

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036905**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.01.13**
- (21) Номер заявки  
**201890805**
- (22) Дата подачи заявки  
**2016.11.29**
- (51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C12N 15/63** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19**

- (31) **2015151459**
- (32) **2015.12.01**
- (33) **RU**
- (43) **2018.08.31**
- (86) **PCT/RU2016/000827**
- (87) **WO 2017/095267 2017.06.08**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"МЕЖДУНАРОДНЫЙ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ  
ЦЕНТР "ГЕНЕРИУМ" (ООО "МБЦ  
ГЕНЕРИУМ") (RU)**
- (72) Изобретатель:  
**Вишневский Александр Юрьевич,  
Карпов Андрей Павлович, Лыков  
Максим Валерьевич, Морозов  
Антон Николаевич, Петров Андрей  
Владимирович, Потеряев Дмитрий  
Александрович, Ручко Сергей  
Валериевич, Фабричный Игорь  
Павлович, Хамитов Равиль**
- Авгатович, Шустер Александр  
Михайлович (RU)**
- (74) Представитель:  
**Ловцов С.В., Левчук Д.В., Коптева  
Т.В., Вилесов А.С., Ясинский С.Я.  
(RU)**
- (56) REUSCH Uwe et al. A tetravalent bispecific TandAb (CD19/CD3), AFM11, efficiently recruits T cells for the potent lysis of CD19<sup>+</sup> tumor cells. mAbs, June 2015, Vol.7, Issue 3, pp.584-604, in particular the abstract, p. 595-598, fig. 1  
ULRICH H.WEIDLE et al. Tumor-antigen-binding bispecific antibodies for cancer treatment. Seminars in Oncology, October 2014, Vol.41, No.5, pp.653-660  
US-B2-7947646  
NAGORSEN Dirk et al. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab, Experimental cell research, 2011, 317, pp.1255-1260  
STEIN Andreas et al. Cation exchange chromatography in antibody purification: pH screening for optimised binding and HCP removal, Journal of Chromatography B, 2007, 848, pp.151-158  
US-B2-8658773

- (57) Изобретение относится к биотехнологии и, в частности, может быть использовано в медицине и фармацевтической промышленности для изготовления лекарственного средства для лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями. Биспецифическое антитело, специфично связывающееся с CD3 и CD19, включает две соединенные дисульфидными связями цепи. Каждая цепь содержит переменные домены легкой и тяжелой цепей антител против CD3 и CD19, линкерные последовательности, шарнирную область иммуноглобулина IgG и константную область Fc-домена иммуноглобулина IgG. Антитело получают с помощью технологий рекомбинантных ДНК с использованием кодирующей антитело нуклеиновой кислоты и/или содержащего ее вектора, введенных в клетку-хозяина. Способ получения антитела включает, по меньшей мере, культивирование клетки-хозяина и выделение целевого продукта. Способ очистки антитела включает, по меньшей мере, стадию хроматографии. Антитело используют для лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями. Соответствующая фармацевтическая композиция включает указанное антитело и фармацевтически приемлемый носитель. Способ лечения указанных заболеваний включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела. Изобретение позволяет повысить удобство анти-CD3\*CD19 терапии благодаря увеличенному времени полужизни антитела против CD3\*CD19, его усиленному цитотоксическому эффекту и высокой биодоступности даже при подкожном введении.

**B1****036905****036905****B1**

### Область техники

Изобретение относится к биотехнологии и, в частности, может быть использовано в медицине и фармацевтической промышленности для изготовления лекарственного средства для лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями.

#### Предшествующий уровень техники

Биспецифические антитела (БАТ) против CD3\*CD19 в настоящее время разрабатываются преимущественно для лечения злокачественных заболеваний В-клеток или истощения В-клеток, в том числе неходжкинской лимфомы (WO 2010037835, RU 2228202), В-клеточного лейкоза (RU 2008129080), детской острой лимфобластической лейкемии (WO 20100052013) и т.д.

Ряд завершенных и проводимых в настоящее время исследований (например, J Clin Oncol, 2011, 29: 2493-8; Cancer, 2010, 116: 5568-74; Science, 2008, 321: 974-7; BLINCYTO, AmGen Research GmbH (NCT00560794, NCT00274742, NCT01207388, NCT01209286, NCT01471782, NCT01466179, NCT01741792); AFM11, Affimed Therapeutics AG (NCT02106091)) дают все основания полагать, что лекарственные препараты на основе биспецифических антител против CD3\*CD19 обещают стать более эффективными в лечении упомянутых выше заболеваний.

Повышенная эффективность объясняется тем, что БАТ выполняют функцию адаптеров, которые физически соединяют Т-клетки с опухолевыми клетками и запускают мощный сигнальный каскад рецепторного комплекса Т-клеток посредством связывания с инвариантным компонентом CD3 Т-клеточного рецептора. При этом второй (целевой) антигенспецифичный фрагмент узнает CD19, т.е. БАТ может соединить Т-клетку и раковую клетку за счет одновременного связывания с CD3 и антигеном-мишенью. В этом случае происходит активация и пролиферация Т-клеток, образование цитолитического синапса с высвобождением цитотоксических гранул и секреция цитокинов. Направленный лизис раковых клеток включает в себя перфорацию мембраны клетки-мишени с участием перфорина и последующий апоптоз, индуцированный гранзимами. Следует отметить, что после связывания с Т-клетками БАТ распознают антигены на поверхности раковой клетки так же, как обычные моноспецифические антитела. Таким образом, удастся перенаправить цитотоксическую функцию Т-клеток против опухолевых клеток, причем активность БАТ наблюдается уже при относительно низких (пикомолярных) концентрациях. Связывание же БАТ только с Т-клеткой в отсутствие клетки-мишени не вызывает Т-клеточную активацию.

Примеры биспецифических антител, известных из уровня техники (Blood, (ASH Annual Meeting Abstracts), 2009, 114:840), свидетельствуют о том, что эффективная терапевтическая концентрация препаратов, полученных на основе использования мультивалентных антител, существенно ниже по сравнению с классическими антителами противораковыми препаратами. Это способствует хорошей переносимости, возможности осуществления длительных курсов лечения и уменьшению риска побочных эффектов. Кроме того, требуемый объем и стоимость производства биспецифических антител ниже. Поэтому создание таких антител позволит существенно сократить масштабы и расходы на производство препаратов на их основе и, что самое главное, сделать эти лекарства доступными для всех пациентов, нуждающихся в подобной терапии.

В настоящее время было разработано и получено довольно много биспецифических антител против CD3\*CD19. Наиболее перспективные из них представляют собой одноцепочечные молекулы как таковые или нековалентные димеры, состоящие из одноцепочечных молекул.

Одним из одноцепочечных антител против CD3\*CD19 является блинатумомаб (Blinicyto, MT103). Блинатумомаб состоит из двух доменов: домена анти-CD19 scFv из гибридомы HD37 и домена анти-CD3 scFv из гибридомы ОКТ3. Для получения антитела фрагмент ДНК VLCD19-VHCD19-VHCD3-VLCD3 экспрессируют в DHFR-отрицательных CHO клетках (патент RU 2228202).

Блинатумомаб в сравнении с полноразмерными антителами имеет относительно небольшую молекулярную массу (55 кДа против 155 кДа), из-за чего быстро элиминируется из кровотока. Поэтому для достижения стабильных концентраций препарата в крови используется непрерывное внутривенное введение препарата в течение 2-4 недель за один цикл (в режиме две недели - капельница, две недели - перерыв), что достаточно трудно переносимо для пациента.

Кроме того, блинатумомаб сложно производить в промышленных масштабах, так как при производстве одноцепочечных антител могут образовываться гомо- и гетеродимеры, что приводит к усложнению процесса выделения и очистки таких антител. С другой стороны, возможен обратный процесс - нежелательная диссоциация димеров, как это было показано, например, в статье Glockshuber et al., Biochemistry, 1990, vol 29:1362-1367. Чтобы избежать этого, были предложены антитела, стабилизированные дисульфидными связями (Cell Oncol. (2012), 35:423-434), что позволило повысить как стабильность антитела в растворе, так и терапевтическую эффективность в сравнении с одноцепочечным антителом.

Несмотря на недостаточное удобство в применении и сложность получения блинатумомаб является одним из самых успешных антител против CD3\*CD19.

Блинатумомаб относится к антителам ViTE®. Антитела ViTE® демонстрируют высокую эффективность перенаправленного лизиса клеток, экспрессирующих опухолевый антиген-мишень. Значения EC50

для антител ViTE® в целом колеблются от 0,1 до 50 пМ (Bauerle P.A. и Reinhardt C. (2009) *Cancer Res.* 69(12), pp.4941-4944). Мощный цитолитический эффект необходим для того, чтобы вызвать фармакологически желательный эффект. В обзоре Rader C. сообщает, что мощная литическая способность формата ViTE® объясняется (1) его небольшим размером, который приводит мишень и эффекторные клетки в непосредственную близость, позволяя образовать цитолитические синапсы, и (2) его моновалентным задействованием комплекса TCR, что предупреждает системную активацию эффекторных клеток в отсутствие клеток-мишеней (Rader C. (2011), *Blood*, 117(17), pp. 4403-4404). Кроме того, предшествующий уровень техники описывает, что класс ViTE® биспецифических антител имеет, как правило, в 100-10000 раз более высокую эффективность лизиса опухолевых клеток относительно других биспецифических форматов и полных моноклональных антител IgG1 (Wolf и соавт. (2005) *Drug Discov Today* 10(18), pp. 1237-1244).

Таким образом, для специалиста из уровня техники следует, что небольшие моновалентные форматы биспецифических антител против CD3\*CD19 формата ViTE® демонстрируют более мощную перенаправленную Т-клеточную литическую активность, чем крупные бивалентные CD3\*CD19 биспецифические форматы, и использование крупных бивалентных CD3\*CD19 биспецифических антител нецелесообразно.

### Раскрытие изобретения

Настоящее изобретение решает задачу получения бивалентного антитела против CD3\*CD19, удобного в применении и получения по сравнению с блинатумомабом и при этом обладающего высокой эффективностью в отношении лечения злокачественных заболеваний В-клеток, истощения В-клеток или замедления развития патологических состояний, ассоциированных с В-клеточными нарушениями.

Работа коллектива авторов настоящего изобретения над улучшением фармакокинетических характеристик антител против CD3\*CD19 привела к созданию новой конструкции антитела, представляющей собой биспецифическую двуцепочечную молекулу, каждая цепь которой содержит Fc-часть обычного IgG и четыре связывающих домена, соединенных линкерами и расположенных в следующем порядке от N-конца к C-концу: VL(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG), где VL(CD3), VL(CD19), VH(CD3) и VH(CD19) представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепей антител против CD3 и CD19 соответственно, L1, L2, L3 - линкерные последовательности, H - шарнирная область иммуноглобулина IgG и CH2-CH3 (IgG) - константная область Fc-домена иммуноглобулина IgG. Две цепи соединены дисульфидными связями.

Неожиданно обнаружилось, что такие биспецифические молекулы в сравнении с антителом блинатумомаб (MT-103) характеризуются увеличенным временем полужизни и просты в получении. При этом еще более неожиданными для коллектива авторов оказались такие свойства указанного антитела как усиленный цитотоксический эффект и высокая биодоступность даже при подкожном введении на уровне 60%. Последняя характеристика особенно важна, поскольку до настоящего времени из-за малой биодоступности препараты антител вводились преимущественно внутривенным путем, который более сложен и менее комфортен для пациента. Увеличенное время полувыведения, высокая эффективность и биодоступность при подкожном введении позволят уменьшить частоту введения препарата и увеличить удобство его применения.

