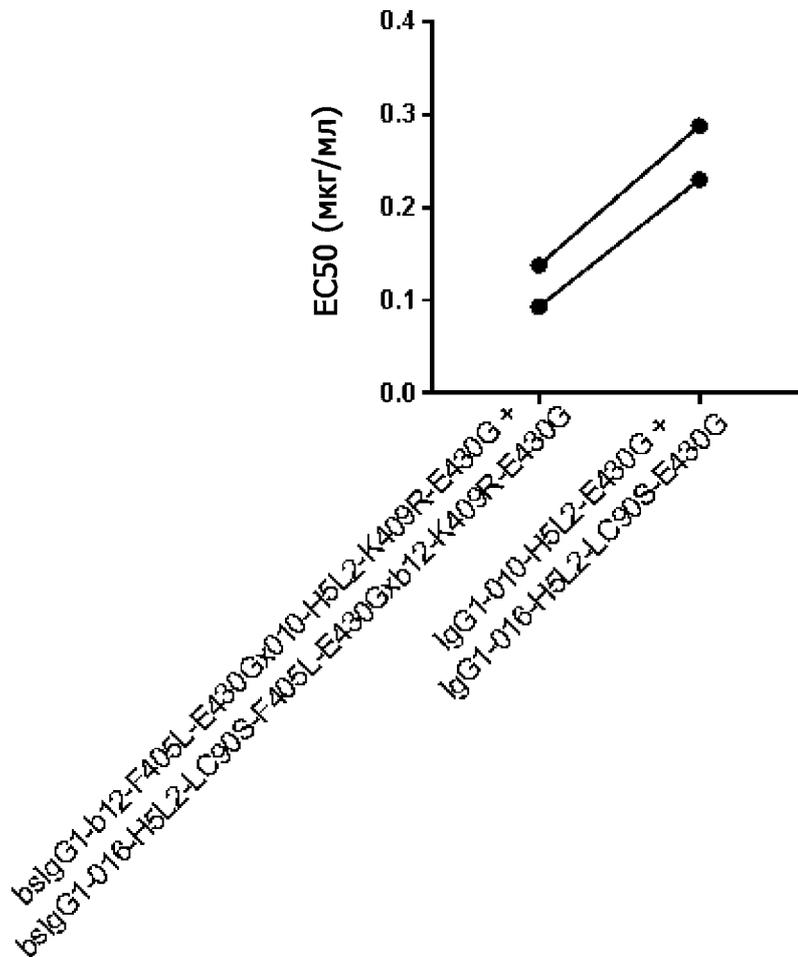
- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G
- IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G + IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- ▼ bslgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- + IgG1-b12-E430G

# Фиг. 12

с

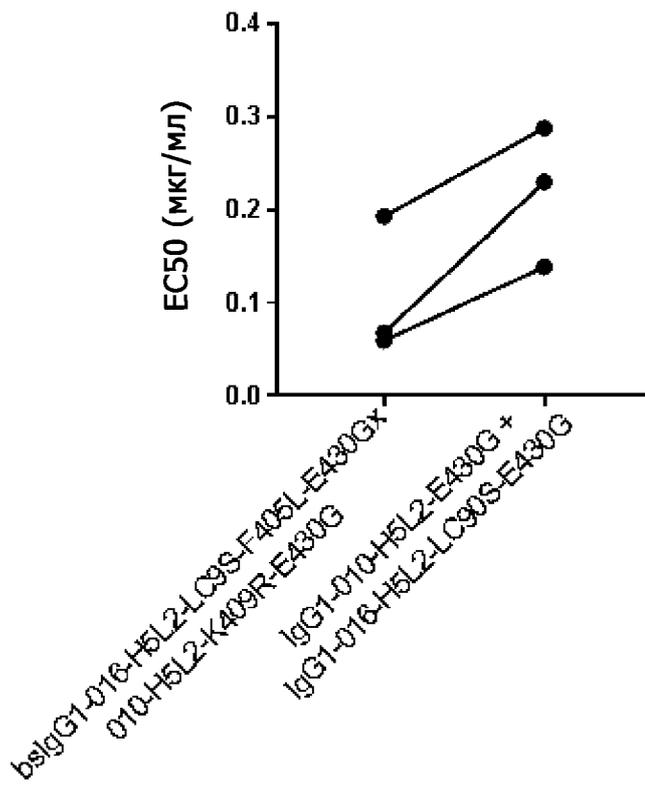


D



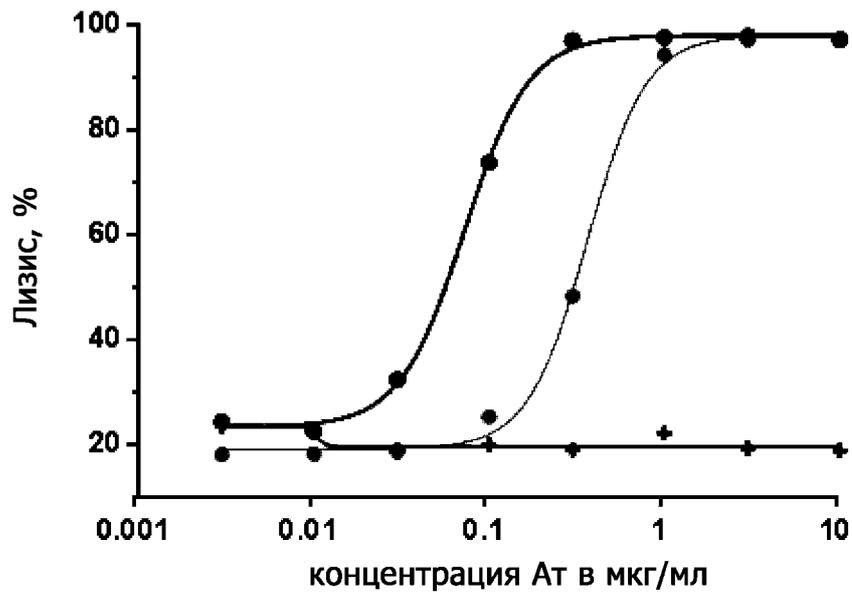
## Фиг. 12

E



## Фиг. 13

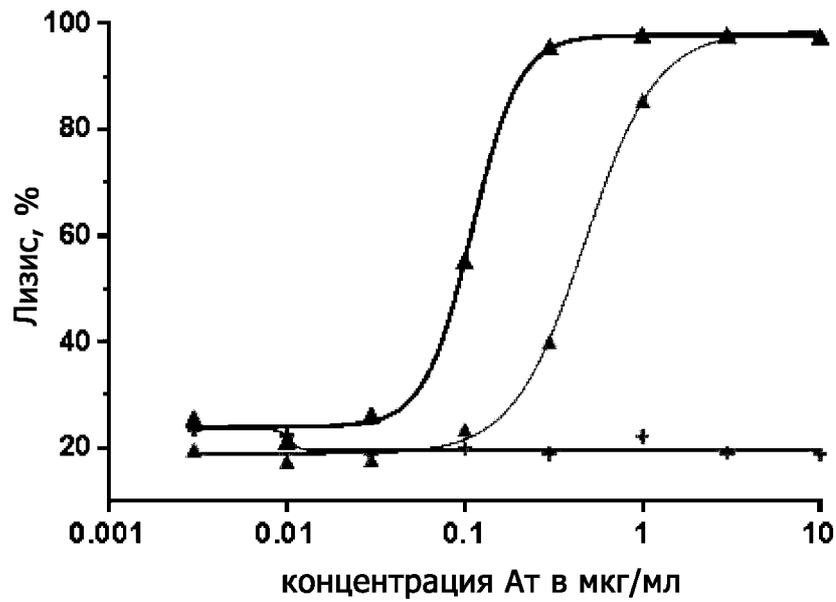
А



- bsIgG 1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- bsIgG 1-016-H5L2-F405Lx005-H1L2-K409R
- ✦ IgG1-b12-E430G

## Фиг. 13

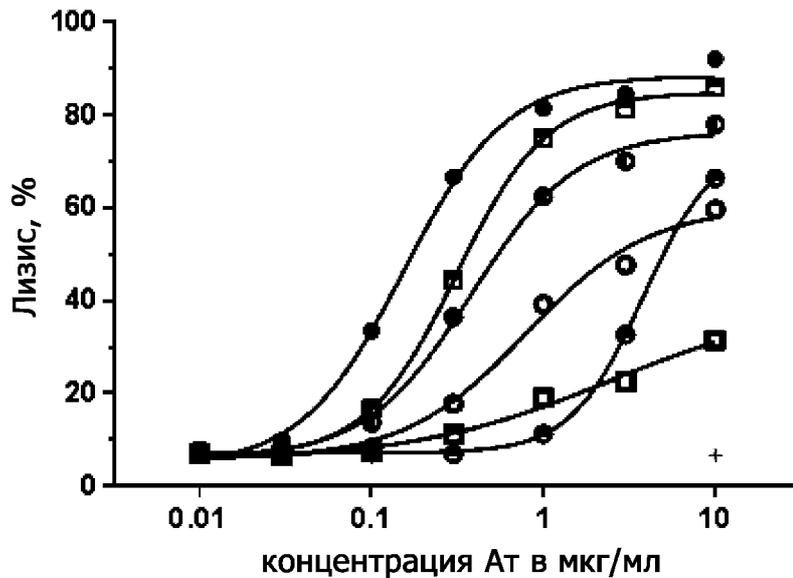
B



- ▲ bsIgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- ▲ bsIgG1-016-H5L2-F405Lx010-H5L2-K409R
- + IgG1-b12-E430G

