



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.27

(21) Номер заявки
201790530

(22) Дата подачи заявки
2015.09.03

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АГЕНТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С CD123, И ВИДЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/046,682

(32) 2014.09.05

(33) US

(43) 2018.03.30

(86) PCT/US2015/048316

(87) WO 2016/036937 2016.03.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(72) Изобретатель:
Годе Франсуа, Агтар Рикардо,
Харман Бенджамин К., Ли Инчжэ,
Ло Цзиньцюань, Макдейд Ронан,
Померантц Стивен К., Тэм Сьюзан Х.,
Тепляков Алексей, Уилер Джон, Ву
Шэн-Дзюн, Немет Дженнифер Ф. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) EP-A1-2426148
CHEN J. ET AL.: "A new isoform of
interleukin-3 receptor alpha with novel differentiation
activity and high affinity binding mode, (including
Supplementary materials and methods)", THE

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol.
284, no. 9, 27 February 2009 (2009-02-27),
XP002751219, USA abstract figure 1 supplementary
materials and methods page 5, lines 18-19 Document
consists of pages 5763-5773, 1-12

BOVOLENTA C. ET AL.: "Human T-
cell leukemia virus type 2 induces survival
and proliferation of CD34+ TF-1 cells through
activation of STAT1 and STAT5 by secretion
of interferon-gamma and granulocyte macrophage-
colony-stimulating factor", BLOOD, vol. 99, no.
1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 224-231,
XP002751220, USA page 225, right-hand column,
paragraph 2

KUO S-R. ET AL.: "Engineering a
CD123×CD3 bispecific scFv immunofusion for the
treatment of leukemia and elimination of leukemia
stem cells", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN &
SELECTION, vol. 25, no. 10, 2012, pages 561-569,
XP002721301, abstract figure 1

WO-A2-2013173820
BROUGHTON S. ET AL.: "Dual mechanism
of interleukin-3 receptor blockade by an anti-cancer
antibody", CELL REPORTS, vol. 8, July 2014
(2014-07), pages 410-419, XP002751221, abstract
page 415, left-hand column, line 1-line 3

WO-A1-2012021934

(57) В документе предлагаются антитела, иммуноспецифически связывающиеся с CD123. Также описываются родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описываются способы применения предложенных антител. Например, предложенные антитела можно использовать для диагностики, лечения или контроля прогрессирования, регрессирования или стабильности течения рака с экспрессией CD123; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раковым заболеванием с экспрессией CD123 и, следовательно, ответит ли он на лечение CD123-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к CD123 и CD3, описанными в настоящем документе.

Область техники

Предлагаемое описание относится к моноклональным антителам, иммуноспецифически связывающимся с кластером дифференцировки 123 (CD123; также известен как IL-3R α), мультиспецифическим антителам, иммуноспецифически связывающимся с CD123 и кластером дифференцировки 3 (CD3), и способам получения и применения описанных антител.

Предпосылки создания изобретения

Новый случай рака крови диагностируют приблизительно каждые три минуты. Наиболее распространенными видами рака крови являются лейкоз, лимфома и миелома, диагноз которых в 2014 г. в США поставят впервые 156420 людям. Приблизительно каждые 10 мин в США кто-то умирает от рака крови. Рак крови представляет собой группу заболеваний, поражающих костный мозг, клетки крови, лимфоузлы и другие части лимфатической системы. Эти виды рака непропорционально часто поражают молодых людей, причем лейкоз является самым распространенным типом рака у детей и подростков до 20 лет.

Один тип клеток рака крови экспрессирует клеточный маркер, известный как CD123 (IL-3R α). Примеры раковых клеток крови, экспрессирующих CD123, включают бласты и лейкозные стволовые клетки. Заболевания, связанные с экспрессией CD123, включают острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS; низкого и высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) и бластную плазмочитодную дендритноклеточную опухоль (DPDCN).

В настоящее время варианты лечения этих заболеваний включают более 50 конкретных лекарственных препаратов и другие препараты находятся в процессе исследований и клинических испытаний. Для лечения рака крови также часто применяют лучевую терапию (RT) и иногда используют ее вместе с лекарственной терапией. Также применяют иммунотерапию, генную терапию и персонализированные препараты. Однако эти виды лечения могут иметь существенные побочные эффекты и нежелательные реакции. Следовательно, существует потребность в новых и улучшенных видах терапии онкологических заболеваний крови с экспрессией CD123 (IL-3R α).

Изложение сущности изобретения

В настоящем документе предлагаются антитела, иммуноспецифически связывающиеся с CD123, а также их антигенсвязывающие фрагменты. Также описываются родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты, клетки, экспрессирующие предложенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Кроме того, описываются способы применения антител и антигенсвязывающих фрагментов. Например, CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, регрессирования или стабильности течения рака с экспрессией CD123; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раковым заболеванием с экспрессией CD123 и, следовательно, ответит ли он на лечение CD123-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к CD123 и CD3, описанными в настоящем документе.

Также в настоящем документе предлагаются мультиспецифические антитела, иммуноспецифически связывающиеся с CD123 и CD3, а также их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. Также описываются родственные полинуклеотиды, способные кодировать предложенные мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3, клетки, экспрессирующие предложенные антитела, а также соответствующие векторы и меченные с возможностью обнаружения мультиспецифических антител. Кроме того, описываются способы применения предложенных мультиспецифических антител. Например, мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3 можно использовать для диагностики или контроля прогрессирования, регрессирования или стабильности течения рака с экспрессией CD123; для определения того, следует ли проводить лечение рака у пациента; или для определения того, поражен ли субъект раковым заболеванием с экспрессией CD123 и, следовательно, ответит ли он на лечение CD123-специфическим противораковым препаратом, например мультиспецифическими антителами к CD123 \times CD3, описанными в настоящем документе. CD123-специфические антитела.

В настоящем документе описываются выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфические в отношении CD123. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связывают человеческий CD123 SP1 (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связывают человеческий CD123 SP2 (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связывают человеческий CD123 SP1 и SP2. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связывают человеческий CD123 SP1 и CD123 яванского макака (SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты связываются с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из (i) сегмента внеклеточного домена (ECD) CD123 SP2, содержащего остатки 195-202 (RARERVYE (SEQ ID NO: 234)), и/или сегмента CD123 SP2

ECD, содержащего остатки 156-161 (RKFRYE (SEQ ID NO: 232)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 173-178 (TEQVRD (SEQ ID NO: 233)), или (ii) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 164-175 (IQKRMQPVITEQ (SEQ ID NO: 228)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 184-189 (LLNPGT (SEQ ID NO: 229)). Такое CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с CD123 с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с CD123 с CD123-специфическим антителом или антигенсвязывающим фрагментом, связывающимся с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из (i) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 195-202 (RARERVYE (SEQ ID NO: 234)), или (ii) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 164-175 (IQKRMQPVITEQ (SEQ ID NO: 228)). Антитела или фрагменты, связывающиеся, по меньшей мере, с одним остатком в этих эпитопах, также могут связываться с дополнительными остатками в CD123 ECD, включая один или более остатков из (i) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 156-161 (RKFRYE (SEQ ID NO: 232)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 173-178 (TEQVRD (SEQ ID NO: 233)), или (ii) один или более остатков из сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 184-189 (LLNPGT (SEQ ID NO: 229)). Такое CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с CD123 с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты, например, описанные в двух предыдущих абзацах, представляют собой нейтрализующие антитела. Нейтрализующее CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает те, которые способны ингибировать связывание IL-3 с CD123, что определяют посредством измерения снижения фосфорилирования STAT5 при стимуляции клеток TF-1 при помощи rhIL-3.

В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут предотвращать связывание IL-3 с рецептором CD123(IL3Ra)/CD131(IL3Rb). В других вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут предотвращать ассоциацию цепей α и β рецептора IL3R, (CD123(IL3Ra)/CD131(IL3Rb)). Антитела или антигенсвязывающие фрагменты включают те, которые способны ингибировать связывание IL3 и/или способны ингибировать гетеромеризацию CD123/CD133, что определяют посредством измерения снижения ассоциации между CD123 и CD131 и измерения утраты гетеромеризации при увеличении концентрации антител. В табл. 1 представлена сводная информация о примерах некоторых CD123-специфических антител, описанных в настоящем документе.