Таким образом, первый объект настоящего изобретения представляет собой рекомбинантное моноклональное биспецифическое антитело против CD3\*CD19, включающее две соединенных дисульфидными связями цепи, каждая из которых состоит из следующих доменов: VL(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG), где VL(CD3), VL(CD19), VH(CD3) и VH(CD19) представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепей антител против CD3 и CD19 соответственно, L1, L2, L3 - линкерные последовательности, H - шарнирная область иммуноглобулина IgG и CH2-CH3 (IgG) - константная область Fc-домена иммуноглобулина IgG.

Причем указанная константная область Fc-домена иммуноглобулина IgG предпочтительно представляет собой константную область Fc-домена иммуноглобулина IgG2 и содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. Линкерные последовательности L1, L2, L3 предпочтительно имеют длину 5-15 аминокислот и имеют последовательности, по существу, соответствующие последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 6, 7, 8 соответственно. Шарнирная область иммуноглобулина IgG, по существу, соответствует последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9.

Указанное антитело предпочтительно имеет время полужизни в крови, увеличенное по сравнению с временем полужизни блинатумомаба, измеренным, по существу, в аналогичных условиях. При этом время полужизни в крови антитела по изобретению может быть более 40 ч. При этом указанное антитело предпочтительно, но не обязательно, имеет аминокислотную последовательность, по существу, соответствующую последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

Следующими объектами настоящего изобретения являются нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность цепи указанного биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению, и содержащий ее вектор. Указанный вектор может быть вектором для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 в клетке-хозяине по изобретению, содержащим указанную выше

нуклеиновую кислоту, функционально соединенную с нуклеотидными последовательностями, обеспечивающими возможность гетерологичной экспрессии в клетке-хозяине. Указанный вектор может быть вектором для клонирования, содержащим указанную выше нуклеиновую кислоту, и фланкирующие ее сайты рестрикции, позволяющие вырезать указанную нуклеиновую кислоту с помощью подходящих рестриктаз. Предпочтительно, но не обязательно, указанный вектор является экспрессионной плазмидой pRA1451, характеризующейся следующими признаками:

состоит из 11308 п.о.,  
имеет молекулярную массу 6.99 МДа,  
содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10,  
обеспечивает устойчивость клеток млекопитающих, трансфицированных указанной плазмидой, к пуromицину;

содержит следующие элементы:

CMVe/EF1a pro - энхансер вируса CMV и промотор транскрипции гена фактора элонгации альфа,

BGH pA - сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста,

sv40 enh - энхансер вируса SV40,

SGE 1 - элемент прикрепления к ядерному матриксу,

Amp<sup>r</sup> - ген β-лактамазы,

sv40 pro - промотор вируса SV40,

puro - ген устойчивости к пуromицину,

pA - синтетический сигнал полиаденилирования,

содержит уникальные участки узнавания следующих эндонуклеаз рестрикции:

AccI (6490 п.о.), AgeI (460 п.о.), ApaI (995 п.о.), BmgBI (3270 п.о.), BsmI (7269

п.о.), EcoRV (6457 п.о.), HindIII (1590 п.о.), NotI (11146 п.о.), PfoI (11021 п.о.),

PmlI (5699 п.о.), SpeI (4622 п.о.), SmaI (6466 п.о.), Tth111I (10585 п.о.).

Еще одним объектом настоящего изобретения является клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по изобретению или вектор для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению в клетке-хозяине. Указанная клетка может быть как прокариотической, так и эукариотической клеткой. Предпочтительно, но не обязательно, указанная клетка может быть клеткой млекопитающего, в частности клеткой китайского хомячка.

Следующим объектом настоящего изобретения является способ получения биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению, включающий по меньшей мере культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела против CD3\*CD19 по изобретению, и выделение полученного продукта.

Также объектом настоящего изобретения является способ очистки антитела против CD3\*CD19 по изобретению, включающий проведение по меньшей мере одной стадии хроматографии в условиях, обеспечивающих получение препарата антитела против CD3\*CD19 по изобретению, по существу, свободного от примесей клетки-хозяина. Указанный способ может дополнительно включать стадию центрифугирования, предпочтительно выполняемую до стадии хроматографии, и еще одну стадию хроматографии. Причем первая стадия хроматографии предпочтительно, но необязательно, выполняется с использованием сорбента на основе протеина А, а вторая стадия хроматографии является стадией катионообменной хроматографии.

Следующим объектом настоящего изобретения является применение антитела против CD3\*CD19 по изобретению для лечения В-клеточных заболеваний, истощения В-клеток или замедления развития патологических состояний, ассоциированных с В-клеточными нарушениями.

Указанное применение предусматривает введение антитела по изобретению пациенту предпочтительно, но не обязательно, внутривенно или подкожно. При этом антитело вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве.

Еще одним объектом изобретения является фармацевтическая композиция для лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологических состояний, ассоциированных с В-клеточными нарушениями, содержащая в качестве активного компонента антитело против CD3\*CD19 по изобретению в терапевтически эффективном количестве и фармацевтически приемлемый носитель.

Следующим объектом настоящего изобретения является способ лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологических состояний, ассоциированных с В-клеточными нарушениями, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективной дозы антитела против CD3\*CD19 по изобретению или эффективного количества фармацевтической композиции по изобретению.

При этом указанным В-клеточным заболеванием, истощением В-клеток или замедлением развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями, является одно из следующего: В-лимфобластная лимфома/В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-

предшественников; В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов, в том числе В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома); В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лимфоплазмоцитарная лимфома; селезеночная лимфома маргинальной зоны; волосатоклеточный лейкоз; плазмноклеточная миелома/плазмоцитомы; экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа; нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; диффузная В-крупноклеточная лимфома; медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома; первичная экссудативная лимфома; лимфома/лейкоз Беркитта, а также для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных патологической регуляцией В-клеток, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, гломерулонефрит, рассеянный склероз и миастения гравис.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схематическое представление конструкции антитела GNR-047.

Фиг. 2. Схема конструирования экспрессионного вектора.

Фиг. 3. Карта экспрессионного вектора pRA1451.

Фиг. 4. Анализ способности антитела GNR-047 и антитела MT-103 связывать нативный рецептор CD3 на клеточной линии Jurkat и рецептор CD19 на клеточной линии Raji.

Фиг. 5а. Исследование фармакокинетических характеристик антитела GNR-047 при внутривенном введении в дозировке 0,5 мг/кг.

Фиг. 5б. Исследование фармакокинетических характеристик антитела MT-103 при внутривенном введении в дозировке 0,5 мг/кг.

Фиг. 6а. Исследование фармакокинетических характеристик антитела GNR-047 при подкожном введении в дозировке 2,0 мг/кг.

Фиг. 6б. Исследование фармакокинетических характеристик антитела MT-103 при подкожном введении в дозировке 2,0 мг/кг.

Фиг. 7. Изменение среднего объема опухоли в процессе исследования.

#### Лучший вариант осуществления изобретения

Далее рассмотрены наиболее предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, раскрыто смысловое содержание используемых в рамках настоящего изобретения терминов, а также представлены примеры, демонстрирующие осуществление настоящего изобретения и достигаемые при этом результаты.

Термин "рекомбинантное моноклональное биспецифическое антитело против CD3\*CD19", используемый в соответствии с настоящим изобретением, включает в себя антитела, специфически связывающиеся и с CD3, и с CD19, которые получены с помощью рекомбинантных технологий.

Антитело против CD3\*CD19 по изобретению может быть получено на основе мышиных, и/или человеческих последовательностей, и/или верблюжьих последовательностей, и/или последовательностей ламы, и/или иных подходящих последовательностей, включая искусственные, в том числе созданные путем модификации мышиных и/или человеческих последовательностей, например, за счет введения мутаций. Предпочтительно антитело против CD3\*CD19 по изобретению является химерным. Более предпочтительно антитело против CD3\*CD19 по изобретению является полностью человеческим.

Рекомбинантное моноклональное биспецифическое антитело против CD3\*CD19 по изобретению содержит переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против CD3, переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против CD19, линкерные последовательности, шарнирную область, Fc последовательность и имеет две цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. При этом каждая цепь предпочтительно имеет следующую структуру: VL(CD3) -L1-VH(CD19) -L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG), где VL(CD3), VL(CD19), VH(CD3) и VH(CD19) представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепей антител против CD3 и CD19 соответственно; L1, L2, L3 - линкерные последовательности; H представляет собой шарнирную область иммуноглобулина IgG; и CH2-CH3 (IgG) представляет собой константную область Fc-домена иммуноглобулина IgG.

Анти-CD3 антитела хорошо известны специалистам. Примеры анти-CD3 антител включают, без ограничения, OKT3, G4.18, 145-2C11, Leu4, HIT3a, BC3, SK7, SP34, RIV-9 и UCHT1. Предпочтительно анти-CD3 антитело связывается с теми же эпитопами, что и OKT3, G4.18, 145-2C11, Leu4, HIT3a, BC3, SK7, SP34, RIV-9 и UCHT1.

Специалист в уровне техники без излишнего экспериментирования может получить дополнительные антитела против CD3 и, в том числе определить, специфичны ли антитела к тем же эпитопам, что и анти-CD3 антитела OKT3, G4.18, 145-2C11, Leu4, HIT3a, BC3, SK7, SP34, RTV-9 и UCHT1, выяснив, предотвращают ли первые связывание последних с антигенным полипептидом CD3.

В целом, в рамках настоящего изобретения могут быть использованы любые переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против CD3, демонстрирующие высокую специфичность и аффинность связывания с антигенным полипептидом CD3. Однако наиболее предпочтительно в соответствии с настоящим изобретением использовать переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против CD3 VL(CD3) и VH(CD3), охарактеризованные последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2.

Анти-CD19 антитела также хорошо известны специалистам, как и способы их получения. Примеры анти-CD19 антител включают, без ограничения, HD37, H1B19, SJ25-C1, 4G7-2E3. Кроме того, указанные способы и антитела раскрыты в евразийской заявке EA 200800094, опубликованной 30.06.2008. В целом, в рамках настоящего изобретения могут быть использованы любые переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против CD19, демонстрирующие высокую специфичность и прочность связывания с антигенным полипептидом CD19. Однако наиболее предпочтительно в соответствии с настоящим изобретением использовать переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела против CD19 VL(CD3) и VH(CD3), охарактеризованные последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4.

Термин "Fc-последовательность" представляет собой термин, хорошо известный специалистам в данной области - это концевая часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей иммуноглобулина подразделяют на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изоотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. В соответствии с константными областями тяжелых цепей различные классы иммуноглобулинов называют [альфа], [дельта], [эпсилон], [гамма] и [мю] соответственно. Четыре изоотипа человеческого IgG связывают различные рецепторы, такие как неонатальный Fc-рецептор, активирующие Fc-рецепторы гамма, FcγRI, FcγRIIa и FcγRIIIa, ингибирующий рецептор FcγRIIb и C1q с различной аффинностью, получая разные виды активности. Однако термин "Fc-последовательность" в рамках настоящего изобретения относится, в том числе к Fc-последовательностям, модифицированным для изменения сродства к соответствующему рецептору.