## Фиг. 14

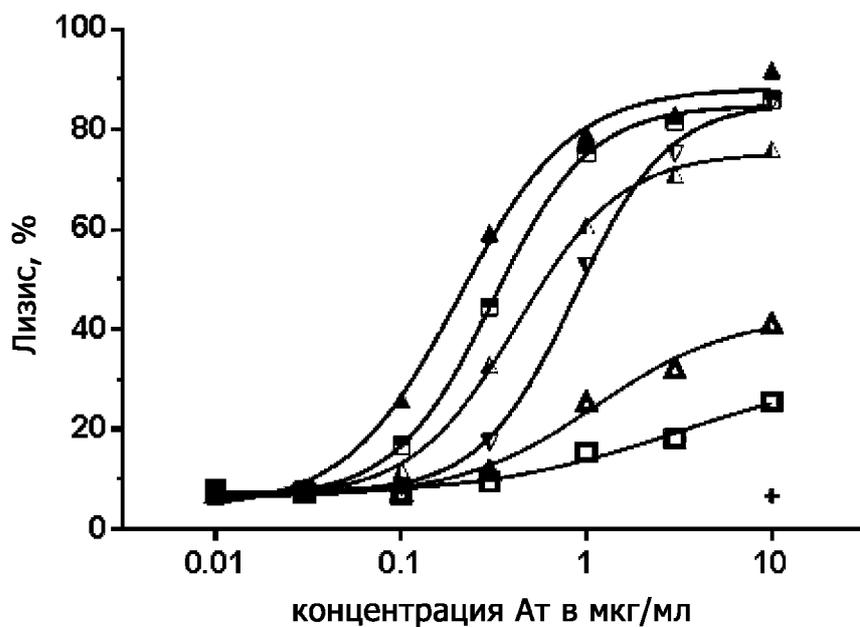
А



- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G
- IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G + IgG1-016-H5L2-F405L-E430G
- bslg1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- bslg1-b12-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- bslg1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- + IgG 1-b12-E430G

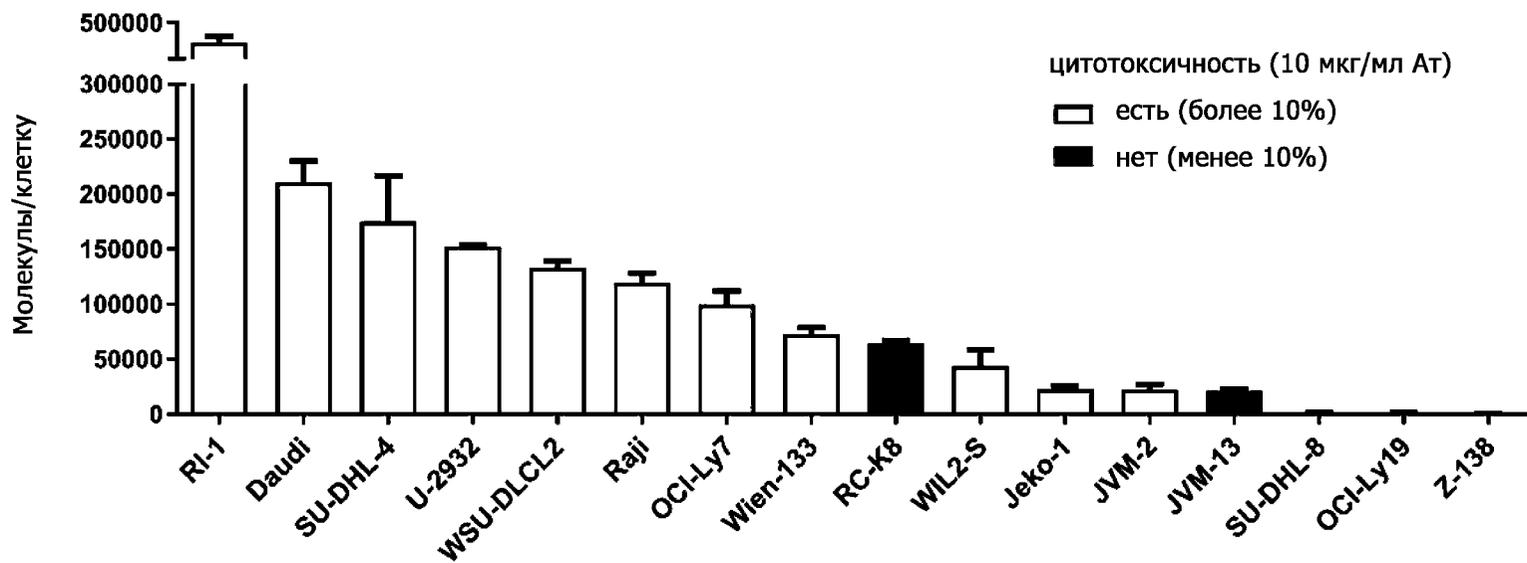
## Фиг. 14

B



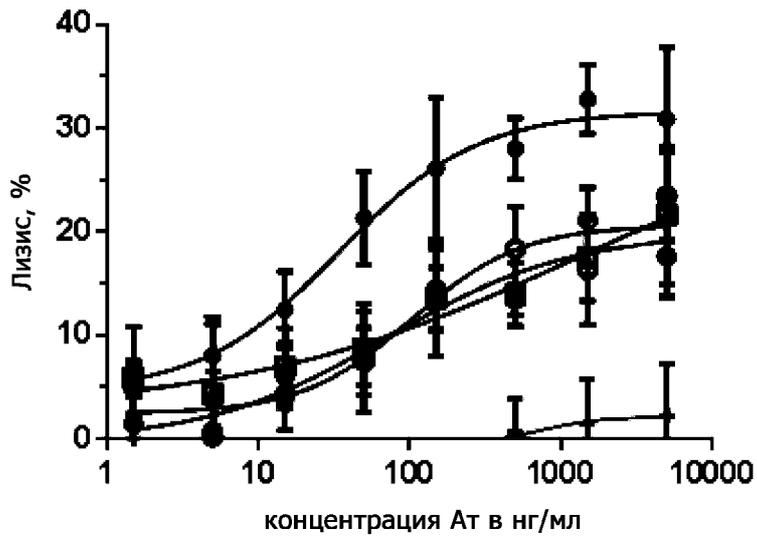
- ▲ IgG1-010-H5L2-E430G
- IgG1-016-H5L2-E430G
- ★ IgG1-010-H5L2-E430G + IgG1-016-H5L2-E430G
- ▲ bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- ▼ bslgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- + IgG1-b12

Фиг. 15



## Фиг. 16

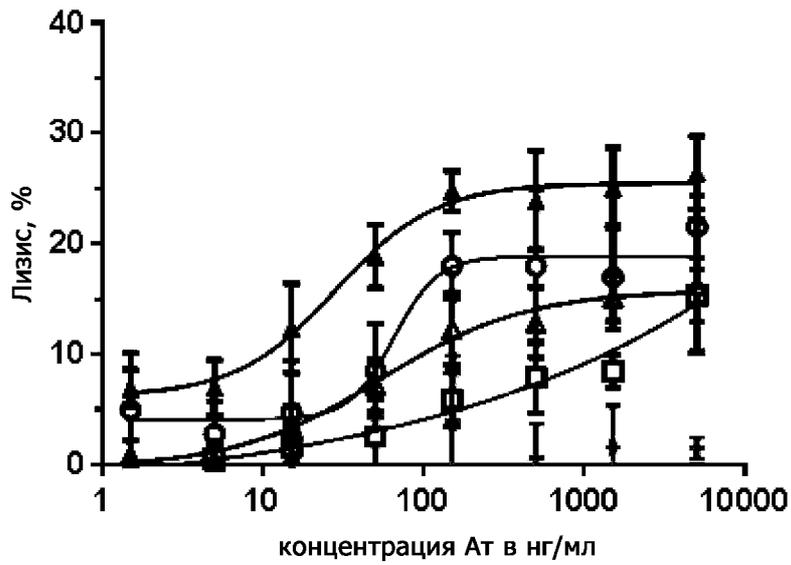
А



- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G
- IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- IgG 1-005-H1L2-K409R-E430G + IgG 1-016-H5L2-F405L-E430G
- bsIgG 1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx005-H1L2-K409R-E430G
- + IgG 1-b12-E430G