Таблица 1

Последовательности CDR mAb, полученных путем фагового пэннинга относительно человеческого CD123 (SEQ ID NO:)

ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ НОМЕР	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
I3RB1	DYGMS (6)	VIRGGSSKYYAHSGRFRNELD DSVKG Y (7)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (8)	WASTRE QQQYSTP S LT (9)		
I3RB2	GYWMH (12)	AIRSDGSSKYYADGVIEDTFDY DSVKG (13)	RASQSVSSYLA (14)	DASNRA QQRSNWP T LT (15)		
I3RB3	SYWMS (18)	GIKYDGGSKYYAKWMSYFDY DSVKG (19)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (20)	WASTRE QQQYSTP S LT (9)		
I3RB4	GYGMS (21)	AISGSGGTTYAGNWWYGLGFDY DSVKG (22)	RASQSVSSYLA (23)	GASSRA QQYSSSP T LT (24)		
I3RB5	GYWMS (27)	GINYDGGSTYYADHFLAEFDY DSVKG (28)	RASQSISSYLN (29)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB6	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAGLFNWSNVALD QKFQG Y (34)	RASQSISSYLN (35)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB7	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAGKRWLADAGDF QKFQG DY (34)	RASQSISSYLN (36)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB8	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAHGFAWNDYSL QKFQG DY (34)	RASQSISSYLN (37)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB9	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAGARWFNPPENL QKFQG DY (34)	RASQSISSYLN (38)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB10	SYGIS (39)	WISAI FGNTNYAGLLYYASYLD QKFQG Y (40)	RASQSISSYLN (41)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB11	SYGIS (39)	GIIPIFGTANYADLFSWRYSNFD QKFQG Y (34)	RASQSISSYLN (42)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		
I3RB12	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAADRVWDYLDY QKFQG (34)	RASQSISSYLN (43)	AASSLQ QQSSTP S LT (30)		

ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ НОМЕР	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2 L-CDR3
I3RB13	SYGIS (39) QKFQG (44)	GIIPIFGNTNYAQS ^G GFYV ^R LDY (45)	RASQSVSSYLA (15)	DASNRA QQRSNWP T LT (16) (17)	
I3RB14	SYGIS (39) QKFQG (46)	WISAI ^F GGTTNYAGG ^P LR ^Y NHFD (47)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB15	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYADL ^F SLR ^Y SFLD (48)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB16	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYAGAV ^W G ^D Q ^W FDY (49)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB17	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYAGALS ^L W ^Y SFLD (50)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB18	SYWIS (51) PSFQG (52)	IIDPS ^D SDTRYSG ^D GS ^T DL ^D Y (53)	RASQSVSSYLA (24)	GASSRA QQ ^D YGF ^P T WT (25) (54)	
I3RB19	NYAMS (55) DSVKG (56)	GIRNG ^S STYYAG ^G PIGAR ^F PDY (57)	RASQSIGDFLN (58)	YASSLQ QQS ^Y STP S LT (59) (32)	
I3RB20	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYADD ^Q I ^W GS ^Y HLD (60)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB21	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYAEG ^W WG ^Q G ^K FDY (61)	RASQSVANFLA (62)	AASNRA QQ ^Y F ^H W ^P T YT (63) (64)	
I3RB22	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYANL ^F Y ^W AD ^S VYL (65)	RASQSVNKWLA (66)	YASNRA QQ ^G ID ^W T RT (67) (68)	
I3RB23	SYGIS (39) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYAEG ^S SW ^K N ^F RYV (69)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQ ^Y F ^D F ^P S LT (31) (70)	
I3RB24	SYAIS (33) QKFOG (34)	GIIPIFGTANYAHT ^D AW ^G Y ^R LDY (71)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB25	SYGIS (39) QKFQG (72)	GISAI ^F GNANYAR ^F K ^W W ^E S ^Y FDY (73)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB26	SYGIS (39) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYANG ^F AW ^S V ^S GNL (74)	RASQSVDNWLA (75)	GASNRA QQS ^I S ^A P T YT (76) (77)	
I3RB27	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYAAG ^W W ^N L ^R Y ^G LD (78)	RASQSVAKSLA (79)	AASNRA QQ ^T I ^G W ^P T IT (63) (80)	
I3RB28	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYAAP ^F T ^W D ^Y S ^R LD (81)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQS ^Y STP S LT (31) (32)	
I3RB29	SYAIS (33) QKFQG (34)	GIIPIFGTANYADS ^R I ^W S ^F SL ^D Y (82)	RASQSIGEWLN (83)	AASSLQ QQ ^Y Y ^H F ^P S LT (31) (84)	
I3RB30	SYAIS (33) QKFQG (86)	WIIPIFGTANYALV ^Y SS ^D FDY (87)	RASQSVANWLA (87)	YASNRA QQ ^Y D ^G W ^P T RT	

ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЙ НОМЕР	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2 L-CDR3
		(85)			(67) (88)
I3RB31	SYAIS (33)	GISAYFGNANYASYFGDAYFDY QKFQG (89)	(90)	RASQSVDKDLA (91)	GASNRA QQYDRAP T IT (76) (92)
I3RB32	SYGIS (39)	GIIPIFGTANYAGAWWAYDTYLD QKFQG (34)	Y (93)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQSYSTP S LT (31) (32)
I3RB33	SYGIS (39)	GIIPIFGTANYAGYWHWNYDYLD QKFQG (34)	Y (94)	RASQSVNDWLA (95)	GASNRA QQYKRAP T YT (76) (96)
I3RB34	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAGWSYRRLDY QKFQG (34)	(97)	RASQSVDKWLA (98)	YASNRA QQFDRAP T FT (67) (99)
I3RB35	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAHLFDAGFLDY QKFQG (34)	(100)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQYFSPF S YT (31) (101)
I3RB36	SYGIS (39)	GIIPIFGTANYADLHWAYSNFD QKFQG (34)	Y (102)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQSYSTP S LT (31) (32)
I3RB37	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYADKTDFFSRDLDY QKFQG (34)	(103)	(104)	RASQSIATWLN S LT (31) (105)
I3RB38	SYGIS (39)	GIIPIFGTANYADLMIWRPFENFD QKFQG (34)	Y (106)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ QQSYSTP S LT (31) (32)
I3RB39	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAEYGLDY QKFQG (34)	(107)	RASQSVADFLA (108)	KASNRA QQYNGWF T WT (109) (110)
I3RB40	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYAGQWWADTWFDY QKFQG (34)	(111)	(112)	RASQSVAKWLA T WT (76) (113)
I3RB41	SYAMS (114)	AISGSGGSTYYAVAYWEFFVYES DSVKG (22)	LDY (115)	RASQSVSSSYLA (24)	GASSRA QQYGSSP T LT (25) (26)
I3RB42	SYAMS (114)	AISGSGGSTYYAHDWAFWIVFLD DSVKG (22)	Y (116)	RASQSVSSSYLA (15)	DASNRA QQRSNWP T LT (16) (17)
I3RB43	SYWMH (117)	AIRSDGSSKYYADGIVMDTFDY DSVKG (13)	(118)	(15)	RASQSVSSSYLA T LT (16) (17)
I3RB44	SYWIS (51)	IIDPDSDDTRYSGDGGSTDLDY PSFQG (52)	(53)	(30)	RASQSISSYLN S LT (31) (32)
I3RB47	SYAIS (33)	GIIPIFGTANYADLFSWRYSNFD QKFQG (34)	Y (42)	(30)	RASQSISSYLN S LT (31) (32)

В некоторых вариантах осуществления предлагается CD123-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления предлагается CD123-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, CD123-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с CD123 с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1.

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95%-ную гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc-антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетку-мишень, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности. Антитела, описанные в настоящем документе, включают антитела с описанными особенностями варибельных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых последовательность Fc модифицирована с целью влияния на различные эффекторные функции.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc эффекторные функции могут быть вредными и потенциально создающими риск для безопасности посредством токсичности, связанной с побочным механизмом действия. Изменить эффекторную функцию можно путем конструирования Fc-областей для уменьшения их связывания с рецепторами FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти моди-

фикации.

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств: (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc; (b) сниженной аффинностью к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa; (c) сниженной аффинностью к FcγRI; (d) сниженной аффинностью к FcγRIIa; (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb; (f) сниженной аффинностью к FcγRIIIb или (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1, антитело содержит замену(ы) L234A, L235A и/или K409R в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления описанные антитела способны связываться с CD123 с константой диссоциации 5 нМ или менее, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). В некоторых вариантах осуществления антитела содержат области CDR антител, представленных в табл. 1 выше. Анализы по измерению аффинности методом SPR включают в себя анализы, выполненные с использованием прибора Biacore 3000 или Biacore T200, причем анализ проводят при комнатной температуре (например, при температуре, составляющей 25°C или близкой к ней), причем антитела, способные связываться с CD123, захватывают на сенсорном чипе Biacore при помощи антитела к Fc (например, козьего антитела, специфического к человеческому IgG Fc производства Jackson ImmunoResearch laboratories продукт № 109-005-098) в количестве около 75 ОЕ, с последующим сбором данных об ассоциации и диссоциации при скорости протока 40 мкл/мин.

Наряду с описанными CD123-специфическими антителами и антигенсвязывающими фрагментами также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Также описываются клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E. coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридными клетками.

Способы применения CD123-специфических антител.

Также описываются способы применения CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Конкретные антитела, предназначенные для применения в способах, описанных в этом разделе, включают антитела с набором CDR, описанных для антител из табл. 1 выше, или антител, конкурирующих за связывание с CD123 с одним из антител из табл. 1. Например, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться при лечении рака путем ингибирования биологического эффекта IL-3 посредством предотвращения связывания IL-3 с IL-3R или, там где антитело конъюгируют с токсином, направляя токсин к раковому поражению, экспрессирующему CD123. Кроме того, данные антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для обнаружения наличия CD123 в биологическом образце, например в крови или сыворотке; для количественного определения CD123 в биологическом образце, например в крови или сыворотке; для диагностики рака с экспрессией CD123; определения способа лечения субъекта, пораженного раком; или контроля прогрессирования рака с экспрессией CD123 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 может представлять собой гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитойдную дендритноклеточную опухоль (DPDCN). Описанные способы можно осуществлять до того, как субъект получит лечение по поводу рака с экспрессией CD123, например лечение мультиспецифическим антителом к CD123 и CD3. Кроме того, описанные способы можно осуществлять после того, как субъект получит лечение по поводу рака с экспрессией CD123, например лечение мультиспецифическим антителом к CD123 и CD3, описанным в настоящем документе.