Антитело по настоящему изобретению содержит Fc-часть, чтобы продлить период полураспада. Такая Fc-последовательность имеет предпочтительно человеческое происхождение, более предпочтительно представляет собой человеческую Fc-последовательность антитела IgG, более предпочтительно IgG2, еще более предпочтительно представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. При этом выбор Fc-последовательности типа IgG2 позволяет обеспечить снижение эффекторной нагрузки, обусловленной Fc-последовательностью и снизить таким образом направленную токсичность антитела по изобретению.

Термин "линкер", используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к пептидным линкерам. Длина и/или последовательность линкера влияет на стабильность и/или растворимость биспецифической молекулы. Линкер может повысить гибкость полученной связывающей молекулы и/или может улучшить связывание ее с антигеном-мишенью путем уменьшения стерических помех. Длина и последовательность линкера зависят от последовательности и длины связываемых последовательностей. Специалисту хорошо известны способы тестирования пригодности различных линкеров. Например, свойства связывающей молекулы можно легко протестировать путем анализа ее аффинности связывания при использовании различных типов линкеров. Стабильность полученной молекулы можно измерить способами, известными в данной области техники, такими как, например, высокоэффективная жидкостная хроматография, разделяющая исследуемый белковый материал на фракции, в зависимости от молекулярной массы белка и гидродинамических характеристик.

Особенно предпочтительными являются линкеры, которые представляют собой пептиды, состоящие по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90 или 100% из небольших аминокислот, таких как глицин, серин и аланин. Особенно предпочтительными являются линкеры, состоящие только из молекул глицина и серина.

Предпочтительно линкерные последовательности по изобретению состоят из 5-15 аминокислот. Более предпочтительно, чтобы линкеры L1, L2, L3 антитела против CD3\*CD19 по изобретению были выбраны из следующих последовательностей:

L1: (XXS)<sub>k</sub>, где k=2-3, L2: (XXS)<sub>n</sub>, где n=4-5, L3: (XXS)<sub>m</sub>, где m=2-3, X=G.

Еще более предпочтительно использовать в антителе по изобретению L1, L2, L3 с последовательностями, представленными в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8.

Термин "шарнирная область", используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к последовательности, которая в природном иммуноглобулине связывает CH1-домен с областью CH2-CH3 Fc-фрагмента. Шарнирная область, используемая в антителе по изобретению, предпочтительно гомологична природной области иммуноглобулина и обычно включает цистеиновые остатки, связывающие две тяжелые цепи посредством дисульфидных связей, как в природных иммуноглобулинах. Типичные последовательности шарнирных областей иммуноглобулинов человека и мыши можно найти в ANTI-BODY ENGINEERING, a PRACTICAL GUIDE, (Borrebaeck, ed., W.H. Freeman and Co., 1992). Подходящие шарнирные области по настоящему изобретению могут происходить от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и других изоотипов иммуноглобулинов. Наиболее предпочтительно в конструкции антитела по изобретению использовать шарнирную область IgG1 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9.

Порядок расположения переменных областей в конструкции антитела по изобретению носит принципиальный характер. Авторами была проведена работа по оценке *in vitro* токсичности по релизу провоспалительных цитокинов и CD3 опосредованной цитотоксичности антитела по отношению к

CD19+ опухолевым клеткам (здесь и далее цитотоксическая биологическая активность) различных вариантов биспецифического антитела формата ViMS:

VL(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG) (целевой),

VH(CD19)-L1- VL(CD3) -L2- VH(CD3) -L3- VL(CD19) -H-CH2-CH3(IgG),

VH(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VL(CD3)-H-CH2-CH3(IgG),

VH(CD19)-L1- VH(CD3) -L2- VL(CD3) -L3- VL(CD19) -H-CH2-CH3(IgG),

в результате которых была установлена высокая цитотоксическая биологическая активность и низкая токсическая активность варианта биспецифического антитела VL(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG), что может быть гипотетически связано с высокой аффинностью антитела из-за конформации переменных доменов по изобретению по отношению к CD3 специфичности.

В наиболее предпочтительном варианте исполнения настоящего изобретения антитело против CD3\*CD19 характеризуется последовательностью SEQ ID NO: 10. Однако специалисту в данной области ясно, что без излишнего экспериментирования и затрат изобретательского творчества, руководствуясь раскрытыми выше сведениями, он может создать антитело по изобретению с другой последовательностью, но обладающее высокой эффективностью в отношении лечения злокачественных заболеваний В-клеток, истощения В-клеток или замедления развития патологических состояний, ассоциированных с В-клеточными нарушениями, и при этом удобное в применении и получении по сравнению с блинатумомабом. В качестве критерия отбора подходящих последовательностей антител по изобретению может быть использована специфичность/эффективность связывания с CD3 и CD19, характерная для антитела с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10 (см. пример 3), время полужизни антитела в крови от около 40 ч, более предпочтительно от около 65 ч.

Антитело против CD3\*CD19 по изобретению кодируется нуклеиновой кислотой, структура которой может быть выведена известными в данной области специалистам методами из структуры указанного антитела. В частности, в наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота по изобретению имеет нуклеотидную последовательность, выведенную из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. При этом кодонный состав последовательности нуклеиновой кислоты по изобретению выбирается таким образом, чтобы в выбранной клетке-хозяине достигались максимальные уровни ее транскрипции и последующей трансляции. Термин "нуклеиновая кислота", используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится предпочтительно к ДНК. Однако данный термин также может относиться к РНК.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин может содержать последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению, стабильно встроенную в клеточный геном. В другом варианте осуществления настоящего изобретения клетка-хозяин содержит последовательность нуклеиновой кислоты по изобретению, функционально встроенную для целей экспрессии в конструкции типа вектора для экспрессии или линейного экспрессирующего элемента.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения экспрессия антитела против CD3\*CD19 по изобретению в клетке-хозяине обеспечивается с помощью вектора для обеспечения экспрессии.

Термин "вектор для обеспечения экспрессии", используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к любому подходящему вектору, включая хромосомные, внехромосомные векторы и векторы из синтетической нуклеиновой кислоты, содержащей подходящий набор контролирующих экспрессию элементов.

Вектор для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению предпочтительно сконструирован таким образом, чтобы обеспечить экспрессию нуклеиновой кислоты по изобретению в клетках млекопитающих. Однако указанный вектор без ограничения может быть также сконструирован для обеспечения экспрессии нуклеиновой кислоты по изобретению в клетках растений, бактерий, дрожжей, животных, отличных от млекопитающих. Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговые ДНК, бакуловирусы, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговых ДНК, и векторы из вирусной нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). Подходящие векторы экспрессии иммуноглобулина раскрыты также, например, в McLean et al., *Mol. Immunol.* 37: 837-45 (2000); Walls et al., *Nucleic Acids Res.*, 21: 2921-9 (1993) и Nordergaard et al., *J. Immunol. Meth.* 204: 77-87 (1997).

Вектор для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению может быть одновременно быть вектором для клонирования и обладать способностью автономно реплицироваться в бактериальных, дрожжевых и иных клетках, а также быть пригодным для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело против CD3\*CD19 по изобретению, путем обработки указанного клонирующего вектора подходящими рестриктазами. Однако более предпочтительно, чтобы вектор для клонирования, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело против CD3\*CD19 по изобретению, не содержал дополнительно элементов для обеспечения экспрессии указанной нуклеиновой кислоты для повышения эффективности его амплификации в клетке-хозяине.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вектор для обеспечения экспрессии

представляет собой вектор, который подходит для экспрессии антитела в бактериальных клетках. Примеры таких векторов включают векторы BlueScript (Stratagene), векторы pIN, векторы pET (Novagen, Madison WI) и др.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения вектор для обеспечения экспрессии представляет собой вектор, который подходит для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие векторы включают, к примеру, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы типа альфа-фактора, алкоголь-оксидазы и PGH.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения вектор для обеспечения экспрессии представляет собой вектор, который подходит для экспрессии антитела в растении. Подходящие векторы включают, например, векторы, раскрытые в патенте РФ RU 2412251, опубликованном 20.02.2011.

В следующем варианте осуществления настоящего изобретения вектор для обеспечения экспрессии представляет собой вектор, который подходит для экспрессии антитела в насекомом. Подходящие векторы включают, например, векторы, раскрытые в международной заявке с номером публикации WO 2010/025764 от 11.03.2010.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор для обеспечения экспрессии представляет собой вектор, который подходит для экспрессии антитела в клетках китайского хомячка.

В векторе для экспрессии по изобретению нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по изобретению, может быть связана с любым подходящим промотором, энхансером и другими способствующими экспрессии элементами. При этом указанные элементы выбирают на основе типа клетки-хозяина.

В частности, сайт инициации репликации из плазмиды pBR322 (Product No. 303-3s, New England Biolabs, Beverly, Mass) применим для большинства грамотрицательных бактерий, тогда как различные сайты инициации репликации из SV40, полиомавируса, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VSV) или папилломавирусов (таких как HPV или BPV) могут быть использованы для клонирования векторов в клетках млекопитающих.

Последовательность терминации транскрипции обычно локализована 3' (справа) от конца кодирующих областей полипептида и служит для терминации транскрипции. Последовательности терминации транскрипции в прокариотических клетках часто содержат G-C-богатый фрагмент, за которым следует поли Т-последовательность. Последовательности терминации транскрипции могут быть клонированы из библиотеки, приобретенной коммерчески, в виде части вектора.

Элемент гена селективируемого маркера кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, выращиваемой в селективной культуральной среде. Обычные гены селективируемого маркера кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например ампициллину, тетрациклину или канамицину для прокариотических клеток-хозяев, (b) дополняют ауксотрофные недостаточности клетки или (с) поставляют необходимые питательные вещества. Предпочтительными селективируемыми маркерами являются ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину и ген устойчивости к тетрациклину. Ген устойчивости к неомицину может быть также использован для отбора в прокариотических и эукариотических клетках-хозяевах.

Примеры селективируемых маркеров для клеток млекопитающих включают дигидрофолатредуктазу (DHFR) и тимидинкиназу. Трансформанты клеток млекопитающих помещают в условия давления отбора, к которому адаптированы для выживания только трансформанты, благодаря маркеру, присутствующему в векторе. Давление отбора накладывается культивированием трансформированных клеток в условиях, в которых концентрация агента отбора в среде последовательно изменяется, что приводит к амплификации как гена отбора, так и целевой нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по изобретению. В результате амплифицированное таким образом количество нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по изобретению, позволит получить увеличенные количества указанного антитела.

Сайт связывания рибосом обычно присутствует для инициации трансляции мРНК. Например, такой сайт характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательностью Козака (эукариоты). Данный элемент обычно расположен 3' (справа) от промотора и 5' (слева) от кодирующей последовательности экспрессируемого полипептида. Последовательность Шайна-Дальгарно варьируется, но обычно представляет собой полипурин (имеющий высокое содержание А-Г). Были идентифицированы многие последовательности Шайна-Дальгарно, каждая из которых может быть легко синтезирована с использованием способов, представленных выше и используемых в прокариотическом векторе.

Энхансерная последовательность может быть встроена в вектор для увеличения транскрипции в эукариотических клетках-хозяевах. Известны несколько энхансерных последовательностей генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротейна и инсулина). Однако обычно следует использовать энхансер из вируса. Энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомавируса и энхансеры аденовируса являются примерами энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов.