## Фиг. 16

B



○ IgG1-010-H5L2-E430G

□ IgG1-016-H5L2-E430G

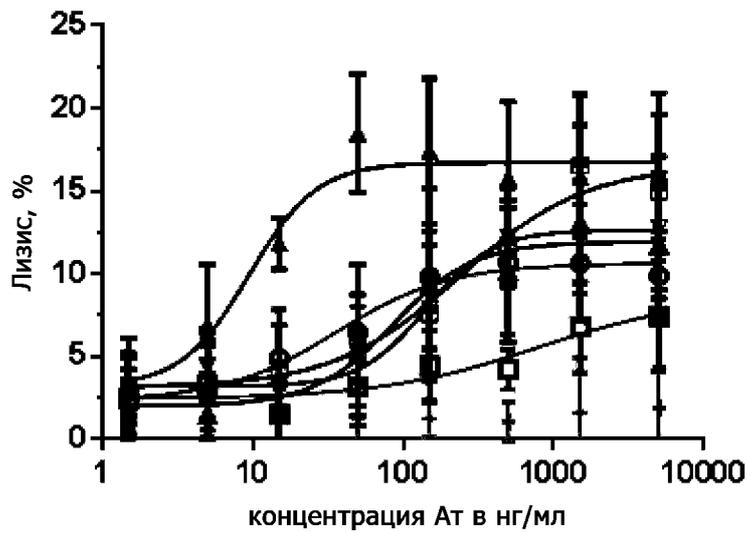
△ IgG1-010-H5L2-E430G + IgG1-016-H5L2-E430G

▲ bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G

+ IgG1-b12-E430G

## Фиг. 16

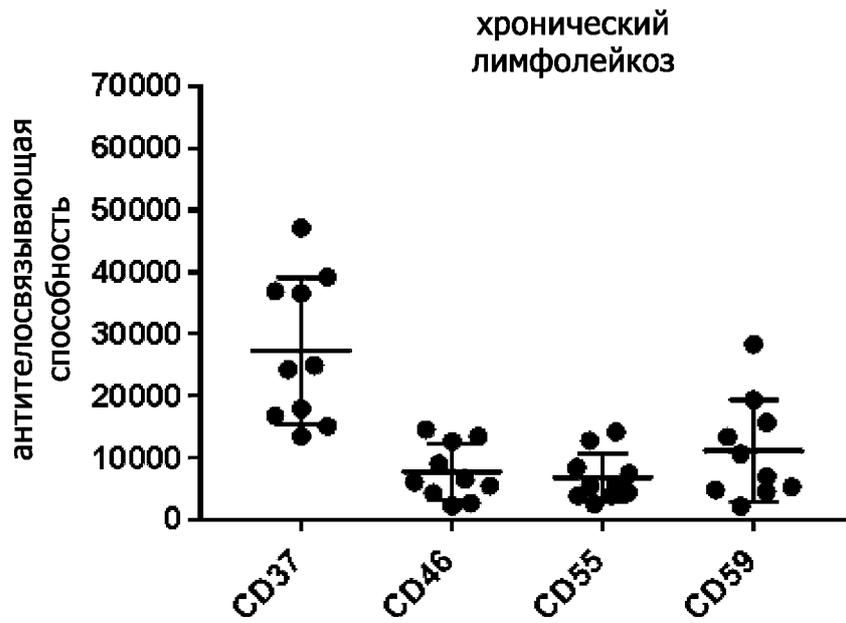
с



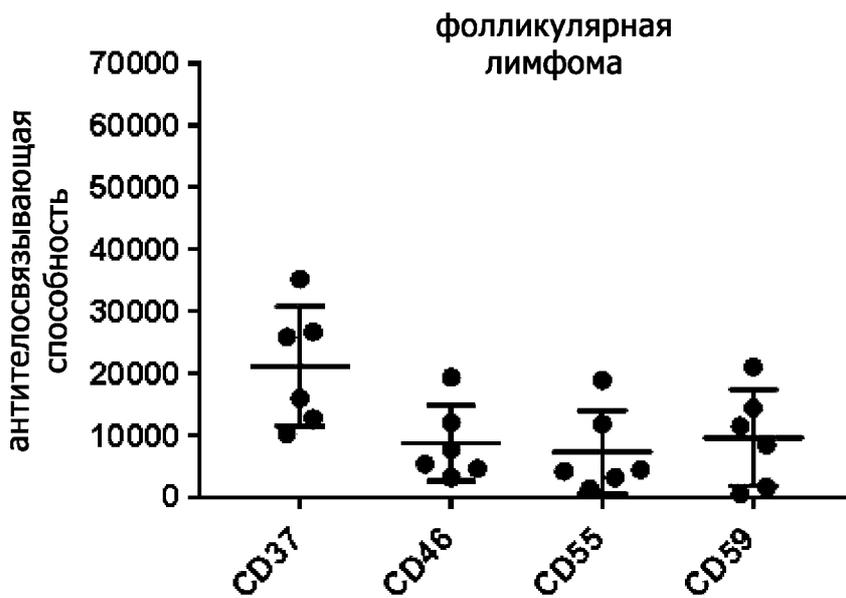
- IgG 1-010-H5L2-E430G
- IgG 1-016-H5L2-E430G
- ▲ IgG 1-010-H5L2-E430G + IgG 1-016-H5L2-E430G
- ▼ bslgG1-b12-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gxb12-K409R-E430G
- ▲ bslgG1-016-H5L2-LC90S-F405L-E430Gx010-H5L2-K409R-E430G
- + IgG 1-b12-E430G