Описанные способы обнаружения CD123 в биологическом образце включают воздействие на биологический образец одним или более из CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

Описанные способы диагностирования рака с экспрессией CD123 у субъекта также включают воздействие на биологический образец одним или более из CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; однако способы также включают определение количества CD123, присутствующего в образце; сравнение количества CD123, присутствующего в образце, с известным стандартным или эталонным образцом; и определение того, подпадают ли уровни CD123 субъекта в пределы уровней CD123, связанных с раком.

Также в настоящем документе описаны способы контроля рака с экспрессией CD123 у субъекта.

Описанные способы включают воздействие на биологический образец одним или более из CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе; определение количества CD123, присутствующего в образце, и связавшегося с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом; сравнение количества CD123, присутствующего в образце, либо с известным стандартным или эталонным образцом, либо с количеством CD123 в подобном образце, полученном от субъекта ранее; и определение того, являются ли уровни CD123 у субъекта показателями прогрессирования, регрессирования или стабильного течения заболевания на основании разницы количества CD123 в сравниваемых образцах.

Образцы, полученные от субъектов, представляют собой биологические образцы, например мочу, кровь, сыворотку, плазму, слюну, асцитную жидкость, циркулирующие клетки, циркулирующие опухолевые клетки, клетки, не связанные с тканями, ткани, хирургически иссеченную ткань опухоли, материалы биопсии, образцы, полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии или гистологические препараты.

Описанные CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно метить описанными способами или другими способами, известными специалистам в данной области. Например, антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты можно пометить радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, эпитопной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТРА), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и β -галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными специалистам.

Наборы CD123-специфических антител.

В настоящем документе описываются наборы, включающие описанные CD123-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, предложенных в настоящем документе, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении наличия CD123 в биологическом образце. Соответственно, описанные наборы могут включать одно или более антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются, инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

Мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3.

В настоящем документе описаны выделенные мультиспецифические антитела, связывающиеся с CD123 и CD3 ("мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3") и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноспецифически связывающиеся с CD123 SP2 (IL3-R α) и CD123 SP1 (IL3-R α).

В некоторых вариантах осуществления CD123-специфическое плечо мультиспецифического антитела связывается с человеческим CD123 и/или CD123 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфическое плечо мультиспецифических антител к CD123 \times CD3 или антигенсвязывающих фрагментов связывается с фрагментом SP1 и/или SP2 человеческого CD123. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к CD123 \times CD3 или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенное биспецифическое антитело к CD123 (IL3-R α) \times CD3, содержащее: а) первую тяжелую цепь (HC1); б) вторую тяжелую цепь (HC2); в) первую легкую цепь (LC1) и д) вторую легкую цепь (LC2), причем HC1 и LC1 спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD123 (IL3-R α), а HC2 и LC2 спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3; или его биспецифический фрагмент, связывающийся с CD123 (IL3-R α) \times CD3. В другом варианте осуществления предлагается выделенная клетка, экспрессирующая антитело или биспецифический связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающее плечо (или "CD123-специфическое плечо") мультиспецифического антитела к CD123 \times CD3 получено из антитела к CD123, описанного в настоящем документе (например, из антитела, имеющего последовательности CDR, перечисленные в табл. 1).

В некоторых вариантах осуществления CD123-специфическое плечо мультиспецифических антител к CD123 \times CD3 или антигенсвязывающих фрагментов представляет собой IgG или его производные. В некоторых вариантах осуществления описанные мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3 способны связываться с CD123 с константой диссоциации 5 нМ или менее, измеренной методом поверхностного плазмонного резонанса или MSD-CAT.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо (или "CD3-специфическое плечо")

мультиспецифического антитела к CD123 × CD3 получено из мышиноного моноклонального антитела SP34, мышиноного изотипа IgG3/λ (Pessano, S., et al., 1995. EMBO J. 4, 337-344). В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо мультиспецифического антитела к CD123 × CD3 содержит один домен VH и один домен VL, выбранные из табл. 2. В табл. 2 представлена сводная информация по примерам некоторых тяжелых цепей и легких цепей CD3-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов.

Таблица 2

Тяжелые цепи и легкие цепи CD3-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов

VH	VL
<p>CD3H141 (SEQ ID NO: 184): IGHV3-72*01 с мышинными CDR+Gly49Ala</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKT EDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS</p>	<p>CD3L63 (SEQ ID NO:188): IGLV7- 46*01 с мышинными CDR+F38V, A48G, Y51G, W59G</p> <p>QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTTLTCSRSTGAVT TSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL</p>
<p>CD3H142 (SEQ ID NO:185): IGHV3- 23*01 с мышинными CDR+Ser49Ala</p> <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCAKHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS</p>	<p>CD3L64 (SEQ ID NO: 189): IGLV1-51*01 с мышинными CDR+Y38V, L48G, Y51G</p> <p>QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCRSSTGAVT TSNYANWVQQLPGTAPKGLIGGTNKRAPGI PDRFSGSKSGTSATLGLTGLQTGDEADYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL</p>
<p>CD3H143 (SEQ ID NO: 186): IGHV3-23*01 с мышинными CDR+Ser49Ala, Ala99Val</p> <p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS</p>	<p>CD3L66 (SEQ ID NO: 190): IGLV7-43*01 с мышинными CDR+F38V, A48G, Y51G, W59G</p> <p>QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTTLTCSRSTGAVT TSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC ALWYSNLWVFGGGTKLTVL</p>
<p>CD3H144 (SEQ ID NO: 187): IGHV3-73*01 с мышинными CDR+Asn57Gly</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN TYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNGYAT YYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKT EDTAVYYCTRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLL VTVSS</p>	

В некоторых вариантах осуществления CD3-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат тяжелую цепь из табл. 3 и легкую цепь из табл. 3. В табл. 3 представлена сводная информация о матрицах тяжелых и легких цепей CD3-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов.

Антитела, образованные путем объединения тяжелых и легких цепей

Тяжелая цепь	Легкая цепь		
	CD3L63	CD3L64	CD3L66
CD3H141	CD3B143	CD3B144	CD3B146
CD3H142	CD3B147	CD3B148	CDB150
CD3H143	CD3B151	CD3B152	CD3B154
CD3H144	CD3B155	CD3B156	CD3B158

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95%-ную гомологию в аминокислотной последовательности областей Fc, но обладают существенными отличиями в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Область Fc опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и комплементзависимую цитотоксичность (CDC). При ADCC область Fc антитела связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности эффекторных иммунных клеток, например естественных киллеров и макрофагов, что приводит к фагоцитозу и лизису клеток-мишеней. При CDC антитела уничтожают клетку-мишень, запуская каскад реакций комплемента на клеточной поверхности.

При многих видах применения терапевтических антител опосредованные Fc-эффекторные функции не являются частью механизма действия. Эти опосредованные Fc-эффекторные функции могут быть вредными и потенциально создающими риск для безопасности посредством токсичности, связанной с побочным механизмом действия. Изменить эффекторную функцию можно путем конструирования Fc-областей для уменьшения их связывания с рецепторами FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) рецепторами FcγR или с первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, размещенных в шарнирной области и в домене CH2. В IgG1, IgG2 и IgG4 были внедрены мутации для снижения или прекращения функций Fc. Прекращающие функцию мутации могут включать, без ограничений, IgG1 AA (F234A, L235A), или IgG4 PAA (S228P, F234A, L235A), или IgG2 AA (V234A, G237A), или IgG1 FEA (L234F, L235E, D265A), или IgG1 FES (L234F/L235E/P331S).

В одном варианте осуществления антитело содержит область Fc, обладающую одним или более из следующих свойств: (a) сниженной эффекторной функцией по сравнению с исходной Fc; (b) сниженной аффинностью к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa; (c) сниженной аффинностью к FcγRI; (d) сниженной аффинностью к FcγRIIa; (e) сниженной аффинностью к FcγRIIb; (f) сниженной аффинностью к FcγRIIIb или (g) сниженной аффинностью к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG или его производное. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG1 или его производное. В некоторых вариантах осуществления, например, область Fc CD3-специфического антитела IgG1, из которого получено CD3-связывающее плечо, содержит замены L234A, L235A и F405L в области Fc. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG4 или его производное. В некоторых вариантах осуществления, например, область Fc CD3-специфического антитела IgG4, из которого получено CD3-связывающее плечо, содержит замены S228P, L234A, L235A, F405L и R409K в области Fc. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG-AA Fc. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, представляет собой IgG-AA Fc-L234A, L235A и F405L (где L234A, L235A и F405L представляют собой мутации). В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, связывает CD3ε на первичных человеческих Т-клетках и/или первичных Т-клетках яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, из которого получено CD3-специфическое плечо мультиспецифического антитела, активирует первичные человеческие Т-клетки CD4+ и/или первичные Т-клетки CD4+ яванского макака. В некоторых вариантах осуществления описанные мультиспецифические антитела к CD1123 × CD3 способны связываться с CD3 на Т-клетках человека или яванского макака с константой диссоциации менее 500, или

менее 100, или менее 20 нМ, определенной по данным измерения конкурентного связывания с меченым антителом к CD3, обладающим известной аффинностью.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к CD123 × CD3 также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к CD123 × CD3. В некоторых вариантах осуществления предлагается выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий HC1, HC2, LC1 или LC2 биспецифического антитела к CD123 (IL3-Rα) × CD3 или биспецифического связывающего фрагмента. В настоящем документе также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к CD123 × CD3. Также описываются клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E. coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы получения биспецифического антитела к CD123 (IL3-Rα) × CD3 или биспецифического связывающего фрагмента путем культивирования клеток.