Компоненты вектора могут быть гомологичными (из одного и того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (из вида иного, чем вид или штамм клетки-хозяина), гибридными

(комбинацией различных последовательностей из более чем одного источника), синтетическими или нативными последовательностями, которые обычно действуют в качестве регуляторов экспрессии иммуноглобулина. Источниками компонентов вектора могут быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм или любое растение при условии, что данные компоненты являются функциональными в механизме клетки-хозяина и могут быть активированы механизмом клетки-хозяина.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вектор для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению представляет собой вектор для обеспечения гетерологичной экспрессии в клетках китайского хомячка (CHO).

Вектор для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению может дополнительно содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность секреции/ локализации, которая может направлять полипептид в периплазматическое пространство или в культуральную среду. Такие последовательности известны в данной области и включают лидеры секреции или сигнальные пептиды, последовательности, нацеленные на органеллы (например, последовательности ядерной локализации, сигналы удержания в ER, митохондриальные транзитные последовательности, хлоропластные транзитные последовательности), последовательности мембранной локализации/якорные (например, последовательности останки транслокации, якорные последовательности GPI) и др., которые хорошо известны в области настоящего изобретения.

Рекомбинантная экспрессия антитела против CD3\*CD19 по изобретению может осуществляться в любых подходящих клетках-хозяевах, известных в данной области. При этом условия для экспрессии подбираются индивидуально для типа клетки-хозяина и используемых элементов для гетерологичной экспрессии.

Термин "клетка хозяина" в настоящем изобретении служит для обозначения клеток, в которые был введен экспрессирующий вектор по изобретению. Следует иметь в виду, что данный термин служит как для обозначения самих трансформантов, так и их потомства. При этом несмотря на то, что в последующих поколениях возможно появление модификаций вследствие воздействия окружающей среды или искусственного мутагенеза, то к такому потомству также должен быть применен термин "клетка-хозяин" в соответствии с настоящим изобретением. Клетка-хозяин по изобретению может быть эукариотической и прокариотической. Прокариотическая клетка-хозяин может быть, в том числе, бактериальной клеткой. Эукариотическая клетка-хозяин может быть, в том числе, дрожжевой клеткой, клеткой млекопитающего, клеткой животного, не являющегося млекопитающим, например клеткой насекомого, клеткой растения. В частности, эукариотические клетки-хозяева по настоящему изобретению могут представлять собой клетки CHO, клетки HEK293, клетки HEK294, клетки PER.C6, клетки NS0 и клетки лимфоцитов, а также прокариотические клетки типа E.coli.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают введение вектора для обеспечения экспрессии по изобретению в клетку-хозяина *in vivo*, т.е. в такую клетку, которая находится в составе живого многоклеточного организма. Указанным организмом предпочтительно является человек.

Согласно настоящему изобретению для экспрессии антитела можно использовать различные комбинации клетка-хозяин для экспрессии/вектор для обеспечения экспрессии. При этом необходимо выбирать вектор с учетом сохранения им функциональности в клетке-хозяине, в которой будет введен указанный вектор. Вектор должен быть совместим с механизмом клетки-хозяина, так чтобы была возможна амплификация и экспрессия. Например, к экспрессионным векторам, подходящим для эукариотических хозяев, относятся SV40, вирус папилломы крупного рогатого скота, аденовирус, аденоассоциированный вирус, цитомегаловирус и ретровирус. К экспрессионным векторам, которые можно применять в бактериальных хозяевах, относятся бактериальные плазмиды, такие как pBluescript, pGEX2T, pUC, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные, плазмиды наподобие RP4, характеризующиеся широким списком возможных хозяев,  $\lambda$ gt10 и  $\lambda$ 11, фаговая ДНК, представленная различными производными фага лямбда, такими как NM989, и другие фаговые ДНК, такие как M13 и нитевидный фаг с одноцепочной ДНК. Экспрессионные векторы, которые можно использовать с дрожжевыми клетками, включают плазмиду 2 $\mu$  и ее производные. Вектор, который можно применять в клетках насекомых, - pVL941.

В наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению используют комбинацию вектора для обеспечения гетерологичной экспрессии в клетках китайского хомячка с клетками коммерчески доступного штамма CHO-M (Selexis).

Клетка-хозяин, экспрессирующая биспецифическое антитело против CD3\*CD19 по изобретению, может быть получена трансфекцией исходной клетки вектором для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению с помощью любого известного в данной области способа, в том числе электропарацией, трансдукцией, кальций-фосфатной трансфекцией, трансфекцией с помощью катионных липидов, "scrape-loading" (соскоб-нагрузка) и инфицирования.

Способ получения антитела против CD3\*CD19 по изобретению включает культивирование указан-

ной клетки-хозяина в условиях, обеспечивающих экспрессию биспецифического антитела против CD3\*CD19 по изобретению и выделения полученного продукта. При этом указанная экспрессия может быть осуществлена как в условиях мелкомасштабного или крупномасштабного ферментера, так и в условиях инкубации в колбах, на качалке. Инкубацию осуществляют в подходящей питательной среде, содержащей источники углерода и азота и неорганические соли, одним из известных способов. Подходящие среды являются коммерчески доступными, но могут также быть приготовлены самостоятельно с использованием компонентов, описанных, например, в каталоге Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC). В целом, используемый в соответствии с настоящим изобретением термин "среда" включает любую культуральную среду, раствор, твердое, полутвердое вещество или твердую подложку, которые могут поддерживать или содержать любую клетку-хозяина, включая бактериальные клетки-хозяева, дрожжевые клетки-хозяева, клетки-хозяева насекомых, растительные клетки-хозяева, клетки-хозяева млекопитающих, в том числе клетки CHO.

Антитело по изобретению может быть выделено любым известным в данной области способом. Однако при выборе способа выделения антитела необходимо принимать во внимание особенности использованной системы экспрессии (клетка-хозяин для экспрессии/вектор для экспрессии). Так, если антитело преимущественно накапливается внутри клетки-хозяина, необходимо выбрать такой способ выделения продукта, который обеспечит извлечение его из клетки-хозяина. Если антитело накапливается преимущественно в культуральную жидкости, то целевой продукт может быть выделен из культуральной жидкости способами, предназначенными для извлечения антител из культуральной жидкости. Например, антитело по изобретению может быть выделено из культуральной жидкости стандартными способами, включающими, без ограничений, хроматографию, центрифугирование, фильтрацию, экстракцию, сушку, распыление, выпаривание или осаждение. Антитело по изобретению может быть дополнительно очищено с применением различных технологий, известных в данной области, включая хроматографию (например, ионообменную, аффинную, гидрофобную или эксклюзионную), электрофорез, разделение (например, осаждение сульфатом аммония), ДСН-ПААГ или экстракцию.

Предпочтительно способ очистки антитела против CD3\*CD19 по изобретению включает по меньшей мере одну стадию хроматографической очистки. Более предпочтительно способ очистки антитела против CD3\*CD19 по изобретению включает центрифугирование, аффинную хроматографию с использованием сорбента на основе протеина А и катионообменную хроматографию на сорбенте высокого разрешения.

Очищенное в соответствии с требованиями регуляторных органов антитело против CD3\*CD19 по изобретению включают в фармацевтическую композицию по изобретению предпочтительно совместно с фармацевтически приемлемыми носителями и/или разбавителями.

Механизм действия предложенного антитела против CD3\*CD19 аналогичен таковому, описанному для анти-CD3/анти-CD19 антитела - препарата блинатумамаб (MT103); и заключается в активации мультиспецифичного Т-клеточного цитологического ответа против CD19+ клеток лимфомы. Поэтому фармацевтические композиции на основе антител против CD3\*CD19 по изобретению могут применяться для лечения всех гематологических раковых заболеваний (лимфом и лейкозов) В-клеточной природы, например, таких как В-клеточные опухоли из предшественников В-лимфоцитов, в том числе В-лимфобластная лимфома/В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов, в том числе В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома); В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лимфоплазмочитарная лимфома; селезеночная лимфома маргинальной зоны; волосатоклеточный лейкоз; плазмочелочная миелома/плазмочитома; экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа; нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; диффузная В-крупноклеточная лимфома; медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома; первичная экссудативная лимфома; лимфома/лейкоз Беркитта, а также для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных патологической регуляцией В-клеток, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, гломерулонефрит, рассеянный склероз и миастения гравис.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть применена у животных и человека напрямую (например, локально в виде инъекций, в том числе подкожных инъекций). Если композицию согласно настоящему изобретению вводят парентерально, например внутривенно, внутривенно, подкожно, внутривенно, внутримышечно, буккально, интраорбитально, интрацеребрально, интраспинально, интравентрикулярно, интратекально, интрацеребрально, то композиция предпочтительно включает часть водной или физиологически совместимой жидкой суспензии или раствора, который не оказывает негативного влияния на баланс электролитов и/или жидкостей у пациентов при доставке пациентам целевой композиции.

Согласно предпочтительному варианту исполнения фармацевтическую композицию по изобретению получают в форме, пригодной для парентерального введения, предпочтительно для подкожного введения, в том числе в виде стерильного водного раствора, суспензии, эмульсии, концентрата для приготовления водного раствора, лиофилизированного препарата для приготовления водного раствора, рас-

твор на основе неводного растворителя.

Фармацевтически приемлемые агенты для использования в фармацевтической композиции по изобретению включают носители, эксципиенты, разбавители, антиоксиданты, консерванты, красящие, ароматизирующие и разбавляющие агенты, эмульгирующие агенты, суспендирующие агенты, растворители, наполнители, объемные агенты, буферы, носители доставки, агенты тоничности, сорастворители, увлажняющие агенты, комплексообразующие агенты, буферирующие агенты, антимикробные вещества и поверхностно-активные вещества, как это показано, например, в "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (2<sup>nd</sup> ed. London: The Pharmaceutical Press; 1994).

При этом в качестве носителя или растворителя для получения стерильного водного раствора может быть использован в соответствии с настоящим изобретением, например, или раствор Хэнка, или раствор Рингера, или подходящий буферный раствор, например физиологический буферный раствор. Буферы могут быть общепринятыми буферами, такими как ацетатный, цитратный, фосфатный, бикарбонатный буферы или Трис-HCl. Ацетатный буфер может иметь pH приблизительно 4-5,5, и Трис-буфер может иметь pH приблизительно 7-8,5. Дополнительные фармацевтические агенты представлены в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990. Безводным растворителем может быть пропиленгликоль, полиэтиленгликоль или оливковое масло или сложный эфир, пригодный для инъекций, такой как этилолеат. Также примером подходящего носителя для цели получения фармацевтической композиции по изобретению является нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином.

В качестве вспомогательных веществ фармацевтическая композиция по изобретению может также содержать аскорбиновую кислоту, низкомолекулярные полипептиды, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины, хелатообразующие агенты, такие как EDTA, сахароспирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как Твин, плуроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ), галогениды щелочных металлов (предпочтительно хлорид натрия или калия), бензалконийхлорид, тимеросал, фенетилловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен, хлорексидин, сорбиновую кислоту, пероксид водорода, сложные эфиры сорбитана, полисорбаты, такие как полисорбат 80, трометамин, лецитин, холестерин, тилоксапал, высокомолекулярные структурные добавки (например, аравийскую камедь, альгиновую кислоту, фосфат кальция (двухосновный), целлюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, декстран, декстрин, декстраты, сахарозу, тилозу, предварительно желатинизированный крахмал, сульфат кальция, амилозу, глицин, бентонит, мальтозу, сорбит, этилцеллюлозу, динатрийгидрофосфат, динатрийфосфат, динатрийпиросульфит, поливиниловый спирт, желатин, глюкозу, гуаровую камедь, жидкую глюкозу, прессуемый сахар, силикат магния-алюминия, мальтодекстрин, полиэтиленоксид, полиметакрилаты, повидон, альгинат натрия, трагакант, микрокристаллическую целлюлозу, крахмал и зеин).