Фиг. 17

А

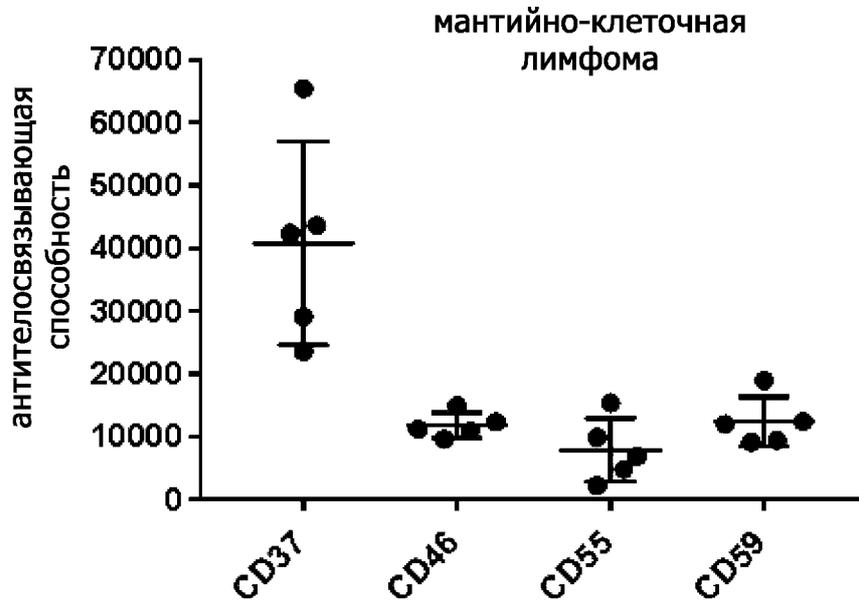


Б

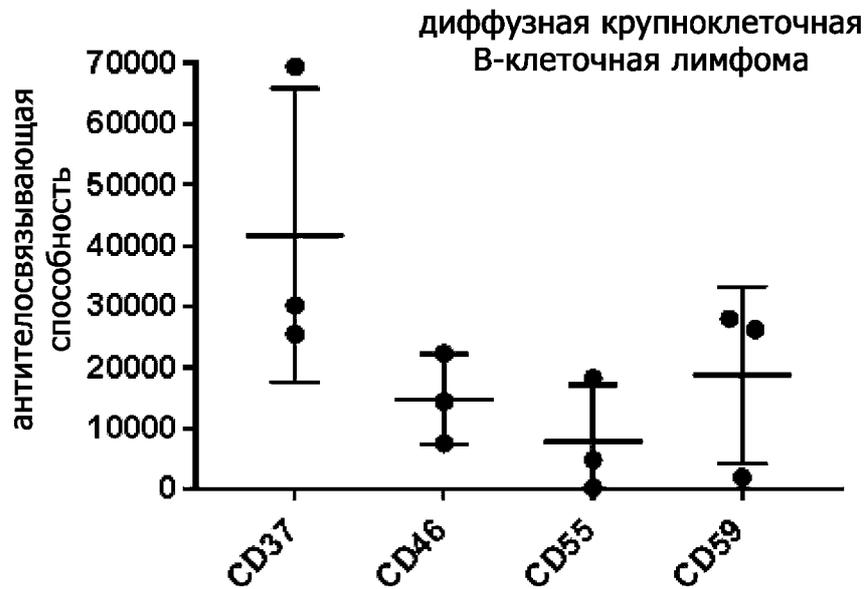


Фиг. 17

с

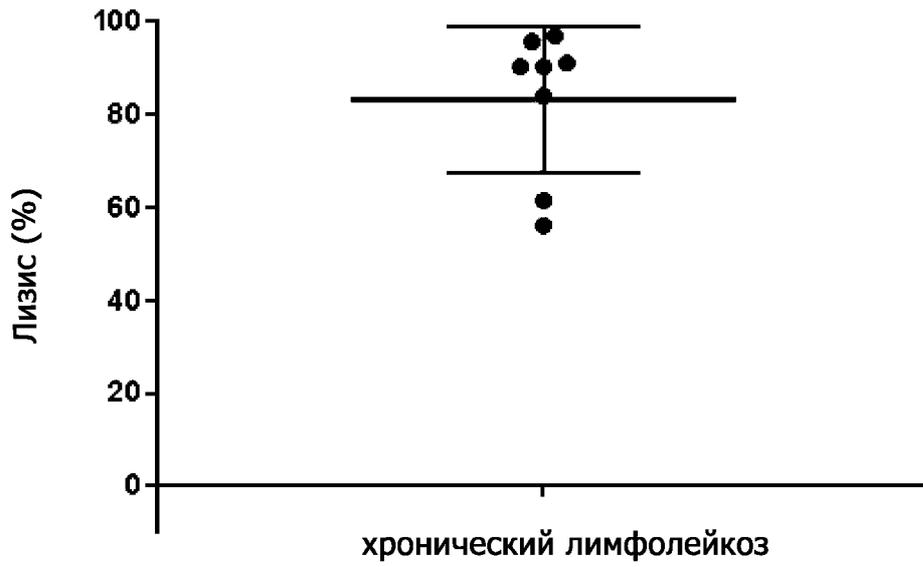


D

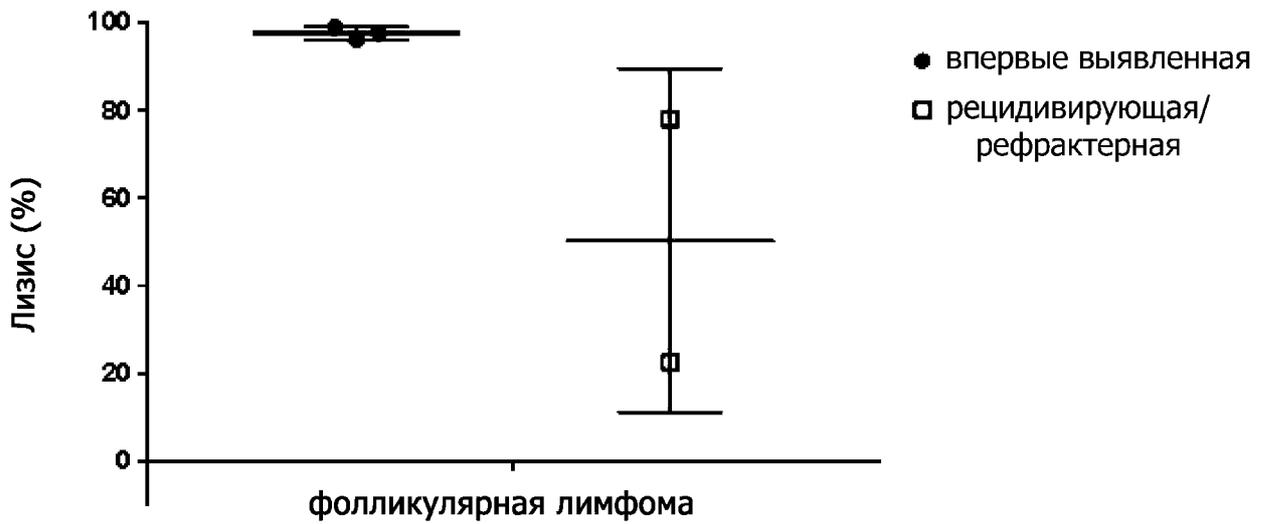


# Фиг. 18

A

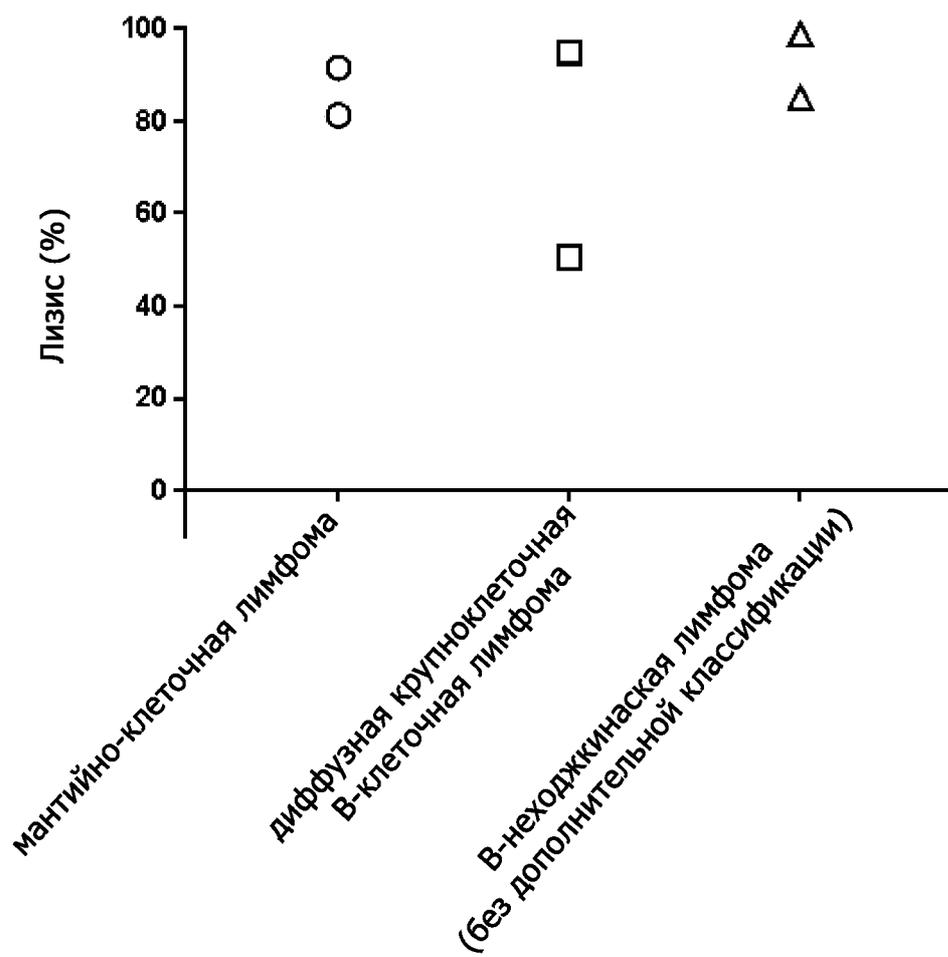


B



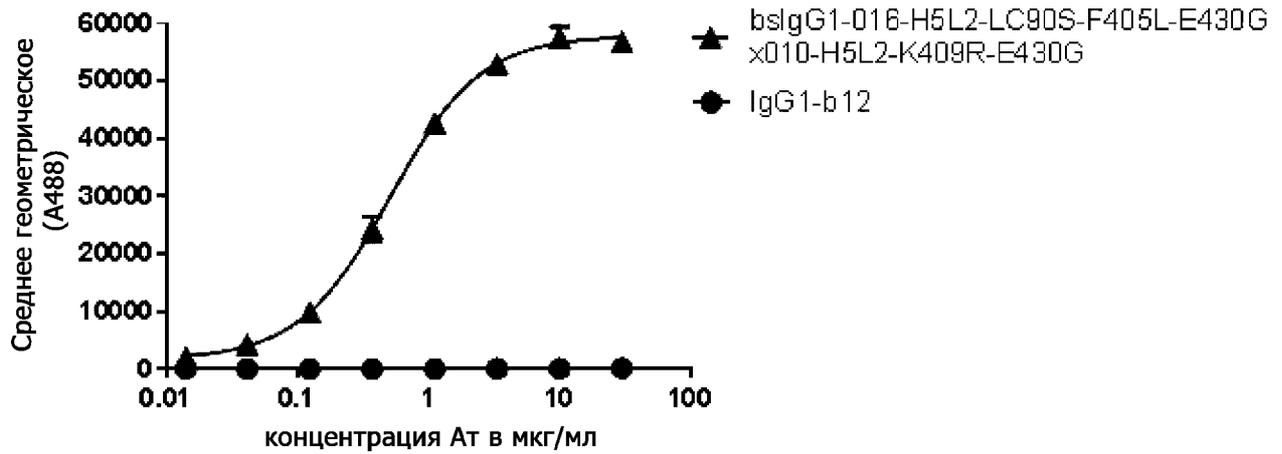