Также в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие мультиспецифические антитела к CD123 (IL3-Rα) × CD3 или антигенсвязывающие фрагменты и фармацевтически приемлемый носитель.

Способы применения мультиспецифических антител к CD123 × CD3.

Также описываются способы применения мультиспецифических антител к CD123 × CD3 или их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов. Например, мультиспецифические антитела к CD123 × CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака с экспрессией CD123 у нуждающегося в таком лечении субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 представляет собой гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитойдную дендритноклеточную опухоль (DPDCN).

Описанные способы лечения рака с экспрессией CD123 у нуждающегося в таком лечении субъекта включают введение субъекту терапевтически эффективного количества описанного мультиспецифического антитела к CD123 × CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В предпочтительных вариантах осуществления предлагаются способы лечения субъекта, пораженного раком, путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к CD123 (IL3-Rα) × CD3 или биспецифического антигенсвязывающего фрагмента нуждающемуся в этом пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

Дополнительно в настоящем документе предлагаются способы ингибирования роста или пролиферации раковых клеток путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к CD123 (IL3-Rα) × CD3 или биспецифического связывающего фрагмента для ингибирования роста или пролиферации раковых клеток.

Также в настоящем документе предлагаются способы перенаправления Т-клетки к экспрессирующей CD123 раковой клетке путем введения терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к CD123 (IL3-Rα) × CD3 или биспецифического связывающего фрагмента для перенаправления Т-клетки к раковому поражению.

Наборы с CD123 × CD3-специфическим к антителом.

В настоящем документе описываются наборы, содержащие описанные мультиспецифические антитела к CD123 × CD3. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения мультиспецифических антител к CD123 × CD3, предложенных в настоящем документе, или других способов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут включать антитела, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для лечения рака с экспрессией CD123. Соответственно, описанные наборы могут включать одно или более мультиспецифических антител или их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, сосуд для хранения антитела или фрагмента, когда они не используются и/или инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченные с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен вектор pDisplay, используемый для клонирования внеклеточных доменов CD123;

на фиг. 2 (фиг. 2A, 2B и 2C) - анализ связывания с клетками, демонстрирующий потенциал связывания положительных по связыванию компонентов фаговой панели с клетками, экспрессирующими CD123;

на фиг. 3 - конкурентный анализ ELISA между панелью антител и антителом 7G3 к CD123;

на фиг. 4 (фиг. 4A и 4B) - клеточный функциональный анализ на CD123 по STAT5. На фиг. 4C представлен дозозависимый клеточный функциональный анализ на CD123 по STAT5 для антител I3RB18 и 7G3;

на фиг. 5 (фиг. 5A, 5B и 5C) - связывание моноклональных антител I3RB2, I3RB18 и 7G3 с эндогенным CD123, экспрессированным на клеточной линии AML, OCI-AML5;

на фиг. 6 (фиг. 6A и 6B) - анализ конкурентного связывания мечеными mAb I3RB2 и I3RB18 и другими антителами к CD123, выявленными при скрининге;

на фиг. 7 (фиг. 7A (SEQ ID NO: 232) и 7B (SEQ ID NO: 232)) - результаты исследований по картированию эпитопа методом водород/дейтериевой обменной масс-спектропии (HDX-MS), демонстрирующие различие в уровнях дейтерия для CD123 SP2 в присутствии и в отсутствие Fab;

на фиг. 8 - остатки антител, участвующие в связывании CD123 sp2, по данным наблюдения структуры сокристалла scFv, полученного из I3RB18, и CD123 SP2 ECD. Нумерация: CD123 sp2 в овалах; CDR из I3RB18 в квадратах;

на фиг. 9A - структура сокристаллов CD123 sp2:I3RB18 (меченный B18), а на фиг. 9B - структура сокристаллов CD123 sp1:CSL362 Fab, гуманизированной формы mAb 7G3, код доступа 4JZJ в PDB;

на фиг. 10 - аминокислотная последовательность SP34 с последовательной нумерацией. CDR в определении AbM (K.R. Abhinandan and A.C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839) подчеркнуты. Ser230 представляет собой последний остаток HC в расщепленном папаином Fab. Остатки 231-455 получены из IGHG3_MOUSE (мышинный IgG3, изоформа 2);

на фиг. 11 - варибельный домен SP34 с показанными ключевыми остатками в зоне контакта VL/VH. Остатки 38, 48 и 51 в VL (меченые) контактируют с CDR-H3;

на фиг. 12 - адаптированные для человеческого каркаса (HFA) варианты V_H (SEQ ID NO: 5 и 184-187, соответственно, в порядке появления) и V_L (SEQ ID NO: 4 и 188-190, соответственно, в порядке появления). Нумерация является последовательной; CDR в определении AbM подчеркнуты; остатки, отличающиеся от SP34, выделены жирным шрифтом; обратные мутации в вариантах HFA выделены жирным шрифтом и подчеркнуты;

на фиг. 13 - связывание HFA-вариантов SP34 с первичными человеческими Т-клетками;

на фиг. 14 - связывание HFA-вариантов SP34 с первичными Т-клетками яванского макака;

на фиг. 15 показано, что HFA-варианты SP34 активируют первичные человеческие Т-клетки *in vitro*. Отрицательные контроли показаны белым, а положительные контроли показаны черным;

на фиг. 16 показано, что HFA-варианты SP34 активируют первичные Т-клетки яванского макака *in vitro*. Отрицательные контроли показаны белым, а положительные контроли показаны черным;

на фиг. 17 - корреляция связывания и активации HFA-вариантами SP34. Значения среднего связывания и средней интенсивности флуоресценции (СИФ) CD69 представлены в зависимости друг от друга для человека (фиг. 17A) и яванского макака (фиг. 17B);

на фиг. 18 - анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для донора M6587 (фиг. 18A) и донора M7020 (фиг. 18B) с использованием клеточной линии MV4-11;

на фиг. 19 - анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для донора M6587 (фиг. 19A) и донора M7020 (фиг. 19B) с использованием клеточной линии OCI-M2;

на фиг. 20 - анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для донора M6587 (фиг. 20A) и донора M7020 (фиг. 20B) с использованием клеточной линии OCI-AML;

на фиг. 21 - эффективность I3RB186 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1;

на фиг. 22 - эффективность I3RB186 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 на 30-й день для клеток периферической крови CD45+ (фиг. 22A) и CD8+/CD4+ (фиг. 22B) по данным цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS);

на фиг. 23 - эффективность I3RB186 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 на 53-й день после имплантации опухоли по данным FACS-анализа периферической крови для клеток CD45+ (фиг. 23A) и CD8+/CD4+ (фиг. 23B);

на фиг. 24 - эффективность I3RB186 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам изменения массы тела в период лечения;

на фиг. 25 - эффективность биспецифического антитела к CD123 × CD3 I3RB186 в сравнении с контрольными биспецифическими антителами I3RB191 и I3RB192 с пустым плечом в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1;

на фиг. 26 - эффективность биспецифических антител к CD123 × CD3 I3RB186 в сравнении с контрольными биспецифическими антителами I3RB191 и I3RB192 с пустым плечом в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по данным FACS-анализа на 36-й день после имплантации опухоли для клеток CD45+ (фиг. 26A) и CD8+/CD4+ (фиг. 26B);

на фиг. 27 - эффективность биспецифических антител к CD123 × CD3 I3RB186 в сравнении с контрольными биспецифическими антителами I3RB191 и I3RB192 с пустым плечом в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по данным FACS-анализа на 63-й день после имплантации опухоли для клеток CD45+ (фиг. 27A) и CD8+/CD4+ (фиг. 27B);

на фиг. 28 - эффективность биспецифического антитела к CD123 × CD3 I3RB186 в сравнении с контрольными биспецифическими антителами I3RB191 и I3RB192 с пустым плечом в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам изменения массы тела в период лечения;

на фиг. 29 - кривые насыщения связывания, использованные для определения аффинности связывания с клетками (Kd) SP34-2 на первичных человеческих Т-клетках (фиг. 29А) и Т-клетках яванского макака (фиг. 29В);

на фиг. 30 - эксперименты по конкурентному связыванию на первичных человеческих Т-клетках (фиг. 30А) и Т-клетках яванского макака (фиг. 30В) с применением меченого антитела Alexa Fluor^R 488B146 и увеличивающихся концентраций немеченных антител к CD123 × CD3;

на фиг. 31 - анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для донора М6948 (фиг. 31А) и донора М6521 (фиг. 31В) с использованием клеточной линии OCI-AML;

на фиг. 32 - анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для донора М6948 (фиг. 32А) и донора М6521 (фиг. 32В) с использованием клеточной линии KG-1;

на фиг. 33 - анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для донора М6948 (фиг. 33А) и донора М6521 (фиг. 33В) с использованием клеточной линии JIM3;

на фиг. 34А, В, С и D - влияние антител к CD123 × CD3 на индуцированную IL-3 гетеромеризацию CD123 и CD131 для I3RB218 (фиг. 34А), 8747 (фиг. 34В), I3RB217 (фиг. 34С) и 7959 (фиг. 34D);

на фиг. 35 - эффективность антител 7959 и 9958 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам сравнения среднего объема опухолей;

на фиг. 36 - эффективность антитела 3978 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам сравнения среднего объема опухолей;

на фиг. 37 - эффективность антитела 8747 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам сравнения среднего объема опухолей;

на фиг. 38 - эффективность антитела 8876 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам сравнения среднего объема опухолей;

на фиг. 39 - эффективность антител 7959 и 9958 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам изменения массы тела в период лечения;

на фиг. 40 - эффективность антитела 3978 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам изменения массы тела в период лечения;

на фиг. 41 - эффективность антитела 8747 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам изменения массы тела в период лечения;

на фиг. 42 - эффективность антитела 8876 к CD123 × CD3 в модели ксенотрансплантации опухоли KG-1 по результатам изменения массы тела в период лечения;

на фиг. 43 - фармакокинетика биспецифических антител 3978, 7955, 7959, 9958 к CD123 × CD3 у мышей in-vivo.