Наиболее предпочтительным вспомогательными веществами для использования в фармацевтической композиции по изобретению являются: натрий-фосфатный буфер, полисорбат 80 в качестве поверхностно-активного вещества, маннит в качестве изотонического агента и гистидин в качестве стабилизатора.

Указанные эксципиенты могут использоваться в комбинации с другими активными ингредиентами (например, противораковыми или противовоспалительными средствами) при условии, что они не вызывают нежелательных эффектов.

Если фармацевтическая композиция по изобретению представляет собой лиофилизированную композицию, то она может дополнительно содержать один или несколько лиопротекторов, раскрытых, например, в патентах США 6685940, 6566329 и 6372716. В одном варианте осуществления настоящего изобретения в фармацевтической композиции используют лиопротектор, который является нередуцирующим сахаром, таким как сахароза, лактоза или трегалоза. Количество лиопротектора выбирается предпочтительно так, чтобы после восстановления полученная готовая форма являлась изотонической. При этом одновременно выбранное количество лиопротектора должно быть достаточным для предотвращения неприемлемого количества деградации и/или агрегации белка после лиофилизации. Примеры концентраций лиопротекторов для сахаров (например, сахарозы, лактозы, трегалозы) в предварительно лиофилизированной композиции составляют приблизительно от 10 до приблизительно 400 мМ.

Фармацевтическая композиция по изобретению, если получена в лиофилизированной форме, может дополнительно комплектоваться фармацевтически приемлемым растворителем и/или разбавителем, например водой, физиологическим раствором и другими обычно применяемыми фармацевтически приемлемыми растворителями.

Фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество количество антител по изобретению.

Термин "терапевтически эффективное количество", используемый в соответствии с настоящим изобретением, относится к такому количеству антитела по изобретению, которое является эффективным в

течение необходимых периодов времени для достижения желаемого терапевтического результата, причем любые токсичные или вредные эффекты от данного антитела должны перевешиваться терапевтически благоприятными эффектами от данного антитела, которыми в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения является по меньшей мере одно из следующего: ослабление симптомов, выздоровление или увеличение скорости выздоровления. Терапевтически эффективное количество антитела по изобретению может варьироваться в соответствии с такими факторами, как состояние болезни, возраст, пол и масса индивидуума, способность антитела индуцировать желаемую реакцию конкретно у данного индивидуума, наличие сопутствующих заболеваний, способ введения, частота введения, схема предварительного лечения индивидуума.

Специалисту в области техники не составит труда определить эффективное количество антитела по изобретению, исходя из известных правил и закономерностей. В конечном счете, лечащий врач, основываясь на личном опыте и практике, может принять решение по количеству антитела по изобретению, которым целесообразно лечить каждого пациента в отдельности. Более того, сначала лечащий врач может ввести малые дозы антитела по изобретению и по ответу организма пациента скорректировать его количество. Диапазоны доз составляют приблизительно от 0,5 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг в зависимости от вышеуказанных факторов. При этом предпочтительно фармацевтическая композиция по изобретению содержит 10-100 мкг антитела.

Фармацевтическую композицию по изобретению готовят, дозируют и вводят в соответствии с принципами надлежащей медицинской практики. Стандартные методы фармацевтических формуляций известны специалистам в данной области (Remington 1995).

Способ лечения В-клеточного заболевания или истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями, по настоящему изобретению включает введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества антитела по изобретению или фармацевтической композиции по изобретению. При этом в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения антитело вводят пациенту подкожно. При этом антитело против CD3\*CD19 по изобретению может быть введено пациенту в комбинации с другим лекарственным средством, в том числе по меньшей мере с одной из следующих целей: для усиления терапевтического эффекта в отношении В-клеточного заболевания, для уменьшения побочных эффектов при лечении В-клеточного заболевания, для облегчения симптомов В-клеточного заболевания.

Длительность терапии с использованием комбинации по настоящему изобретению изменяется в зависимости от тяжести подлежащего лечению заболевания и состояния, а также в зависимости от потенциальной реакции каждого отдельного пациента. Предполагается, что длительность терапии определяется по выраженности симптомов. В конечном счете, лечащий врач принимает решение о подходящей длительности терапии с использованием комбинации по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение далее иллюстрируется приведенными ниже примерами. В частности, в подтверждение вышеизложенного авторы в эксперименте показали, что

антитело по изобретению может быть получено с использованием технологически несложных известных рекомбинантных методов, коммерчески доступных средств (вектора, клетки-хозяина, среды) и традиционных методов выделения и очистки антител (пример 1);

на основе антитела против CD3\*CD19 по изобретению может быть технологически простым способом получена фармацевтическая композиция, в том числе в лиофилизированном виде, пригодном для последующего восстановления традиционными разбавителями (пример 2).

Также авторами настоящего изобретения экспериментально продемонстрировано в сравнении с MT103 значительно увеличенное время полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и экспозиции ( $AUC_{(0-\text{inf})}$ ) антитела против CD3\*CD19 по изобретению при сохранении максимальной пиковой концентрации ( $C_{\text{max}}$ ) при внутривенном введении, а также повышенная биодоступность антитела против CD3\*CD19 по изобретению как при внутривенном, так и при подкожном введении (пример 4). Дополнительно авторами настоящего изобретения экспериментально подтверждено более высокое сродство антитела по изобретению к CD3 и CD19 и его более высокая противоопухолевая активность при подкожном введении в сравнении с препаратом MT103 (примеры 3 и 5).

Пример 1. Получение антитела против CD3\*CD19.

Конструирование рекомбинантных плазмидных ДНК.

Для клонирования были выбраны коммерчески доступный вектор фирмы Selexis, содержащий генетический элемент SGE1, способствующий усилению экспрессии в результате непосредственной близости целевого трансгена с высокоактивным ядерным транскрипционным комплексом.

Ген, кодирующий цепь антитела против CD3\*CD19, был сконструирован в результате отжига перекрывающихся химически синтезированных олигонуклеотидов. Последовательность целевого гена была клонирована в коммерчески доступный вектор pUC19, в результате чего был получен вектор rAPG\_GNR047, который использовали для дальнейшей работы. После обработки вектора rAPG\_GNR047 эндонуклеазами рестрикции HindIII, XbaI (New England Biolabs), образующими липкие концы, выделяли фрагмент размером 2235 п.о., который затем лигировали с линейаризованным по сайтам HindIII и XbaI экспрессионным вектором pST101. Полученная плазида pRA1451 была

верифицирована рестрикционным картированием. Схема конструирования экспрессионного вектора pRA1451 приведена на фиг. 2.

После этого проводили последовательную двойную трансфекцию с последующей селекцией по резистентности к пурамицину с использованием стандартных методов.

Полученная плаزمида pRA1451, кодирующая полипептид с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 10, характеризуется следующими признаками:

состоит из 11308 п.о.,  
имеет молекулярную массу 6.99 МДа,  
кодирует полипептид биспецифического антитела против CD3\*CD19, GNR-047,  
обеспечивает устойчивость клеток млекопитающих, трансфицированных указанной плазмидой, к пурамицину;

содержит следующие элементы:

CMV $\epsilon$ /EF1a pro - энхансер вируса CMV и промотор транскрипции гена фактора элонгации альфа,

BGH pA - сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста,

sv40 enh - энхансер вируса SV40,

SGE 1 - элемент прикрепления к ядерному матриксу,

Amp - ген  $\beta$ -лактамазы,

sv40 pro - промотор вируса SV40,

puro - ген устойчивости к пурамицину,

pA - синтетический сигнал полиаденилирования.

содержит уникальные участки узнавания следующих эндонуклеаз рестрикции:

AccI (6490 п.о.), AgeI (460 п.о.), ApaI (995 п.о.), BmgBI (3270 п.о.), BsmI (7269 п.о.),

EcoRV (6457 п.о.), HindIII (1590 п.о.), NotI (1146 п.о.), PfoI (11021 п.о.), PmlI (5699 п.о.), SpeI

(4622 п.о.), SmaI (6466 п.о.), Tth111I (10585 п.о.).

Генетическая конструкция экспрессионного вектора приведена на фиг. 3.

Трансфекцию проводили с использованием коммерчески доступного штамма CHO M (Selexis). Выбор линии клеток-продуцентов обусловлен необходимостью формирования оптимального профиля гликозилирования при синтезе человеческих белков, а также их стабильностью, безопасностью и возможностью применения суспензионных условий культивирования данной линии клеток, что является важнейшими параметрами для производства терапевтических антител.

Культивирование проводилось в режиме fed-batch с использованием питательной среды BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific) и нутриентной добавки CellBoost 3 (HyClone) в течение 10 суток при температуре 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в газовой фазе инкубатора. После культивирования культуральная жидкость осветлялась центрифугированием и передавалась на выделение.

Для выделения и очистки целевого продукта была разработана схема, включающая аффинную стадию с использованием сорбента на основе протеина А (с выходом продукта свыше 90%) и катионообменную хроматографию на сорбенте высокого разрешения, обеспечивающую эффективное разделение целевой формы белка и его олигомерных форм (выход целевой фракции более 80%). В результате были получены биспецифические антитела в количествах, достаточных для исследования их фармакокинетических и фармакодинамических свойств.

Пример 2. Фармацевтическая композиция на основе антитела против CD3\*CD19.

Для проведения экспериментов на животных использовали фармацевтическую композицию следующего состава: 0,7 мг/мл антитела против CD3\*CD19 по изобретению (далее GNR-047), 150 мМ хлорид натрия, 1,8% маннитол, 20 мМ фосфат натрия, 0,01% полисорбат 80.

Условия очистки антитела против CD3\*CD19 по изобретению на последней хроматографической стадии процесса подобраны таким образом, что целевой белок элюируется с сорбента в виде концентрированной субстанции, содержащей все требуемые компоненты финальной формуляции. Таким образом, для приготовления готовой лекарственной формы раствор антитела с концентрацией около 5 мг/мл (концентрированный раствор, полученный в примере 1 после хроматографической очистки) разбавляли до требуемой концентрации 0,7 мг/мл с использованием буфера готовой лекарственной формы при перемешивании. Полученный раствор подвергали стерилизующей фильтрации с использованием фильтра с диаметром пор 0,22 мкм и разливали в стерильные флаконы для хранения композиции и последующих экспериментов.

Для получения лиофилизированной композиции раствор, содержащий антитела против CD3\*CD19 по изобретению в буфере готовой формы (150 мМ хлорид натрия, 1,8% маннитол, 20 мМ фосфат натрия, 0,01% полисорбат 80), подвергали лиофилизации при стандартных условиях, включающих стадию замораживания и вакуумного обезвоживания. При этом хлорид натрия и маннит использовали в качестве кристаллизующихся компонентов, наличие которых позволяет сформировать таблетку, а маннит также играл роль стабилизатора при лиофилизации. Полученный лиофильный препарат хранили при 4С в герметичных флаконах.

В качестве растворителя для восстановления лиофилизированной композиции использовали воду

для инъекций. Для восстановления препарата к флакону, содержащему лиофилизированную композицию антитела, при комнатной температуре добавляли 0,5 мл растворителя и осторожно перемешивали покачиванием до полного растворения. В качестве растворителя также может выступать бактериостатическая вода для инъекций, растворение в которой позволяет многократно использовать препарат в течение 7 дней.