Фиг. 18

с

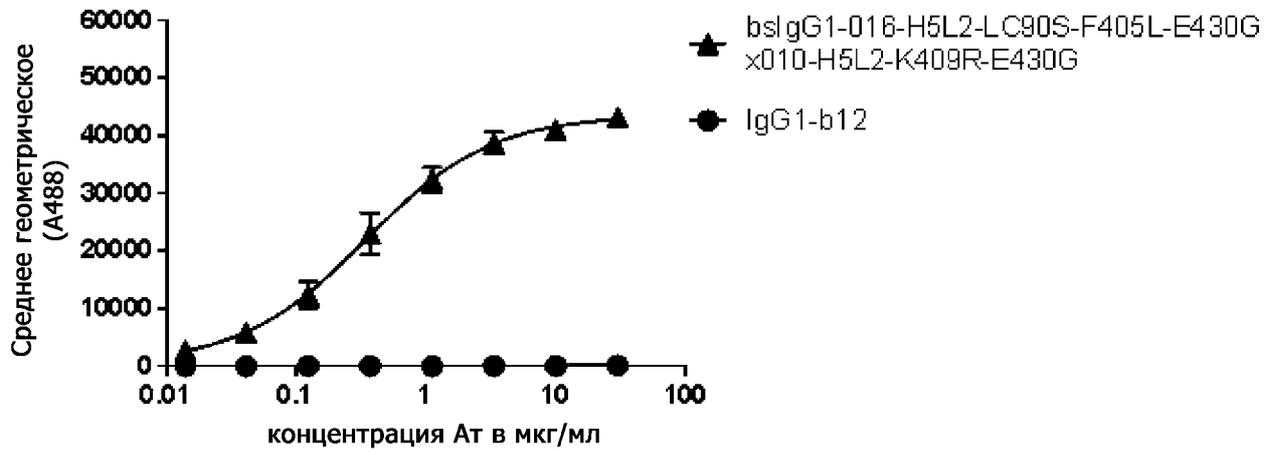


## Фиг. 19

А

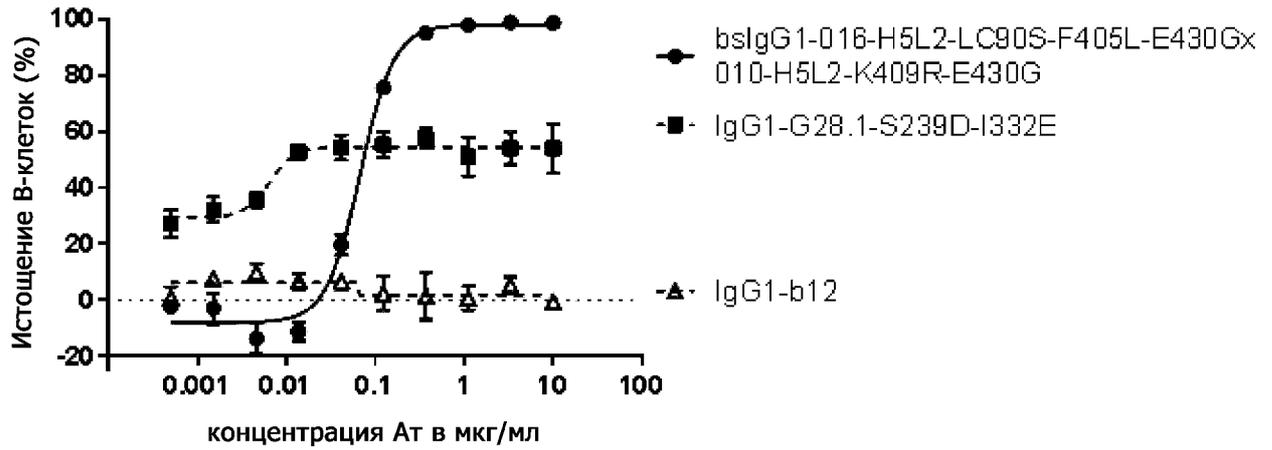


В

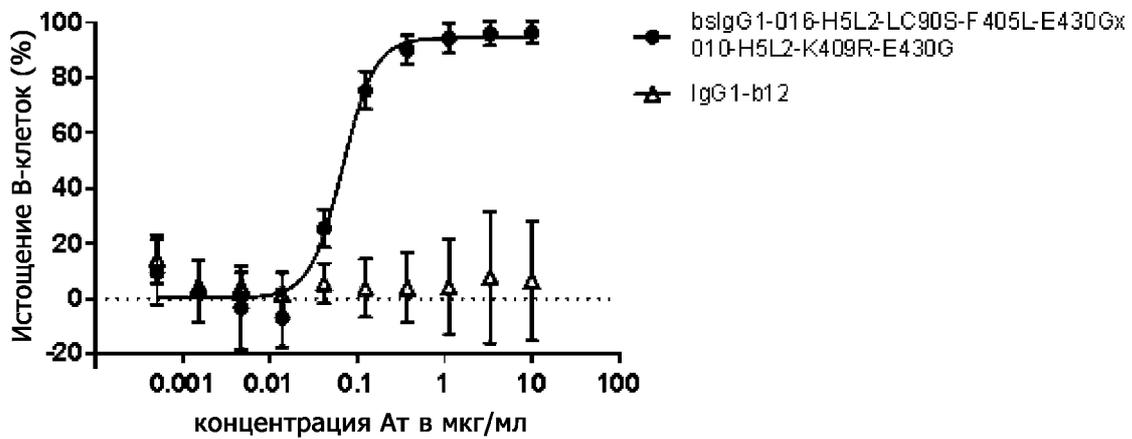


## Фиг. 20

А

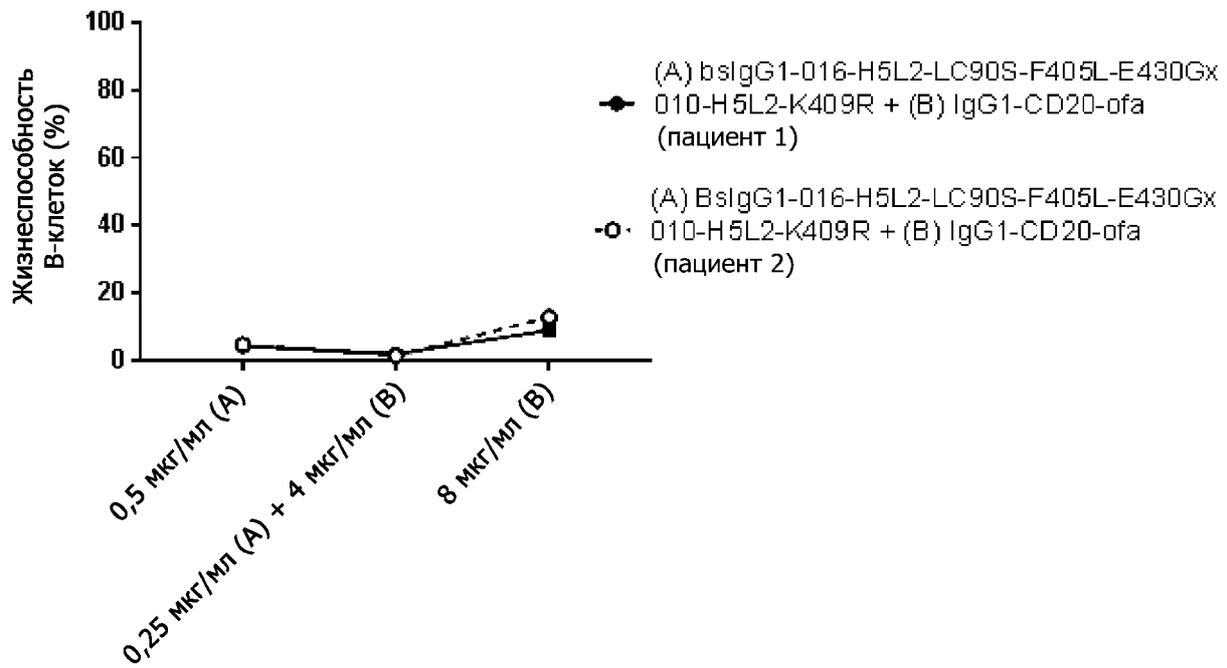


В

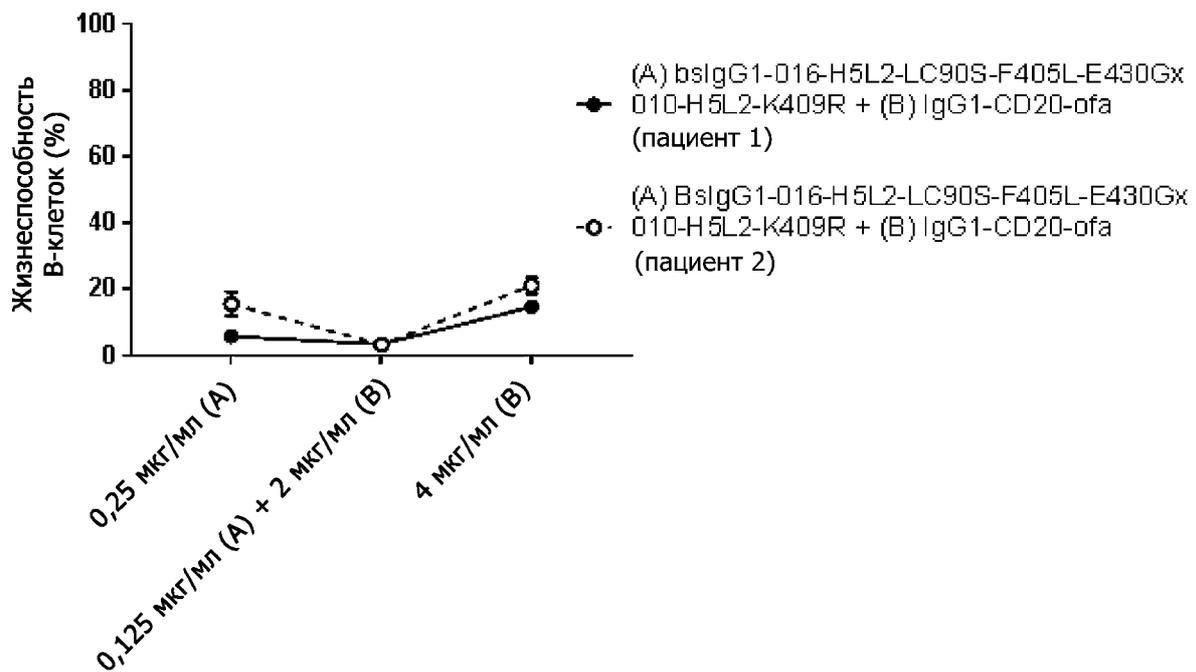


# Фиг. 21

**A**

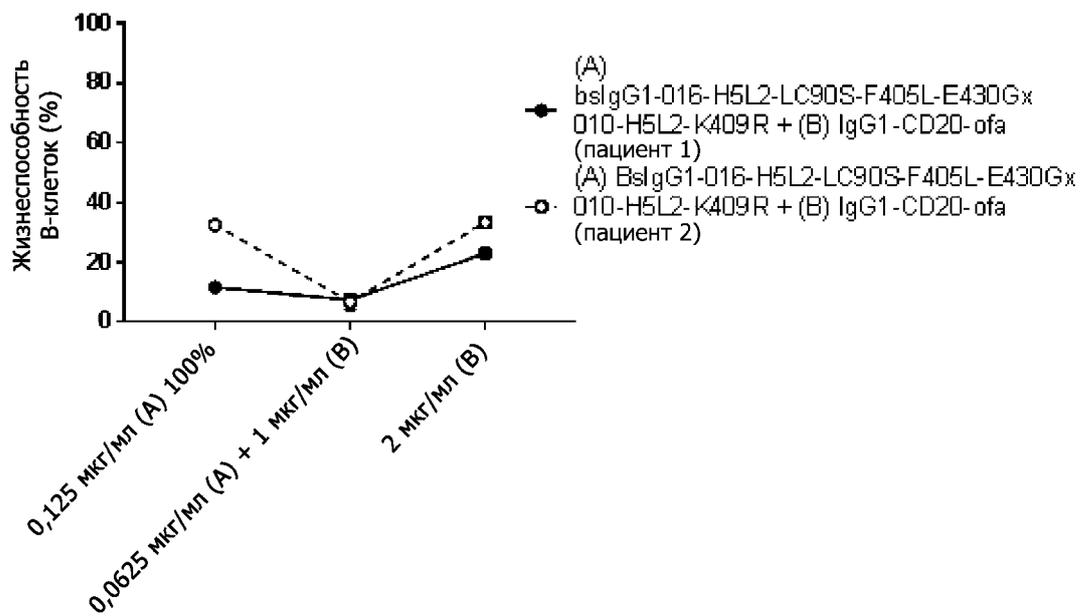