Подробное описание иллюстративных вариантов осуществления

Определения.

В настоящем описании и пунктах формулы изобретения используются различные термины, относящиеся к аспектам описания. Такие термины должны иметь смысл, который они обычно имеют в этой области, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины следует толковать согласно приведенным в настоящем документе определениям.

В настоящем описании и в прилагаемых пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают и множественные обозначения, если только содержание текста не определяет иного. Так, например, обозначение "клетка" включает в себя комбинацию двух или более клеток и т.п.

Используемый в настоящем документе термин "около" при указании измеримой величины, такой как количество, продолжительность во времени и т.п., считается охватывающим отклонения до ±10% от указанного значения, поскольку такие отклонения приемлемы для реализации раскрываемых способов. Если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, характеристик, таких как молекулярная масса, условий реакции и т.д., используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином "около". Соответственно, если не указано противоположное, числовые параметры, указанные в последующей спецификации и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут колебаться в зависимости от нужных свойств, которые требуется получить посредством настоящего изобретения. В самом крайнем случае, но не в качестве попытки ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен, по меньшей мере, рассматриваться с учетом числа представленных значащих цифр и с использованием стандартных методик округления.

Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, устанавливающие широкий объем объекта изобретения, являются приблизительными, числовые значения, указанные в конкретных примерах, представлены настолько точно, насколько это возможно. Любое числовое значение, тем не менее, по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно вытекающие из стандартного отклонения, обнаруживаемого при соответствующих тестовых измерениях.

Термин "выделенный" означает, что биологический компонент (например, нуклеиновая кислота, пептид или белок) был, по существу, отделен, получен отдельно от или очищен от других биологических компонентов организма, в котором компонент встречается в природе, т.е. от других хромосомных и внехромосомных ДНК, РНК и белков. Таким образом, нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, которые были "выделены", включают нуклеиновые кислоты и белки, очищенные стандартными способами очистки. "Выделенные" нуклеиновые кислоты, пептиды и белки могут быть частью композиции и все еще считаться выделенными, если такая композиция не является частью исходной среды нуклеиновой кислоты, пептида или белка. Термин также включает нуклеиновые кислоты, пептиды и белки, полученные путем рекомбинантной экспрессии в клетке-хозяине, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты. При использовании в настоящем документе термин "выделенное" антитело или антигенсвязывающий фрагмент означает антитело или антигенсвязывающий фрагмент, по существу, не содержащий других антител или антигенсвязывающих фрагментов, имеющих другие антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с CD123, по существу, не содержит антител, специфически связывающихся с антигенами, отличными от CD123). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом, изоформой или вариантом CD123, может иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, от других видов (таких как видоые гомологи CD123).

Термин "полинуклеотид", который является синонимом термину "молекула нуклеиновой кислоты", "нуклеотид" или "нуклеиновая кислота", относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. "Полинуклеотиды" включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, являющиеся смесью одно- и двухцепочечных областей, гибридные молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более типично, двухцепочечными, или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, "полинуклеотидом" называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин "полинуклеотид" также относится к ДНК или РНК, содержащим одно или более модифицированных оснований, и к ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. "Модифицированные" основания включают в себя, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин "полинуклеотид" охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, обычно встречающихся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин "полинуклеотид" также охватывает относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

Значение термина "по существу такой же" может отличаться в зависимости от контекста, в котором он используется. Вследствие того, что в природной последовательности легких и тяжелых цепей и кодирующих их генов возможны вариации, можно ожидать встретить определенный уровень вариаций в пределах аминокислотных последовательностей или генов, кодирующих антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, которые не влияют или мало влияют на их уникальные свойства связывания (например, специфичность и аффинность). Такое ожидание отчасти обусловлено вырожденностью генетического кода, а также эволюционной успешностью консервативных вариантов аминокислотных последовательностей, которые не меняют ощутимо природу кодируемого белка. Соответственно, в контексте нуклеотидных последовательностей "по существу такой же" означает по меньшей мере 65%-ную идентичность между двумя или более последовательностями. Предпочтительно термин относится по меньшей мере к 70%-ной идентичности между двумя или более последовательностями, более предпочтительно по меньшей мере 75%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 80%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 85%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 90%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 91%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 92%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 93%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 94%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 95%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 96%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 97%-ной идентичности, более предпочтительно по меньшей мере 98%-ной идентичности и более предпочтительно по меньшей мере 99%-ной или более идентичности. Процентная идентичность между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии=кол-во идентичных положений/общее кол-во положений \times 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, вводимого для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процентную идентичность между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями можно определить, например, с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который встроен в программу ALIGN (версия 2.0), используя весовую таблицу остатков PAM120 со штрафом за длину гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Кроме этого, процентную идентичность двух аминокислотных последовательностей можно определить, используя алгоритм Needleman и Wunsch, J.

Mol. Biol. 48, 444-453 (1970).

Степень вариации, возможная в пределах аминокислотной последовательности белка без существенного влияния на функцию белка, намного ниже, чем в нуклеотидной последовательности, поскольку принципы вырожденности не применимы к аминокислотным последовательностям. Соответственно, в контексте антитела или антигенсвязывающего фрагмента "по существу такой же" означает антитела или антигенсвязывающие фрагменты, имеющие 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%-ную идентичность описанным антителам или антигенсвязывающим фрагментам. Другие варианты осуществления включают в себя CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые имеют каркас, основу или другие не связывающиеся области, которые не обладают существенной идентичностью с антителами и антигенсвязывающими фрагментами, описанными в настоящем документе, но обязательно включают в себя одну или более CDR или других последовательностей, необходимых для осуществления связывания, которые обладают 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%-ной идентичностью с последовательностями, описанными в настоящем документе. "Вектор" представляет собой репликон, например плазмиду, фаг, космиду или вирус, в который можно функционально ввести сегмент другой нуклеиновой кислоты так, чтобы обеспечить репликацию или экспрессию этого сегмента.

Под термином "клон" понимается популяция клеток, полученная из одной клетки или общего предшественника путем митоза. Под термином "клеточная линия" понимается клон первичной клетки, способный к стабильному росту *in vitro* в течение многих поколений. В некоторых примерах, представленных в настоящем документе, клетки трансформируют путем трансфицирования в них ДНК.

Термины "экспрессирует" и "продуцирует" используются в настоящем документе как синонимы и обозначают биосинтез продукта гена. Эти термины охватывают транскрипцию гена в РНК. Эти термины также охватывают трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывают все естественно возникающие посттранскрипционные и посттрансляционные модификации. Экспрессия или продукция антитела или его антигенсвязывающего фрагмента может происходить внутри цитоплазмы клетки или во внеклеточной среде, например в ростовой среде для культивирования клеток.

Термин "лечение" относится к любому успеху или признаку успеха в ослаблении или облегчении симптомов травмы, патологии или состояния, включая любые объективные или субъективные параметры, такие как ослабление боли, ремиссия, ослабление симптомов или перевод состояния в легче переносимую пациентом форму, замедление скорости развития дегенеративных изменений или угасания функции, перевод конечной точки дегенеративных изменений в менее угнетающую пациента форму, улучшение общего физического или умственного состояния пациента или продление выживаемости. Лечение можно оценивать по объективным или субъективным параметрам, включая результаты врачебного осмотра, неврологического осмотра или психиатрической экспертизы.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела к CD123 × CD3 может меняться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и масса тела пациента и от способности антитела вызывать желаемый ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами.

"Антителом" называются все изоформы иммуноглобулинов (IgG, IgA, IgE, IgM, IgD и IgY), включая различные мономерные, полимерные и химерные формы, если иное не указано особо. В частности, термин "антитело" охватывает поликлональные антитела, моноклональные антитела (mAb) и антителоподобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела.