Пример 3. Изучение биологической активности.

Биологическую активность полученного антитела оценивали путем определения констант связывания в конкурентном анализе на клетках линии Раджи CD3-/CD19+ (Raji, ATCC® CCL-86) и Джуркат CD3+/CD19- (Jurkat, ATCC® TIB-152) из коллекции ATCC.

В качестве препарата сравнения использовали антитело МТ-103 (блинатумомаб). После инкубации с целевыми молекулами в последовательных 10-кратных разведениях от 100 до 0,1 нМ к клеткам добавляли конкурирующее антитело (HD37 или ОКТ3) в концентрации 6 нМ. Клетки промывали натрий-фосфатным буферным раствором с pH 7,0 и прокрашивали anti-Human-FITC антителами. Прокрашенные клетки анализировали на FACS Calibur.

Результаты связывания приведены в табл. 1 и на фиг. 4.

Таблица 1

|         | EC50, клетки Jurkat (CD3+/CD19-), нМ | EC50, клетки Raji (CD3-/CD19+), нМ |
|---------|--------------------------------------|------------------------------------|
| MT103   | 21,58                                | 1,70                               |
| GNR-047 | 0,30                                 | 0,87                               |

Из таблицы видно, что антитело GNR-047 связывается как с CD3, так и с CD19, причем в обоих случаях более эффективно, чем препарат сравнения МТ103. Такие низкие в сравнении с препаратом сравнения значения IC50 могут объясняться наличием 2х валентностей для каждой специфичности (CD3 и CD19).

Пример 4. Сравнение фармакокинетических характеристик при внутривенном и подкожном введении.

Ввиду того что препарат GNR-047 показал улучшенные фармакокинетические характеристики при внутривенном введении по сравнению с МТ103, целесообразным являлось определение фармакокинетических параметров при более удобном подкожном введении, при котором GNR-047 будет пролонгировано высвобождаться из депо в кровоток.

Для проведения эксперимента использовались крысы линии Sprague Dawley (питомник лабораторных животных "Пушино" филиала Института биорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук) массой около 400 г, 3 крысы на группу.

Каждой крысе вводили исследуемое антитело GNR-047 или МТ-103 внутривенно в дозировке 0,5 мг/кг или подкожно в дозировке 2,0 мг/кг. Образцы крови отбирали через определенные промежутки времени после инъекции, начиная с 5 мин, и определяли концентрации препаратов в плазме крови при помощи твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Полученные результаты представлены в табл. 2 и на фиг. 5 и 6.

Таблица 2

| Характеристика                                 | МТ-103                 |                     | Антитело GNR-047       |                     |
|--|------------------------|---------------------|------------------------|---------------------|
|  | Внутривенно, 0,5 мг/кг | Подкожно, 2,0 мг/кг | Внутривенно, 0,5 мг/кг | Подкожно, 2,0 мг/кг |
| T <sub>1/2</sub> , часов                       | 4,6                    | н/д*                | 58,7                   | 70,1                |
| C <sub>max</sub> , мкг/мл                      | 14,4                   | 0,68                | 16,6                   | 8,1                 |
| AUC <sub>(0-t)</sub> , мкг*ч/мл                | 43,1                   | 15,5                | 514                    | 1112                |
| AUC <sub>(0-inf)</sub> , мкг*ч/мл              | 59,7                   | 15,5*               | 560                    | 1420                |
| f <sub>a</sub> (абсолютная биодоступность)* ** | -                      | 6%                  | -                      | 63%                 |

\* н/д - достоверно не определяется;

\*\* - AUC<sub>(0-inf)</sub> в данном случае совпадает с AUC<sub>(0-t)</sub>, так как в последней точке фармакокинетической кривой концентрация МТ103 близка к нулю;

\*\*\* - параметр рассчитан с учетом разницы доз.

Где

T<sub>1/2</sub> - необходимое для снижения концентрации лекарственного препарата в плазме крови на 50% в

результате элиминации;  $C_{max}$  - наивысшее значение концентрации лекарственного препарата в плазме крови;  $AUC_{(0-t)}$  - площадь, ограниченная фармакокинетической кривой и осью абсцисс во временном интервале с момента введения лекарственного препарата до момента отбора последней пробы крови;  $AUC_{(0-inf)}$  - площадь, ограниченная фармакокинетической кривой и осью абсцисс, экстраполированная во времени с момента введения лекарственного препарата до бесконечности;  $f_a$  - часть дозы лекарственного препарата (в %), достигшая системного кровотока после внесосудистого введения.

В результате было показано значительное увеличение времени полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и экспозиция ( $AUC_{(0-inf)}$  - площадь под фармакокинетической кривой) препарата GNR-047 в сравнении с препаратом МТ103, при сохранении максимальной пиковой концентрации ( $C_{max}$ ) при внутривенном введении.

При подкожном введении крысам абсолютная биодоступность препарата GNR-047 составила порядка 60%, в то время как МТ-103 показал очень низкую биодоступность - 6% (см. фиг. 6б).

Пример 5. Сравнение противоопухолевой активности GNR-047 и МТ 103 на модели опухолевого ксенотрансплантата клеток линии Raji (Раджи) у мышей NOD/SCID при реконституции МКПК человека.

Цель исследования заключалась в сравнении эффективности препаратов GNR-047 и МТ103 у мышей NOD/SCID (Тасоніс, Дания) при нескольких уровнях дозы, на модели ксенотрансплантата опухолевых клеток линии Раджи с одновременных инъекций моноклеарных клеток периферической крови (МКПК) человека иммунодефицитным мышам NOD/SCID.

Клетки линии Раджи (лимфома Беркитта человека) предварительно смешивали с МКПК человека и инокулировали подкожно с последующим внутривенным или подкожным введением исследуемых препаратов. Для этого девяти экспериментальным группам иммунодефицитных мышей NOD/SCID (9 животных на группу) подкожно вводили или клетки линии Раджи лимфомы Буркитта человека, или суспензию предварительно смешанных клеток линии Раджи и МКПК человека. По три животных из каждой группы получали МКПК человека от одного из трех отдельных здоровых доноров (когорты 1, 2 и 3). Через 2 ч после инокуляции клеток животным внутривенно или подкожно вводили, или НФБ (натрий-фосфатный буферный раствор), или исследуемые препараты GNR-047 или МТ 103 в различных дозах. Вводимый объем составлял 200 мкл. Во всех группах в течение 45 дней (дни с 3 по 48) оценивали объем опухоли.

Вводимые растворы готовили путем разведения раствора (композиции) GNR-047, полученного в примере 2 (0,7 мг/мл), или МТ103 (0,52 мкг/мл) в 0,9% физиологическом растворе до получения концентрации 5 мкг/мл (доза 1 мкг) или 0,5 мкг/мл (доза 0,1 мкг). Экспериментальные группы описаны в табл. 3.

Таблица 3

| Группа | № мыши                        | Клетки*, инокулированные путем п/к инъекции (д 0)   | Исследуемый препарат (инъекция 1 раз/сутки)   |
|--------|-------------------------------|---|---|
| 1      | 1 - 3<br>4 - 6<br>7 - 9       | Клетки линии Раджи<br>Клетки линии Раджи<br>Клетки линии Раджи  | НФБ   |
| 2      | 10 - 12<br>13 - 15<br>16 - 18 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)<br>Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)<br>Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3) | НФБ   |
| 3      | 19 - 21<br>22 - 24<br>25 - 27 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)<br>Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)<br>Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3) | МТ-103<br>1<br>мкг/животное,<br>внутривенно   |
| 4      | 28 - 30<br>31 - 33<br>34 - 36 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)<br>Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)<br>Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3) | МТ-103<br>0,1<br>мкг/животное,<br>внутривенно |

| Группа | № мыши  | Клетки*, инокулированные путем п/к инъекции (д 0) | Исследуемый препарат (инъекция 1 раз/сутки)    |
|--------|---------|---|--|
| 5      | 37 - 39 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)               | GNR-047<br>1<br>мкг/животное,<br>внутривенно   |
|        | 40 - 42 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)               |  |
|        | 43 - 45 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3)               |  |
| 6      | 46 - 48 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)               | GNR-047<br>0,1<br>мкг/животное,<br>внутривенно |
|        | 49 - 51 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)               |  |
|        | 52 - 54 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3)               |  |
| 7      | 55 - 57 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)               | GNR-047<br>4<br>мкг/животное,<br>внутривенно   |
|        | 58 - 60 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)               |  |
|        | 61 - 63 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3)               |  |
| 8      | 64 - 66 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)               | GNR-047<br>1,7<br>мкг/животное,<br>подкожно    |
|        | 67 - 69 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)               |  |
|        | 70 - 72 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3)               |  |
| 9      | 73 - 75 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 1)               | GNR-047<br>0,17<br>мкг/животное,<br>подкожно   |
|        | 76 - 78 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 2)               |  |
|        | 79 - 81 | Клетки линии Раджи + МКПК (Донор 3)               |  |

\* -  $2,5 \times 10^6$  клеток линии Раджи,  $1 \times 10^7$  МКПК.

У экспериментальных животных определяли следующие показатели: выживаемость, масса тела, объем опухоли, масса опухоли.

Массу тела определяли в день 0 и в последующем регистрировали три раза в неделю до дня 48. Объем опухоли контролировали 3 раза в неделю со дня 3 до окончания исследования путем измерения большого и малого диаметров опухоли штангенциркулем. На основании диаметров вычисляли объем опухоли, используя следующую формулу:

$$\text{Объем} = (\text{малый диаметр})^2 \times \text{большой диаметр} \times 0,5$$

В контрольной группе 1, получавшей НФБ (только клетки линии Раджи), до завершения исследования выжили 11% животных. Выживаемость у животных группы 2, получавших клетки линии Раджи и МКПК человека, не изменилась. В обеих группах смертность была обусловлена исключительно этаназией по этическим соображениям (вследствие большого объема опухоли).

Введение GNR-047 и МТ 103 повысило выживаемость в группах 3-9, что отражено в табл. 4, причем при большей дозе исследуемый препарат оказался более эффективным, чем препарат сравнения:

Таблица 4

Выживаемость животных

| № группы | Вводимый препарат | Доза (мкг/животное) | Животные (n) | Выживаемость |      |
|----------|-------------------|---------------------|--------------|--------------|------|
|          |                   |                     |              | (n)          | (%)  |
| 1        | НФБ               | -                   | 9            | 1            | 11   |
| 2        | НФБ               | -                   | 9            | 4            | 44,4 |
| 3        | МТ 103            | 1,0                 | 9            | 4            | 44,4 |
| 4        | МТ 103            | 0,1                 | 9            | 7            | 77,8 |
| 5        | GNR-047           | 1,0                 | 9            | 9            | 100  |
| 6        | GNR-047           | 0,1                 | 9            | 7            | 77,8 |
| 7        | GNR-047           | 4,0                 | 9            | 8            | 88,9 |
| 8        | GNR-047           | 1,7                 | 9            | 8            | 88,9 |
| 9        | GNR-047           | 0,17                | 9            | 7            | 77,8 |

Критерии выведения экспериментальных животных из исследования: объем опухоли >10% массы тела; изъязвление опухоли; снижение массы тела >20%.

Рост опухоли значительно ингибировался или подавлялся во всех исследуемых группах, получавших GNR-047 или МТ 103 (группы 3-9) по сравнению с контрольной группой 2, получавшей НФБ. При этом во всех исследуемых группах, получавших GNR-047 или МТ 103, ингибирование роста опухоли оказалось статистически значимым ( $p < 0,05$ ).