**B**

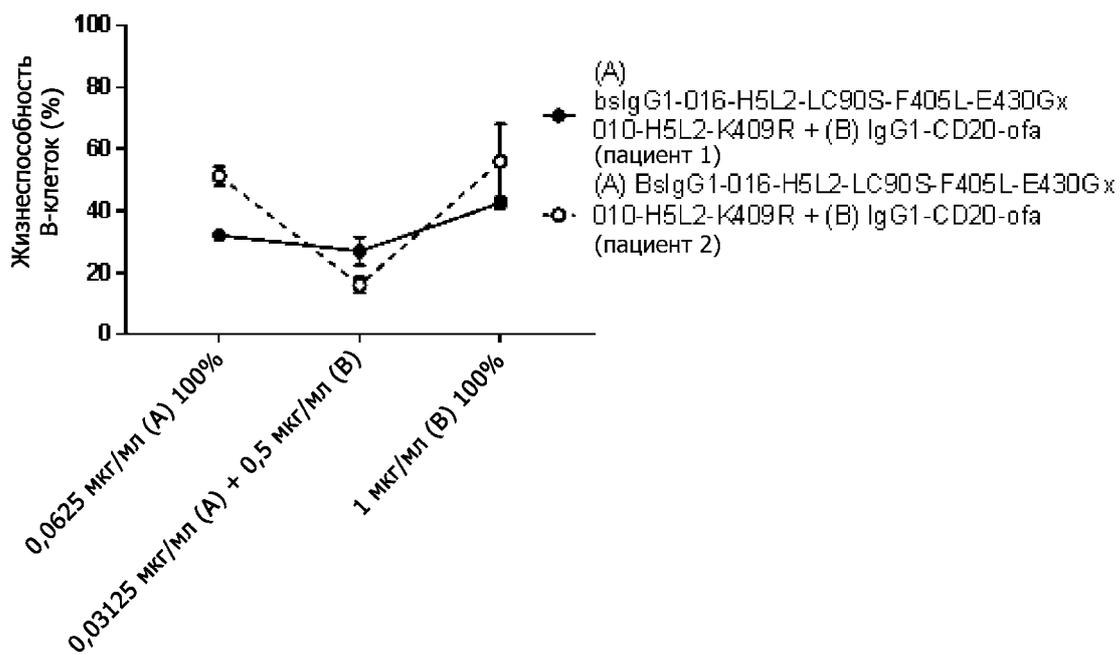


## Фиг. 21

с

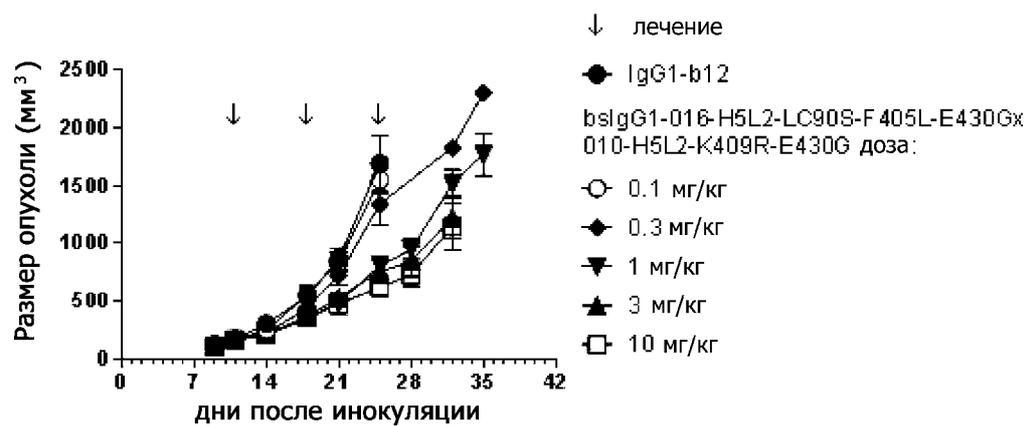


D

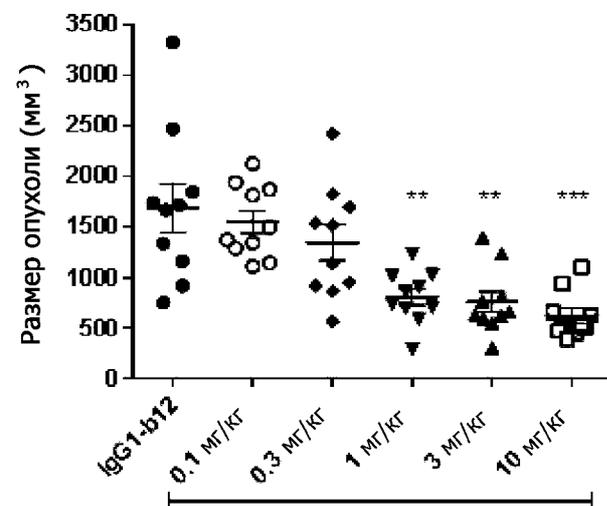


# Фиг. 22

**А**

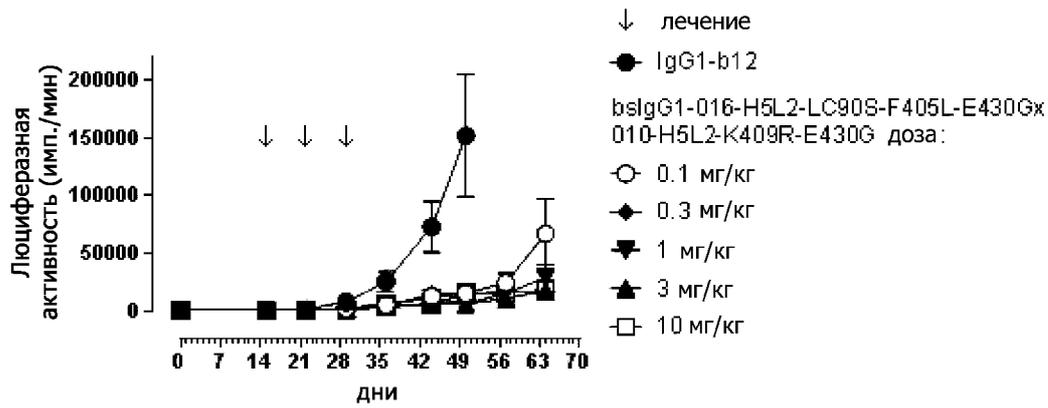


**В**

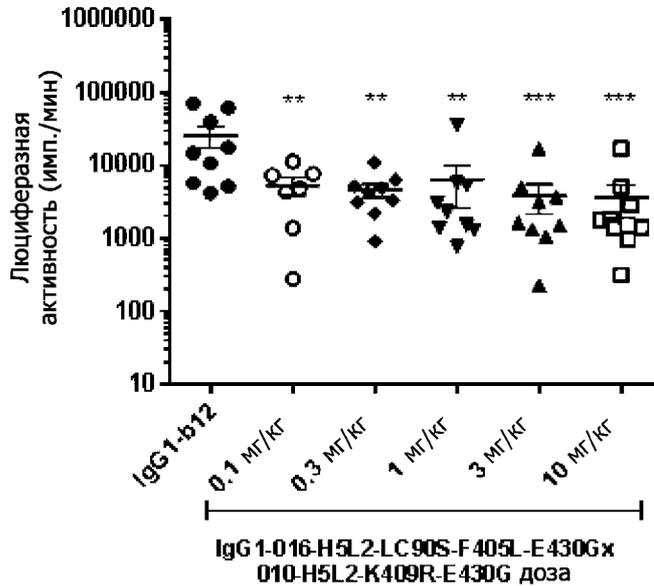