Антигенсвязывающие фрагменты представляют собой любую белковую структуру, способную проявлять аффинность связывания с конкретным антигеном. Антигенсвязывающие фрагменты включают в себя фрагменты, полученные любым известным методом, например ферментативным расщеплением, пептидным синтезом и рекомбинантными методами. Некоторые антигенсвязывающие фрагменты состоят из частей интактных антител, сохраняющих антигенсвязывающую специфичность исходной молекулы антитела. Например, антигенсвязывающие фрагменты могут содержать по меньшей мере одну переменную область (вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи) или одну или более областей CDR антитела с известным связыванием с конкретным антигеном. Примеры приемлемых антигенсвязывающих фрагментов включают, без ограничений, диатела и одноцепочечные молекулы, а также молекулы Fab, F(ab')₂, Fc, Fabc и Fv, одноцепочечные (Sc) антитела, отдельные легкие цепи антител, отдельные тяжелые цепи антител, химерные слияния цепей антител или CDR с другими белками, белковые каркасы, мономеры или димеры тяжелых цепей, мономеры или димеры легких цепей, димеры, состоящие из одной тяжелой и одной легкой цепи, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или одновалентное антитело, описанное в WO 2007059782, двухвалентные фрагменты, содержащие два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области, Fd-фрагмент, состоящий, по существу, из доменов V.sub.H и C.sub.H1; Fv-фрагмент, состоящий, по существу, из доменов VL и VH одного плеча антитела, dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который состоит, по существу, из домена VH и также называется доменным антителом (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov.;

21 (11):484-90); антитело верблюжьего типа (камелид) или нанотела (Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan.; 5(1):111-24); выделенные области, определяющие комплементарность (CDR) и т.п. Для получения антигенсвязывающих фрагментов можно использовать все изотипы антител. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя неантительные белковые каркасы, в которые могут успешно встраиваться полипептидные сегменты в ориентации, придающей аффинность к данному интересующему антигену, например белковые каркасы. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным способом или в результате ферментативного или химического расщепления интактных антител. Фраза "антитело или его антигенсвязывающий фрагмент" может использоваться для обозначения того, что данный антигенсвязывающий фрагмент включает в себя один или более аминокислотных сегментов антитела, указанного во фразе. При использовании в настоящем документе в контексте двух или более антител или антигенсвязывающих фрагментов термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" означает, что два или более антител или антигенсвязывающих фрагментов конкурируют за связывание с CD123, например конкурируют за связывание с CD123 в анализе, описанном в примере 9. Для некоторых пар антител или антигенсвязывающих фрагментов конкуренция или блокировка в анализе, приведенном в примерах, наблюдается только в том случае, когда одно антитело нанесено в качестве покрытия на планшет, а другое используется для конкуренции, и не наоборот. Если иное не определяется или не отвергается контекстом, термины "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" в настоящем документе также должны охватывать такие пары антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с антителом. Эпитопы обычно состоят из поверхностно расположенных групп молекул, таких как аминокислотные или сахарные боковые цепи, а также обычно имеют специфическую трехмерную структуру, а также специфические зарядовые характеристики. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем, что в присутствии денатурирующих растворителей теряется связывание с первыми, но не теряется связывание со вторыми. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании, и другие аминокислотные остатки, непосредственно не участвующие в связывании, например аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или закрываются пептидом, специфически связывающим антиген (иными словами, аминокислотный остаток находится в пределах зоны, закрытой пептидом, специфически связывающим антиген).

Термины "специфическое связывание", или "иммуноспецифическое связывание" или их производные при использовании применительно к антителам и фрагментам антител представляют связывание посредством доменов, кодируемых генами или фрагментами генов иммуноглобулинов, с одним или более эпитопами интересующего белка и предпочтительно отсутствие связывания с другими молекулами в образце, содержащем смешанную популяцию молекул. Как правило, антитело связывается с родственным антигеном с K_d менее чем около 1×10^{-8} М, по данным метода поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания с клетками. Такие фразы, как "[антиген]специфическое" антитело (например, CD123-специфическое антитело) означают, что упомянутое антитело специфически связывается с упомянутым антигеном.

Термин " k_d " (s^{-1}) при использовании в настоящем документе означает константу скорости диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. Этот показатель также называется k_{off} .

Термин " k_a " ($M^{-1} s^{-1}$) при использовании в настоящем документе означает константу скорости ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин " K_D " (М) при использовании в настоящем документе означает константу равновесия при диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген.

Термин " K_A " (M^{-1}) при использовании в настоящем документе означает константу равновесия при ассоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген, и ее получают делением k_a на k_d .

Термин "субъект" означает человека и не относящихся к человеку животных, включая всех позвоночных, например млекопитающих и не млекопитающих, например нечеловекообразных приматов, мышей, кроликов, овец, собак, кошек, лошадей, коров, цыплят, амфибий и рептилий. Во многих вариантах осуществления описанных способов субъект представляет собой человека.

Термин "образец" при использовании в настоящем документе означает набор сходных текучих сред, клеток или тканей (например, хирургически иссеченную ткань опухоли, материал биопсии, включая полученный с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), выделенных у субъекта, а также текучие среды, клетки или ткани, находящиеся внутри тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биологическую текучую среду. Биологические текучие среды, как правило, представляют собой жидкости при физиологических температурах и могут включать в себя текучие среды природного происхождения, находящиеся внутри субъекта или биологического источника, отобранные, экспрессированные или иным образом извлеченные из него. Некоторые биологические текучие среды происходят из конкретных тканей, органов или локализованных областей, а некоторые другие биологические текучие среды могут иметь более глобальное или системное расположение в организме субъекта или биологическом источнике. Примеры биологических текучих сред включают кровь, слюну, мочу, слезу, содержимое кисты, слезы, фекалии, мокроту, секрет слизистой секреторных тканей и органов, вагинальные секреты, асцитные текучие сре-

ды, например, связанные с несолидными опухолями, текучие среды плевральной, перикардиальной, перитонеальной, абдоминальной и других полостей тела, текучие среды, полученные смывом из бронхов и т.п. Биологические текучие среды также включают в себя жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например среду для культивирования клеток или органов, в том числе среду, кондиционированную клетками или органами, промывные текучие среды и т.п. Термин "образец" при использовании в настоящем документе охватывает материалы, извлеченные из организма субъекта, или материалы, находящиеся в организме субъекта.

"Известный стандарт" может представлять собой раствор, включающий в себя известное количество или концентрацию CD123, где раствор может представлять собой раствор природного происхождения, например образец от пациента, имеющего по известным данным раннюю, среднюю или позднюю стадию рака, прогрессирующий или стабильный рак, или раствор может представлять собой синтетический раствор, например водный буфер, содержащий известное количество разведенного в нем CD123. Известные стандарты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя CD123, выделенный из организма субъекта, а также рекомбинантный или очищенный белок CD123 или значение концентрации CD123, связанной с состоянием заболевания.

Термин "CD3" относится к человеческому белковому комплексу CD3, состоящему из множества субъединиц. Состоящий из множества субъединиц белковый комплекс CD3 состоит из 6 отдельных полипептидных цепей. Он включает цепь CD3 γ (SwissProt P09693), цепь CD35 (SwissProt P04234), две цепи CD3 ϵ (SwissProt P07766) и один гомодимер цепи CD3 ζ (SwissProt 20963), причем комплекс связан с цепями α и β T-клеточного рецептора. Термин "CD3" при отсутствии особых указаний включает в себя любой вариант, изоформу и видовой гомолог CD3, в природе экспрессируемый клетками (включая T-клетки), или который может экспрессироваться на клетках, трансфицированных генами или кДНК, кодирующей эти полипептиды.

При использовании в настоящем документе взаимозаменяемые термины " α -субъединица рецептора IL-3", "IL3R α ", "CD123", "цепь IL3R α " и "субъединица IL3R α " означают антигенную детерминанту, определяемую на лейкозных клетках-предшественниках, которая иммунологически связывает интерлейкин-3 (IL3). В конкретном варианте осуществления CD123 представляет собой CD123 человека. В одном конкретном варианте осуществления CD123 представляет собой CD123 яванского макака. В конкретном варианте осуществления CD123 представляет собой CD123 SP1. В конкретном варианте осуществления CD123 представляет собой CD123 SP2. Если не указано иное, термин "CD123" включает в себя любой вариант, изоформу и видовой гомолог CD123.

"Антитело к CD123 \times CD3" представляет собой мультиспецифическое антитело, необязательно, биспецифическое антитело, которое содержит две разных антигенсвязывающих области, одна из которых специфически связывается с антигеном CD123, а другая специфически связывается с CD3.

Мультиспецифическое антитело может представлять собой биспецифическое антитело, диатело или сходную молекулу (см., например, публикацию PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993), в которой приведено описание диател). Биспецифические молекулы, диатела и т.п., предложенные в настоящем документе, могут связываться с любой приемлемой мишенью в дополнение к части CD123. Термин "биспецифическое антитело" следует понимать как антитело, имеющее две разные антигенсвязывающие области, определяемые разными последовательностями антитела. Это можно понимать как связывание с разными мишенями, но также сюда входит связывание с разными эпитопами на одной мишени.

"Эталонный образец" представляет собой образец, который можно сравнить с другим образцом, например исследуемым образцом, чтобы сравниваемый образец можно было охарактеризовать. Эталонный образец будет иметь какое-либо охарактеризованное свойство, которое служит основой для сравнения с исследуемым образцом. Например, эталонный образец можно использовать как опорное значение концентраций CD123, которые служат показателем наличия рака у субъекта. Эталонный образец не обязательно следует анализировать параллельно с исследуемым образцом, следовательно, в некоторых случаях эталонный образец может представлять собой ранее определенное числовое значение или диапазон, характеризующий данное состояние, например уровни CD123, которые служат показателями наличия рака у субъекта. Термин также включает в себя образцы, используемые для сравнительных целей, и которые по имеющимся данным связаны с физиологическим состоянием или состоянием заболевания, например, раком с экспрессией CD123, но имеющие неизвестное количество CD123.

Термин "прогрессирование" при использовании в контексте прогрессирования рака с экспрессией CD123 включает в себя изменение состояния рака от менее тяжелого к более тяжелому. Прогрессирование может включать в себя увеличение количества или тяжести опухолей, степени метастазирования, скорости, с которой рак растет или распространяется и т.п. Например, "прогрессирование рака толстой кишки" включает в себя прогрессирование такого рака из менее тяжелого в более тяжелое состояние, например прогрессирование от стадии I до стадии II, от стадии II до стадии III и т.п.