В табл. 5 приведены размеры опухоли для групп 1, 2, 4, 8 и 9, а соответствующие сравнительные графики, позволяющие оценить размер опухоли при внутривенном и подкожном введении (для групп 4, 8 и 9), приведены на фиг. 7.

Таблица 5

| Группа | День исследования |       |       |        |        |        |       |
|--------|-------------------|-------|-------|--------|--------|--------|-------|
|        | 3                 | 6     | 8     | 10     | 13     | 15     | 17    |
| 1      | 0,0               | 10,0  | 14,6  | 28,9   | 47,9   | 95,2   | 199,9 |
| 2      | 2,2               | 6,0   | 13,7  | 28,4   | 58,8   | 122,3  | 236,6 |
| 4      | 6,1               | 10,2  | 19,6  | 27,1   | 38,2   | 64,3   | 112,7 |
| 8      | 1,9               | 3,4   | 10,9  | 15,0   | 19,0   | 28,6   | 34,2  |
| 9      | 4,8               | 7,3   | 12,0  | 15,8   | 22,7   | 37,4   | 48,9  |
| Группа | День исследования |       |       |        |        |        |       |
|        | 20                | 22    | 24    | 27     | 29     | 31     |       |
| 1      | 387,0             | 561,5 | 781,5 | 1046,5 | 1214,8 | 1559,2 |       |
| 2      | 443,9             | 598,8 | 745,0 | 1038,8 | 1243,7 | 1465,2 |       |
| 4      | 149,8             | 176,4 | 254,5 | 377,1  | 465,4  | 589,6  |       |
| 8      | 37,2              | 33,5  | 45,1  | 92,3   | 108,4  | 187,9  |       |
| 9      | 75,9              | 94,8  | 190,8 | 259,8  | 320,3  | 409,9  |       |

Промышленная применимость.

Настоящее изобретение может быть использовано в медицине для лечения В-клеточных заболеваний или истощения В-клеток, в том числе В-лимфобластная лимфома/В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов, в том числе В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома); В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лимфоплазмоцитарная лимфома; селезеночная лимфома маргинальной зоны; волосатоклеточный лейкоз; плазмоклеточная миелома/плазмоцитома; экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа; нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; диффузная В-крупноклеточная лимфома; медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома; первичная экссудативная лимфома; лимфома/лейкоз Беркитта, а также для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных патологической регуляцией В-клеток, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, гломерулонефрит, рассеянный склероз и миастения гравис. Настоящее изобретение также может быть использовано в фармацевтической промышленности для получения фармацевтических композиций, готовых лекарственных форм и наборов, содержащих антитело по изобретению, для лечения указанных выше заболеваний.

Свободный текст перечня последовательностей.

- SEQ ID № 1 - переменный домен легкой цепи анти-CD3-антитела,
- SEQ ID № 2 - переменный домен тяжелой цепи анти-CD3 антитела,
- SEQ ID № 3 - переменный домен легкой цепи анти-CD19 антитела,
- SEQ ID № 4 - переменный домен тяжелой цепи анти-CD19 антитела,
- SEQ ID № 5 - константный домен CH2 CH3 IG2,
- SEQ ID № 6 - линкеры,
- SEQ ID № 7 - линкер L2,
- SEQ ID № 8 - линкер L3,
- SEQ ID № 9 - шарнирная область H,
- SEQ ID № 10 - антитело GNR-047.

## Перечень последовательностей

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный

биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> мышь

<223> переменный домен легкой цепи анти-CD3-антитела

<400> 1

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala  
 5 10 15 20 25  
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr  
 30 35 40 45 50  
 Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser  
 55 60 65 70 75  
 Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly  
 80 85 90 95 100  
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 105

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный

биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> мышь

<223> переменный домен тяжелой цепи анти-CD3 антитела

<400> 2

Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser  
 5 10 15 20 25  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr  
 30 35 40 45 50  
 Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser  
 55 60 65 70 75  
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr  
 80 85 90 95 100  
 Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Ala Ala  
 105 110 115 120

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный

биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> мышь

<223> переменный домен легкой цепи анти-CD19 антитела

<400> 3

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala  
 5 10 15 20 25  
 Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu  
 30 35 40 45 50  
 Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 55 60 65 70 75  
 Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp  
 80 85 90 95 100  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 105 110

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный

биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 4

<211> 125  
 <212> PRT  
 <213> мышь  
 <223> переменный домен тяжелой цепи анти-CD19 антитела  
 <400> 4

Gln Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala  
                   5                  10                  15                  20                  25  
 Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
                   30                  35                  40                  45                  50  
 Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu  
                   55                  60                  65                  70                  75  
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg  
                   80                  85                  90                  95                  100  
 Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
                   105                  110                  115                  120                  125

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный  
 биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 5

<211> 216

<212> PRT

<213> человек

<223> константный домен CH2 CH3 IG2

<400> 5

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
                   5                  10                  15                  20                  25  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
                   30                  35                  40                  45                  50  
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu  
                   55                  60                  65                  70                  75  
 Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro  
                   80                  85                  90                  95                  100  
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu  
                   105                  110                  115                  120                  125

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
                   130                  135                  140                  145                  150  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
                   155                  160                  165                  170                  175  
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
                   180                  185                  190                  195                  200  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                   205                  210                  215                  220                  225

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный  
 биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<220> искусственная последовательность

<223> линкер L1

<400> 6

Gly Gly Ser Gly Gly Ser

5

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный  
 биотехнологический центр "Генериум"

<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<220> искусственная последовательность

<223> линкер L2

<400> 7

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

5

10

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный  
биотехнологический центр "Генериум"  
<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19  
<160> 10  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<220> искусственная последовательность  
<223> линкер L3  
<400> 8  
Gly Gly Ser Gly Gly Ser

5

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный  
биотехнологический центр "Генериум"  
<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19  
<160> 10  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<220> искусственная последовательность  
<223> шарнирная область H  
<400> 9  
Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

5 10

<110> Общество с ограниченной ответственностью, "Международный  
биотехнологический центр "Генериум"  
<120> БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD3\*CD19  
<160> 10  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 10  
<211> 720  
<212> PRT  
<220> искусственная последовательность  
<223> антитело GNR-047  
<400> 10  
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala

|   |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 5   | 10  | 15  | 20  | 25  |
| Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr     |     |     |     |     |
| 30  | 35  | 40  | 45  | 50  |
| Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser |     |     |     |     |
| 55  | 60  | 65  | 70  | 75  |
| Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly |     |     |     |     |
| 80  | 85  | 90  | 95  | 100 |
| Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gln Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val |     |     |     |     |
| 105   | 110 | 115 | 120 | 125 |
| Arg Pro Gly Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr Trp Met Asn Trp Val |     |     |     |     |
| 130   | 135 | 140 | 145 | 150 |
| Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Tyr Asn Gly |     |     |     |     |
| 155   | 160 | 165 | 170 | 175 |
| Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala |     |     |     |     |
| 180   | 185 | 190 | 195 | 200 |
| Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp |     |     |     |     |
| 205   | 210 | 215 | 220 | 225 |
| Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly |     |     |     |     |
| 230   | 235 | 240 | 245 | 250 |
| Gly Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys |     |     |     |     |
| 255   | 260 | 265 | 270 | 275 |
| Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro |     |     |     |     |
| 280   | 285 | 290 | 295 | 300 |
| Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr |     |     |     |     |
| 305   | 310 | 315 | 320 | 325 |
| Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp |     |     |     |     |
| 330   | 335 | 340 | 345 | 350 |
| Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln         |     |     |     |     |
| 355   | 360 | 365 | 370 | 375 |
| Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg |     |     |     |     |
| 380   | 385 | 390 | 395 | 400 |
| Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly |     |     |     |     |
| 405   | 410 | 415 | 420 | 425 |
| Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met |     |     |     |     |
| 430   | 435 | 440 | 445 | 450 |
| Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu |     |     |     |     |

|   |     |     |     |     |
|---|-----|-----|-----|-----|
| 455   | 460 | 465 | 470 | 475 |
| Asp Tyr Trp Gly Gln Thr Thr Leu Thr Val Ser Ala Ser Ala Ala Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys         |     |     |     |     |
| 480   | 485 | 490 | 495 | 500 |
| Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met |     |     |     |     |
| 505   | 510 | 515 | 520 | 525 |
| Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp |     |     |     |     |
| 530   | 535 | 540 | 545 | 550 |
| Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val |     |     |     |     |
| 555   | 560 | 565 | 570 | 575 |
| Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly |     |     |     |     |
| 580   | 585 | 590 | 595 | 600 |
| Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro |     |     |     |     |
| 605   | 610 | 615 | 620 | 625 |
| Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile |     |     |     |     |
| 630   | 635 | 640 | 645 | 650 |
| Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly |     |     |     |     |
| 655   | 660 | 665 | 670 | 675 |
| Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val |     |     |     |     |
| 680   | 685 | 690 | 695 | 700 |
| Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys                     |     |     |     |     |
| 705   | 710 | 715 | 720 |     |

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, специфично связывающееся с CD3 и CD19, включающее две соединенных дисульфидными связями цепи, каждая из которых состоит из следующих доменов: VL(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG), где VL(CD3), VL(CD19), VH(CD3) и VH(CD19) представляют собой переменные домены легкой и тяжелой цепей антител против CD3 и CD19 соответственно,

L1, L2, L3 - линкерные последовательности, по существу, соответствующие последовательностям SEQ ID NO: 6, 7 и 8 соответственно,

H - шарнирная область иммуноглобулина IgG, по существу, соответствующая последовательности SEQ ID NO: 9,

CH2-CH3 (IgG) - константная область Fc-домена иммуноглобулина IgG.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что указанная константная область Fc-домена иммуноглобулина IgG представляет собой константную область Fc-домена иммуноглобулина IgG2.

3. Антитело по п.2, отличающееся тем, что константная область Fc-домена иммуноглобулина IgG2 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

4. Антитело по пп.1-3, отличающееся тем, что имеет аминокислотную последовательность, по существу, соответствующую последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10.

5. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет время полужизни в крови, увеличенное по сравнению с временем полужизни блинатумомаба, измеренным, по существу, в аналогичных условиях.

6. Антитело по п.1, отличающееся тем, что имеет время полужизни в крови более 40 ч.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.1-6.

8. Вектор для обеспечения экспрессии биспецифического антитела против CD3\*CD19 в клетке-хозяине, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность легкой или тяжелой цепи биспецифического антитела, специфично связывающегося с CD3 и CD19, по любому из пп.1-6.

9. Вектор по п.8, отличающийся тем, что является экспрессионной плазмидой pRA1451, характеризующейся следующими признаками:

состоит из 11308 п.о.,

имеет молекулярную массу 6.99 МДа,

содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10,

обеспечивает устойчивость клеток млекопитающих, трансфицированных указанной плазмидой, к пуromицину;

содержит следующие элементы:

CMV<sub>е</sub>/EF1<sub>α</sub> pro - энхансер вируса CMV и промотор транскрипции гена фактора элонгации альфа,

BGH pA - сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста,

sv40 enh- энхансер вируса SV40,

SGE 1 - элемент прикрепления к ядерному матриксу,

Amp<sup>r</sup> - ген β-лактамазы,

sv40 pro - промотор вируса SV40,

puro<sup>r</sup> - ген устойчивости к пуromицину,

pA - синтетический сигнал полиаденилирования,

содержит уникальные участки узнавания следующих эндонуклеаз рестрикции:

AccI (6490 и.о.), AgeI (460 и.о.), ApaI (995 п.о.), BmgBI (3270 п.о.), BsmI (7269 и.о.), EcoRV (6457 и.о.), HindIII (1590 п.о.), NotI (11146 п.о.), PfoI (1 1021 п.о.), PmlI (5699 п.о.), SpeI (4622 и.о.), SwaI (6466 п.о.), TthI 111 (10585 и.о.).