# Фиг. 23

**A**

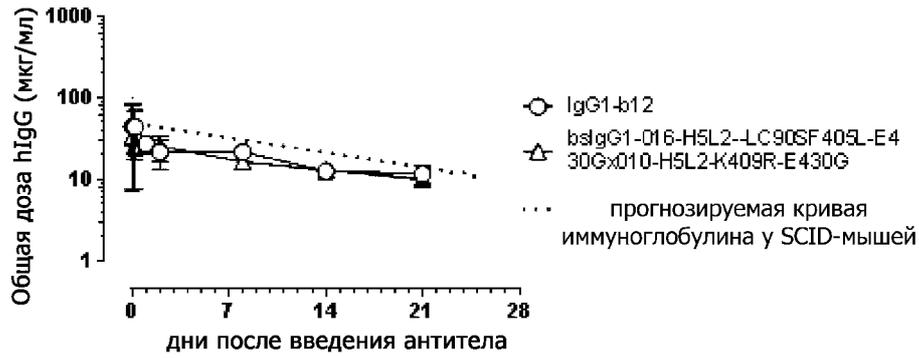


**B**

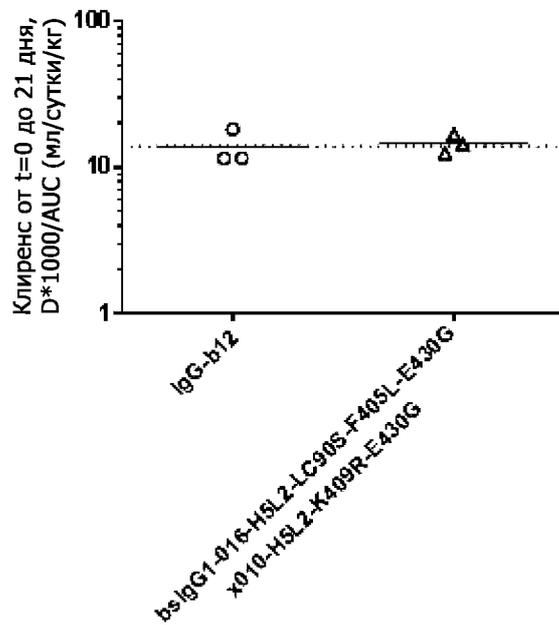


# Фиг. 24

А

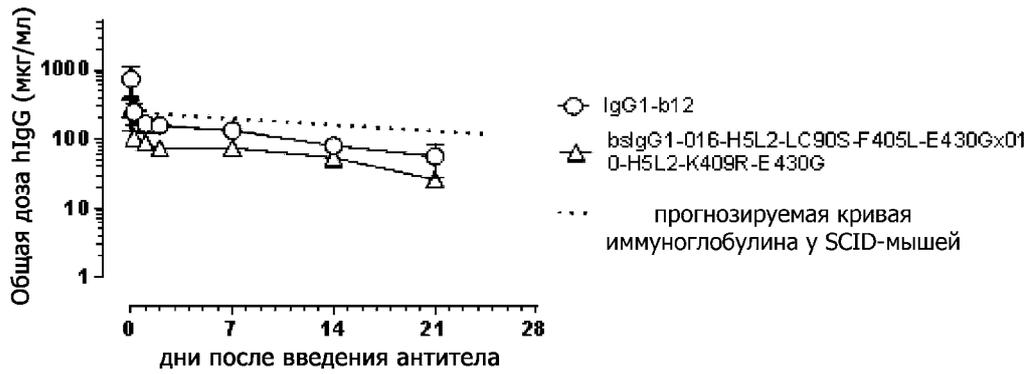


В

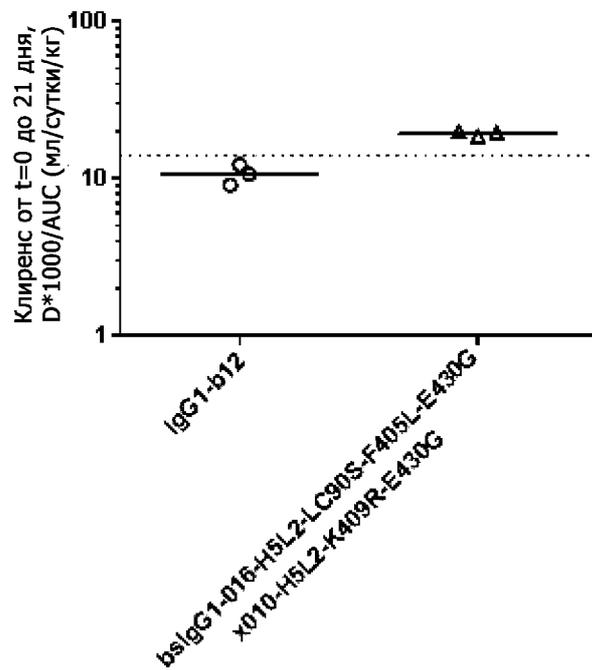


## Фиг. 24

С

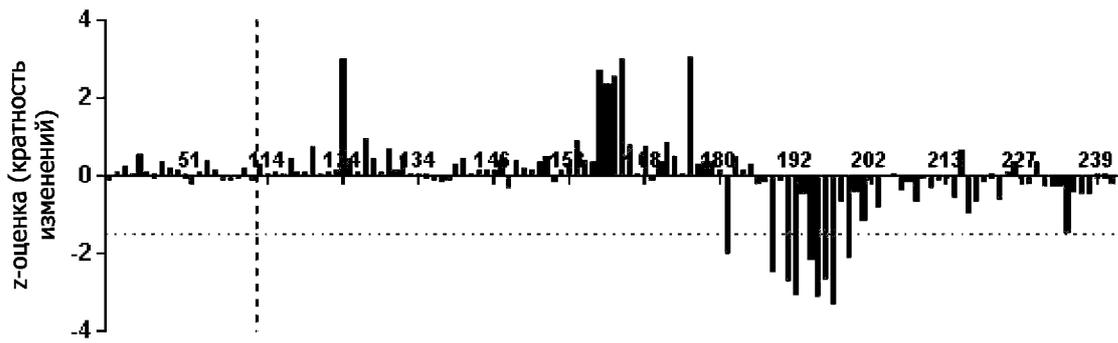


D

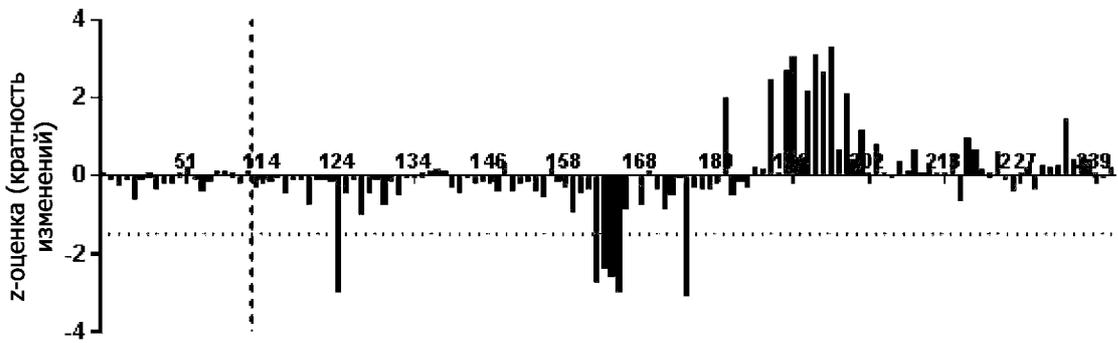