Термин "регрессирование" при использовании в контексте регрессирования рака с экспрессией CD123 включает в себя изменение состояния рака от более тяжелого к менее тяжелому. Регрессирование может включать в себя снижение количества или тяжести опухолей, степени метастазирования, скоро-

сти, с которой рак растет или распространяется, и т.п. Например, "регрессирование рака толстой кишки" включает в себя регрессирование такого рака из более тяжелого в менее тяжелое состояние, например прогрессирование от стадии III до стадии II, от стадии II до стадии I и т.п.

Термин "стабильный" при использовании в контексте стабильного рака с экспрессией CD123 описывает состояние заболевания, которое не изменяется или не изменилось существенно в течение клинически значимого периода времени, чтобы его можно было считать прогрессирующим или регрессирующим раком.

Варианты осуществления, описанные в настоящем документе, не ограничиваются конкретными способами, реагентами, соединениями, композициями или биологическими системами, которые, конечно, могут варьироваться.

CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящем документе описываются выделенные моноклональные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с CD123. Общая структура молекулы антитела содержит антигенсвязывающий домен, включающий в себя тяжелую и легкую цепи, и Fc-домен, который выполняет различные функции, включая фиксацию комплемента и связывание с рецепторами антител.

К описанным CD123-специфическим антителам или антигенсвязывающим фрагментам относятся все изотипы, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и синтетические мультимеры четырехцепочечной структуры иммуноглобулинов. Описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты также включают изотип IgY, обычно обнаруживаемый в сыворотке курицы или индейки и в желтке яйца курицы или индейки.

CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно получать из любого вида, используя рекомбинантные методы. Например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой их мышинные, крысиные, козьи, свиные, коровьи, куриные, кроличьи, верблюжьи, ослиные, человеческие или химерные варианты. В целях введения человеку антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно подвергнуть генетическому или структурному изменению, чтобы они были менее антигенны при введении пациенту-человеку.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются химерными. При использовании в настоящем документе термин "химерный" означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий, по меньшей мере, некоторую часть по меньшей мере одного переменного домена, полученного из аминокислотной последовательности антитела не относящегося к человеку млекопитающего, грызуна или рептилии, в то время как оставшиеся части антитела или его антигенсвязывающего фрагмента имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления антитела представляют собой гуманизированные антитела. Гуманизированные антитела могут представлять собой химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их фрагменты (например, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ или другие антигенсвязывающие субпоследовательности антител), содержащие минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина не относящегося к человеку животного. По большей части гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (антитело-реципиент), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиента заменены остатками из области, определяющей комплементарность, не относящегося к человеку вида (антитело-донор), например мыши, крысы или кролика, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать, по существу, все по меньшей мере из одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или, по существу, все CDR-области соответствуют таковым в иммуноглобулине от не относящегося к человеку животного, а все или, по существу, все каркасные области соответствуют таковым последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать по меньшей мере часть константного участка иммуноглобулина (Fc), как правило, человеческого иммуноглобулина.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но должны включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в табл. 1.

В настоящем документе описываются выделенные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с CD123. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается CD123-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления предлагается CD123-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в табл. 1.

В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты содержат CDR1 тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 006, CDR2 тяжелой цепи, содержа-

чают в себя антитела, конкурирующие с описанными выше антителами за связывание. Конкуренцию за связывание можно определить с помощью анализа конкурентного связывания ELISA в соответствии с методикой, описанной ниже в примере 5. Конкурентное связывание можно определить путем обнаружения, по меньшей мере, 20% ингибирования связывания первого антитела вторым антителом независимо от порядка, в котором антитела связываются с CD123 (т.е. если при связывании антитела А с CD123 до антитела В наблюдается только 10% ингибирование, но при связывании антитела В с CD123 до антитела А наблюдается 30% ингибирование, то поскольку в одном из экспериментов наблюдается более чем 20% ингибирование, можно сделать вывод о конкурентном связывании).

В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG или его производные, например изотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1, антитело содержит замену(ы) L234A, L235A и K409R в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, L234A и L235A в области Fc. Специфические антитела, определяющиеся последовательностями CDR и/или переменных доменов, описанными в абзацах выше, могут включать в себя эти модификации.

Также описываются выделенные полинуклеотиды, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты, иммуноспецифически связывающиеся с CD123. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать сегменты переменных доменов, предлагаемые в настоящем документе, можно включать в одни и те же или разные векторы для продукции антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Полинуклеотиды, кодирующие рекомбинантные антигенсвязывающие белки, также входят в пределы объема изобретения. В некоторых вариантах осуществления описанные полинуклеотиды (и пептиды, которые они кодируют) включают в себя лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную специалистам. Лидерная последовательность может включать в себя, без ограничений, сайт рестрикции или сайт инициации трансляции.

CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, включают в себя варианты, имеющие одиночные или множественные аминокислотные замены, делеции или присоединения, сохраняющие биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения при отсутствии особых указаний для описания мутаций используются следующие обозначения: i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, как K409R, что означает замену лизина в положении 409 на аргинин; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X. Делеция лизина в положении 409 обозначается K409*. Специалист может получать варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

Такие варианты могут включать в себя: (a) варианты, в которых один или более аминокислотных остатков заменяются консервативными или неконсервативными аминокислотами, (b) варианты, в которых одна или более аминокислот присоединяются к полипептиду или удаляются из него, (c) варианты, в которых одна или более аминокислот включают в себя группу-заместитель, и (d) варианты, в которых полипептид сливаются с другим пептидом или полипептидом, таким как партнер слияния, белковая метка или другая химическая группировка, способная придавать полипептиду полезные свойства, например, эпитоп для антитела, полигистидиновая последовательность, остаток биотина и т.п. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут включать в себя варианты, в которых аминокислотные остатки одного вида заменены соответствующими остатками другого вида (в консервативных или неконсервативных положениях). В других вариантах осуществления аминокислотные остатки в неконсервативных положениях заменены консервативными или неконсервативными остатками. Методики получения таких вариантов, включая генетические (делеции, мутации и т.п.), химические и ферментативные, известны специалистам в данной области.

CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к нескольким изотипам антител, таким как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, предпочтительно изотип IgG1 или IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно перенести на другой изотип, не изменив антигенной специфичности. В альтернативном варианте осуществления были установлены методики, вызывающие переключение гибридом с выработки одного изотипа антител на другой (переключение изотипа) без изменения антигенной специфичности. Соответственно, такие изотипы антител входят в пределы объема описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, имеют аффинность связывания с CD123 SP1 с константой диссоциации (K_D) менее чем около

5×10^{-7} М, предпочтительно менее чем около 5×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, имеют аффинности связывания с CD123 SP2 с константой диссоциации (K_D) менее чем около 5×10^{-7} М, предпочтительно менее чем около 5×10^{-8} М. Аффинность описанных CD123-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов можно определить различными способами, известными специалистам, например способами на основе поверхностного плазмонного резонанса или на основе анализа ELISA. Анализы по измерению аффинности методом SPR включают в себя анализы, выполненные с использованием прибора BIAcore 3000, причем анализ проводят при комнатной температуре (например, при температуре, составляющей или близкой к 25°C), причем антитела, способные связываться с CD123, захватывают на сенсорном чипе BIAcore при помощи антитела к Fc (например, козьего антитела, специфичного к человеческому IgG Fc, производства Jackson ImmunoResearch laboratories продукт № 109-005-098) в количестве около 75 ОЕ с последующим сбором данных об ассоциации и диссоциации при скорости потока 40 мкл/мин.

Также предлагаются векторы, содержащие полинуклеотиды, описанные в настоящем документе. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Следовательно, рекомбинантные экспрессионные векторы, содержащие последовательность, кодирующую интересующий полипептид, считаются входящими в пределы объема этого изобретения. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным экспрессионным векторам, входящим в объем настоящего описания, относятся синтетические, геномные или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с подходящими регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие надлежащие участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролируемые терминацию транскрипции и трансляции.

Экспрессионные векторы, в особенности экспрессионные векторы млекопитающих, также могут содержать один или несколько нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, подходящий промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Также может быть встроена точка начала репликации, придающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 2 80 (1983).

В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующую антитело или антигенсвязывающий фрагмент, помещают под контроль эффективного конститутивного промотора, как, например, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, β -актина, человеческого миозина, человеческого гемоглобина, человеческого мышечного креатина и других. Кроме того, многие вирусные промоторы функционируют конститутивно в эукариотических клетках и могут быть использованы в описанных вариантах осуществления. К таким вирусным промоторам относятся, без ограничений, немедленно-ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы у мышей (MMTV), длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса Эпштейна-Барра (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. В одном варианте осуществления кодирующую последовательность CD123-специфического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента помещают под контроль индуцибельного промотора, например промотора металлотионеина, промотора, индуцируемого тетрациклином, промотора, индуцируемого доксициклином, промоторов, содержащих один или несколько стимулируемых интерфероном реагирующих элементов (ISRE), промоторы протеинкиназы R 2',5'-олигоденилатсинтаз, генов Mx, ADAR1 и т.п.

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Ком-

поненты вектора могут быть шиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное пространство для экспрессии генных продуктов (т.е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между открытыми рамками считывания) или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального пространства для экспрессии.