10. Клетка-хозяин для экспрессии биспецифического антитела, специфично связывающегося с CD3 и CD19, по любому из пп.1-6, содержащая нуклеиновую кислоту по п.7 или вектор по п.8.
11. Клетка по п.10, отличающаяся тем, что является эукариотической клеткой.
12. Клетка по п.11, отличающаяся тем, что является клеткой млекопитающего.
13. Клетка по п.12, отличающаяся тем, что является клеткой китайского хомячка.
14. Способ получения антитела по любому из пп.1-6, включающий, по меньшей мере, культивирование клетки по любому из пп.10-13 в условиях, обеспечивающих экспрессию антитела по любому из пп.1-6, и выделение целевого продукта.
15. Способ по п.14, отличающийся тем, что клетка является клеткой СНО.
16. Способ очистки антитела по любому из пп.1-6, включающий по меньшей мере одну стадию хроматографии, проводимую в условиях, обеспечивающих получение препарата антитела по любому из пп.1-6, по существу, свободного от примесей клетки-хозяина.
17. Способ по п.16, отличающийся тем, что дополнительно включает стадию центрифугирования.
18. Способ по п.17, отличающийся тем, что стадию центрифугирования выполняют до стадии хроматографии.
19. Способ по п.17, отличающийся тем, что дополнительно включает еще одну стадию хроматографии.
20. Способ по п.19, отличающийся тем, что первая стадия хроматографии выполняется с использованием сорбента на основе протеина А, а вторая стадия хроматографии является стадией катионообменной хроматографии.
21. Применение антитела по пп.1-6 для лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями.
22. Применение по п.21, отличающееся указанным В-клеточным заболеванием, истощением В-клеток или замедлением развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями, является одно из следующего:
 

В-лимфобластная лимфома/В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов, в том числе В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома); В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лимфоплазмоцитарная лимфома; селезеночная лимфома маргинальной зоны; волосатоклеточный лейкоз; плазмоклеточная миелома/плазмоцитомы; экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа; нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; диффузная В-крупноклеточная лимфома; медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома; первичная экссудативная лимфома; лимфома/лейкоз Беркитта, а также для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных патологической регуляцией В-клеток, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, гломерулонефрит, рассеянный склероз и миастения гравис.
23. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество антитела по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.
24. Фармацевтическая композиция по п.23, отличающаяся тем, что предназначена для В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями.
25. Фармацевтическая композиция по п.24, отличающаяся тем, что указанным В-клеточным заболеванием, истощением В-клеток или замедлением развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями, является одно из следующего:
 

В-лимфобластная лимфома/В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов, в том числе В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома); В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лимфоплазмоцитарная лимфома; селезеночная лимфома маргинальной зоны; волосатоклеточный лейкоз; плазмоклеточная миелома/плазмоцитомы; экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа; нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; диффузная В-крупноклеточная лимфома; медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома; первичная экссудативная лимфома; лимфома/лейкоз Беркитта, а также для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных патологической регуляцией В-клеток, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, гломерулонефрит, рассеянный склероз и миастения гравис.
26. Фармацевтическая композиция по любому из пп.23-25, отличающаяся тем, что содержит дополнительно по меньшей мере одно из следующего: хлорид натрия, маннитол, фосфат натрия, полисорбат 80.

27. Способ лечения В-клеточного заболевания, истощения В-клеток или замедления развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела по пп.1-6.

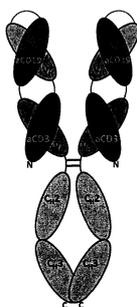
28. Способ по п.27, отличающийся тем, что антитело вводят пациенту подкожно.

29. Способ по п.27, отличающийся тем, что антитело вводят пациенту внутривенно.

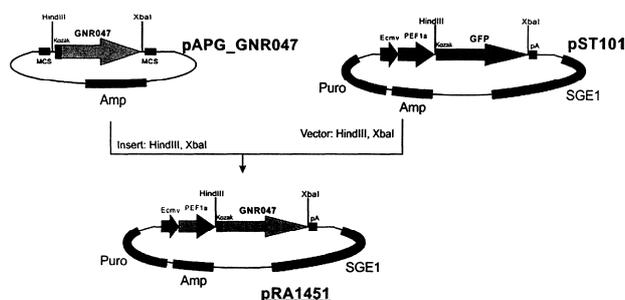
30. Способ по п.27, отличающийся тем, что антитело вводят пациенту в терапевтически эффективном количестве.

31. Способ по п.27, отличающийся тем, что указанным В-клеточным заболеванием, истощением В-клеток или замедлением развития патологического состояния, ассоциированного с В-клеточными нарушениями, является одно из следующего:

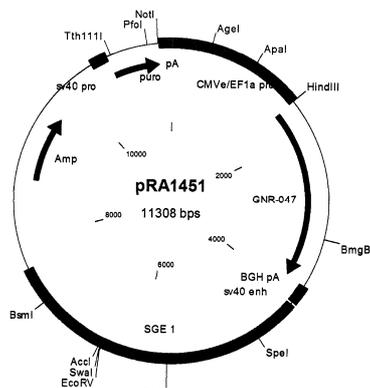
В-лимфобластная лимфома/В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; В-клеточные опухоли из периферических (зрелых) В-лимфоцитов, в том числе В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфома из малых лимфоцитов (лимфоцитарная лимфома); В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лимфоплазмочитарная лимфома; селезеночная лимфома маргинальной зоны; волосатоклеточный лейкоз; плазмноклеточная миелома/плазмочитома; экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны MALT-типа; нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны; фолликулярная лимфома; лимфома из клеток мантийной зоны; диффузная В-крупноклеточная лимфома; медиастинальная диффузная В-крупноклеточная лимфома; первичная экссудативная лимфома; лимфома/лейкоз Беркитта, а также для лечения аутоиммунных заболеваний, вызванных патологической регуляцией В-клеток, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, гломерулонефрит, рассеянный склероз и миастения гравис.



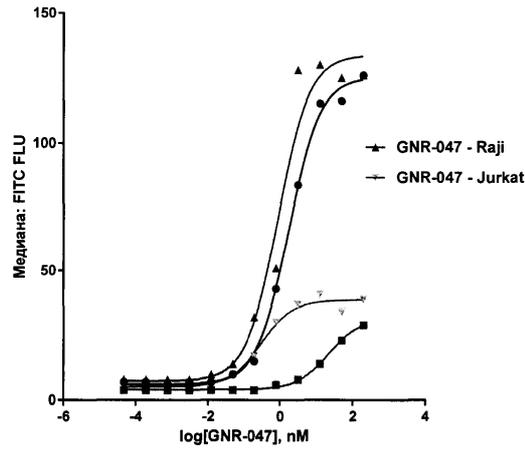
Фиг. 1



Фиг. 2

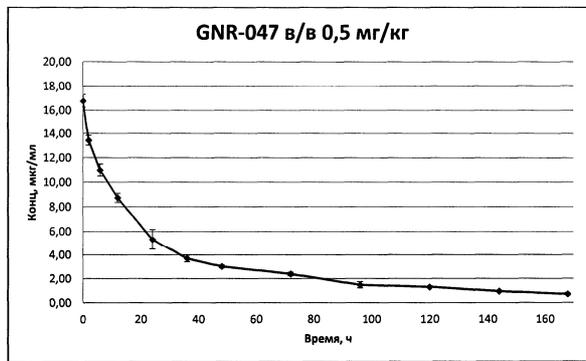


Фиг. 3

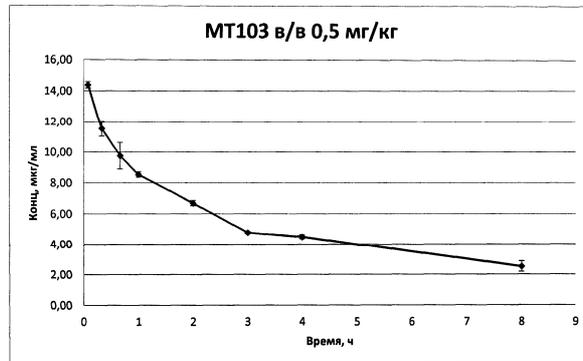


|      | MT103 - Raji | MT103 - Jurkat | GNR-047 - Raji | GNR-047 - Jurkat |
|------|--------------|----------------|----------------|------------------|
| EC50 | 1.700        | 21.58          | 0.8694         | 0.3062           |

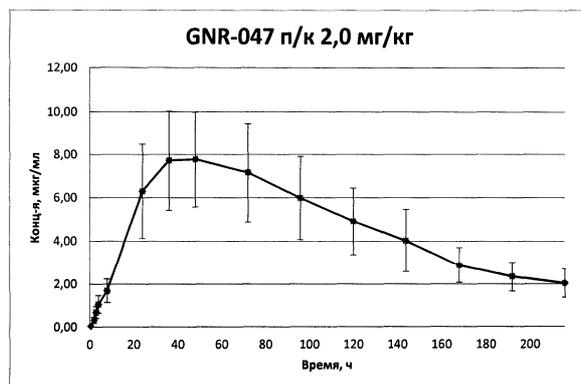
Фиг. 4



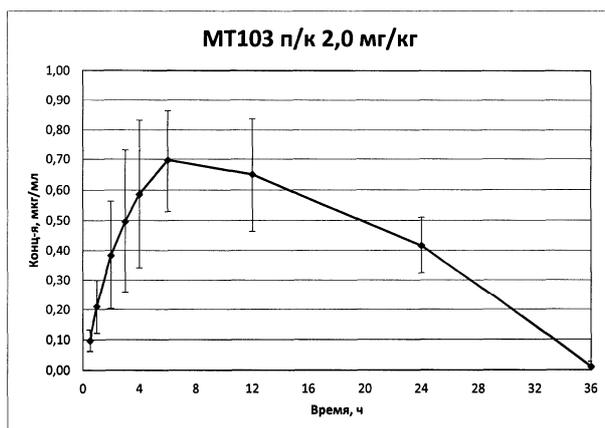
Фиг. 5а



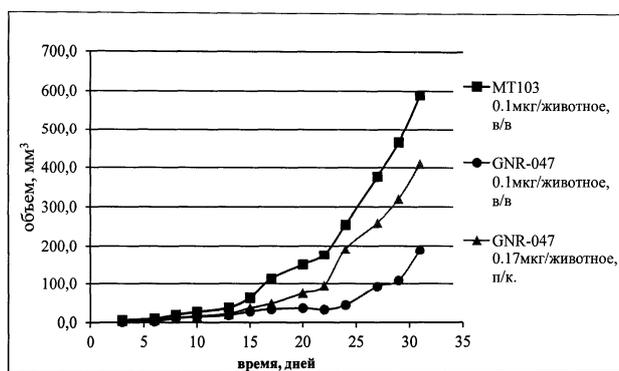
Фиг. 5б



Фиг. 6а



Фиг. 6б



Фиг. 7