## Фиг. 25

антитело 010

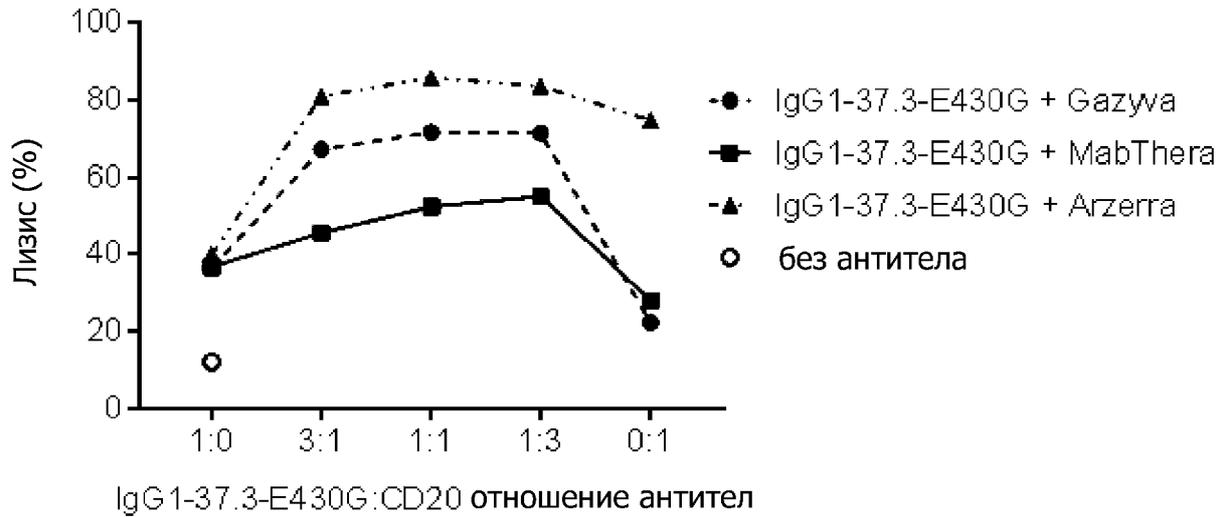


антитело 016

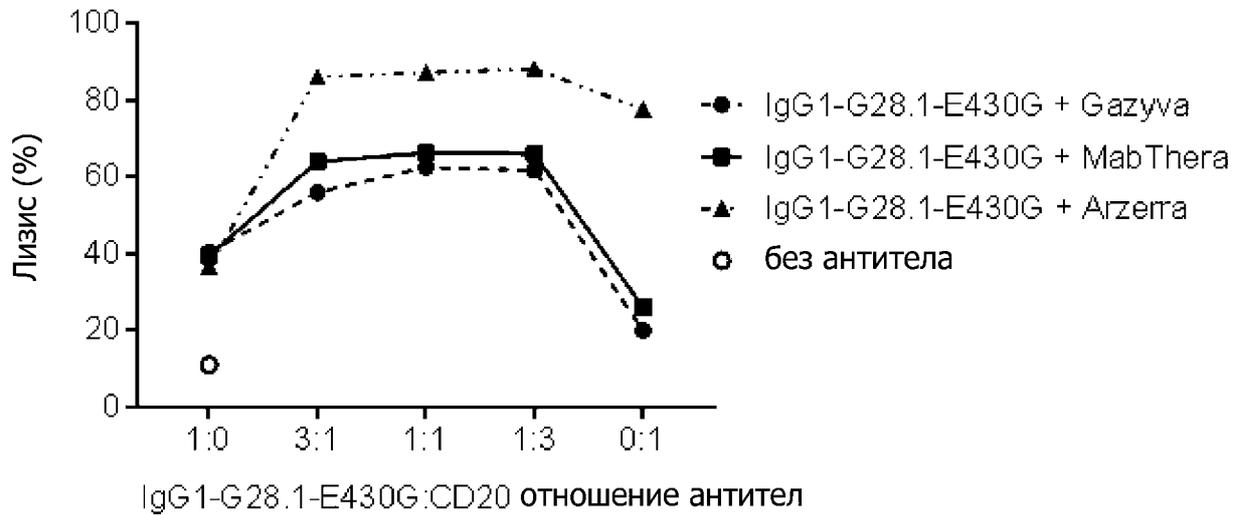


# Фиг. 26

А

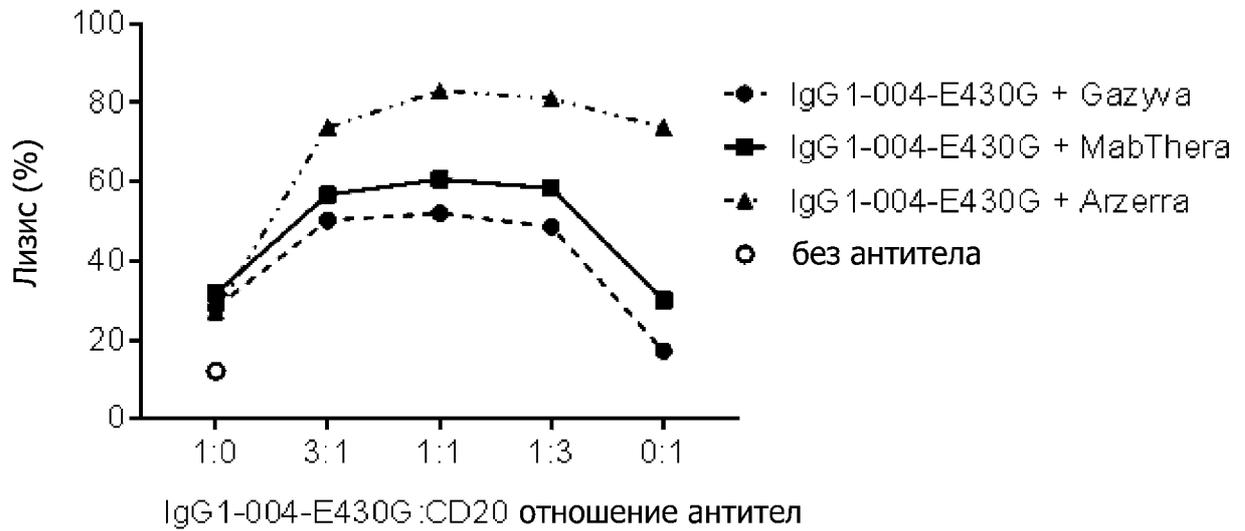


В

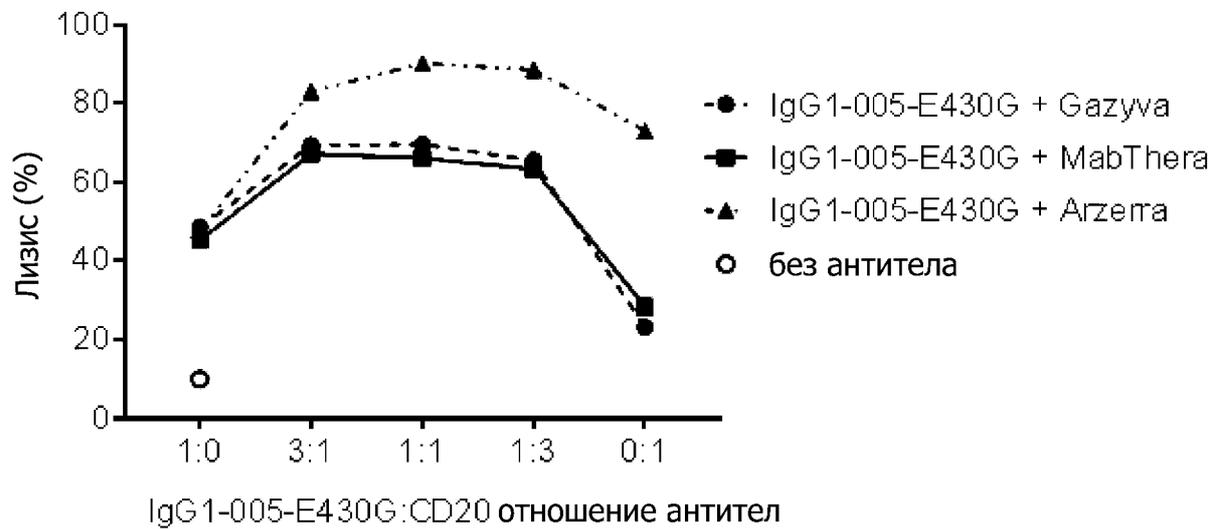


## Фиг. 26

с

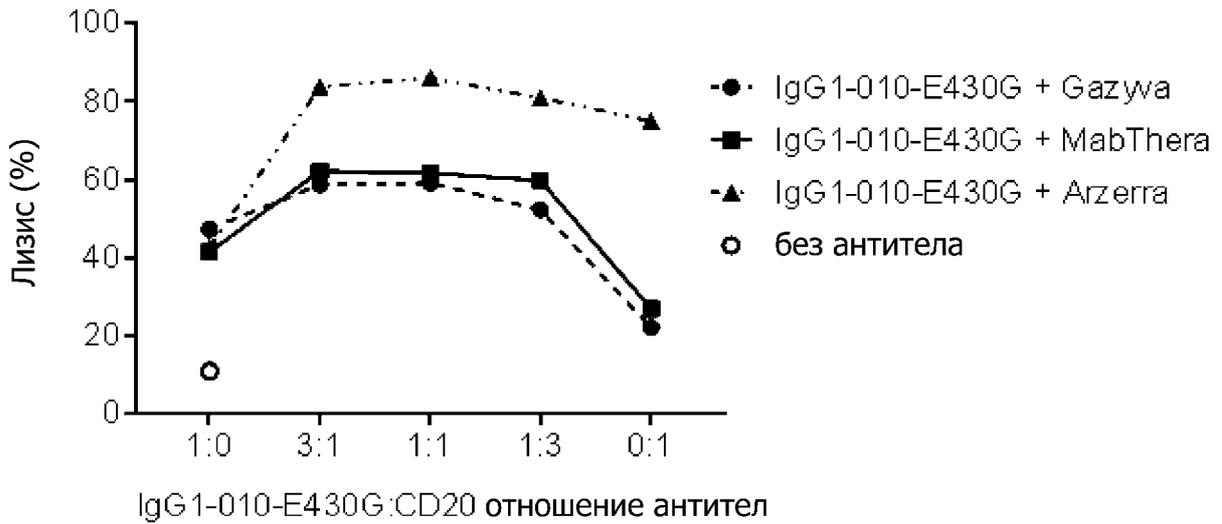


d



Фиг. 26

E



F