Векторы могут содержать селективные маркеры, хорошо известные специалистам в данной области. К селективным маркерам относятся маркеры положительной и отрицательной селекции, гены устойчивости к антибиотикам (например, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к тетрациклину, ген устойчивости к пенициллину), гены глутаматсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для ганцикловирной селекции или ген бактериальной пуриннуклеозидфосфорилазы для селекции по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 Gene Ther. 1738-1743 (2000)). Нуклеотидная последовательность, кодирующая селективный маркер или участок клонирования, может располагаться выше или ниже нуклеотидной последовательности, кодирующей нужный полипептид или участок клонирования.

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для получения клеток, продуцирующих CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Следовательно, другой аспект изобретения описывает клетки-хозяева, трансформированные векторами, содержащими нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающий CD123, например антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные и подтвержденные примером в настоящем документе.

Специалистам в данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов согласно различным вариантам осуществления, описанным и подтвержденным примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяин таким образом, чтобы гетерологичная последовательность могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и так, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т.п. (описано в публикации Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)). Также для трансформации клеток можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, подходящим для применения в экспрессии CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHOК1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки НЕК293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, С127, 3Т3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и др. Кроме этого, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридомных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные экспрессионными векторами, описанными в настоящем документе, можно подвергнуть селекции или скринингу для рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, из-за модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять при помощи химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования коррекции ошибок спаривания ДНК или комбинации подобных способов.

Способы применения CD123-специфических антител для лечения.

В настоящем документе предлагаются CD123-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты для применения в терапии. В частности, эти антитела или антигенсвязывающие фрагменты можно применять при лечении рака, например рака с экспрессией CD123. Соответственно, в изобретении предлагается способ лечения рака, включающий введение антитела, описанного в настоящем документе, например CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов. Например, применение может осуществляться путем ингибирования биологического эффекта IL-3 посредством предотвращения связывания IL-3 с IL-3R или, где антитело конъюгируют с токсином, таким образом, направляя токсин к раковой опухоли, экспрессирующей CD123. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 включает в себя гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический син-

дром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмочитоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN). Антитела, предназначенные для применения в этих способах, включают антитела, описанные выше в настоящем документе, например CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 195-202 (RARERVYE (SEQ ID NO: 234)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 156-161 (RKFRYE (SEQ ID NO: 232)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 173-178 (TEQVRD (SEQ ID NO: 233)). Также в этих способах могут применяться антитела со свойствами, описанными в табл. 1, например, с последовательностями CDR или переменных доменов, а также описанными в дальнейшем обсуждении этих антител.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, иммуноэффекторные свойства CD123-специфических антител могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области. Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание Clq, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и т.д., могут обеспечиваться и/или управляться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия.

"Антителозависимая клеточная цитотоксичность", или ADCC, представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные киллерные клетки (ЕК), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. Человеческие IgG1 или IgG3 подвергаются N-гликозилированию по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания Fc γ RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение крысиной гибридной клеточной линии YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278:34 66-3473, 2003), введение малых интерферирующих РНК, в особенности к гену α -1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004) или коэкспрессия β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α -маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора α -маннозидазы I, кифуензина (Ferrara et al., *J. Biol. Chem.* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ADCC, вызванную антителами к CD123, также можно усилить путем введения некоторых замен в Fc-область антитела. Примерами замен являются, например, замены в положениях аминокислот 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков соответствует EU-индексу), как описано в патенте США № 6737056.

Способы обнаружения CD123.

В настоящем документе предлагаются способы обнаружения CD123 в биологическом образце путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в настоящем документе. Как описано в настоящем документе, образец может быть получен из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя обнаружение CD123 в биологическом образце путем приведения образца в контакт с любым из CD123-специфических антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с более чем одним из CD123-специфических антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем докумен-

те. Например, образец можно привести в контакт с первым CD123-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а затем привести в контакт со вторым CD123-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем первое антитело или антигенсвязывающий фрагмент и второе антитело или антигенсвязывающий фрагмент не являются одним и тем же антителом или антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления перед приведением в контакт с образцом первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть прикреплено к поверхности, например, многолуночного планшета, чипа или к сходному субстрату. В других вариантах осуществления перед приведением в контакт с образцом первое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть ни к чему не фиксирован/не прикреплен.

Описанные CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть помечены с возможностью обнаружения. В некоторых вариантах осуществления меченые антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут облегчать обнаружение CD123 посредством методов, описанных в настоящем документе. Специалисту в данной области хорошо известны многие подобные метки. Например, приемлемые метки включают в себя, без ограничений, радиоактивные метки, флуоресцентные метки, эпитопные метки, биотин, хромофорные метки, ECL-метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусную кислоту (ДТРА), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и β -галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т.п.

Описанные CD123-специфические антитела и антигенсвязывающие фрагменты можно использовать в разных анализах для обнаружения CD123 в биологическом образце. Некоторые приемлемые анализы включают, без ограничений, вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрию, иммунопреципитацию, равновесный диализ, иммунодиффузию, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимию, цитометрию посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или ELISA.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, обнаружение экспрессирующих CD123 раковых клеток у субъекта можно использовать для определения того, можно ли субъекта лечить терапевтическим агентом, направленным против CD123.

CD123 присутствует в определенных концентрациях в образцах крови и сыворотки. Таким образом, в настоящем документе предлагаются способы обнаружения CD123 в образце, полученном из крови, например образце сыворотки, путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с CD123. Образец крови или его производное можно разводить, фракционировать или иным способом обрабатывать для получения образца, на котором можно осуществить описанный способ. В некоторых вариантах осуществления CD123 можно обнаруживать в образце крови или в его производном при помощи любого количества анализов, известных специалистам в данной области, например, без ограничений, таких как вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ, метод поверхностного плазмонного резонанса, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или ELISA.

Способы диагностики рака.

В настоящем документе предлагаются способы диагностики рака с экспрессией CD123 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 включает в себя гемобластозы, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитойдную дендритноклеточную опухоль (DPDCN). В некоторых вариантах осуществления, как описано выше, обнаружение CD123 в биологическом образце, например в образце крови или сыворотки, обеспечивает возможность диагностики рака у субъекта, от которого был получен образец. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления для оценки того, имеется ли рак у субъекта, от которого был получен образец, можно использовать другие образцы, например гистологический образец, образец, полученный с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии, хирургически иссеченную ткань опухоли, циркулирующие клетки, циркулирующие опухолевые клетки и т.п. В некоторых вариантах осуществления уже может быть известно, что субъект, от которого получен образец, имеет рак, но тип рака, имеющийся у субъекта, может еще не быть диагностирован, или предварительный диагноз может быть неточным, и, следовательно, обнаружение CD123 в биологическом образце, полученном от субъекта, может позволить поставить или уточнить диагноз рака. Например, может быть известно, что у субъекта имеется рак, но может быть неизвестно или неочевидно, является ли рак у данного субъекта раком с экспрессией CD123.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя оценку того, поражен ли субъект раком с экспрессией CD123, путем определения количества CD123, присутствующего в биологическом образце, полученном от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества CD123 с количест-

вом CD123 в контрольном или эталонном образце, причем разница между количеством CD123 в образце, полученном от субъекта, и количеством CD123 в контрольном или эталонном образце служит указанием на то, что субъект поражен раком с экспрессией CD123. В другом варианте осуществления количество CD123, наблюдаемое в биологическом образце, полученном от субъекта, можно сравнить с уровнями CD123, которые, по имеющимся данным, ассоциированы с определенными формами или стадиями рака с целью определения формы или стадии рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления количество CD123 в образце, полученном от субъекта, оценивают путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который иммуноспецифически связывается с CD123, например с CD123-специфическими антителами, описанными в настоящем документе. Образец, оцениваемый на наличие CD123, может быть получен из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалы биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 включает в себя гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CMF) или бластную плазмочитоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN). В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способ диагностики рака с экспрессией CD123 будет включать в себя: приведение биологического образца субъекта в контакт с CD123-специфическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в табл. 1), определение количества CD123, присутствующего в образце, который связался с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, сравнение количества CD123, присутствующего в образце, с известным стандартным или эталонным образцом; и определение того, попадают ли уровни CD123 субъекта в пределы уровней CD123, связанных с раком. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительный этап введения или назначения специфического противоракового лечения. В другом варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительный этап передачи результатов определения для облегчения лечения рака. В некоторых вариантах осуществления специфическое противораковое лечение может быть направлено против типов рака с экспрессией CD123, как, например, мультиспецифические антитела к CD123 × CD3, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя оценку того, поражен ли субъект раком с экспрессией CD123, путем определения количества CD123, присутствующего в образце крови или сыворотки, полученном от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества CD123 с количеством CD123 в контрольном или эталонном образце, причем разница между количеством CD123 в образце, полученном от субъекта, и количеством CD123 в контрольном или эталонном образце служит указанием на то, что субъект поражен раком с экспрессией CD123.

В некоторых вариантах осуществления контрольный или эталонный образец может быть получен от субъекта, не пораженного раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления контрольный или эталонный образец может быть получен от субъекта, пораженного раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный или эталонный образец получен от субъекта, не пораженного раком с экспрессией CD123, наблюдаемое увеличение количества CD123 в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что субъект поражен раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный образец получен от субъекта, не пораженного раком с экспрессией CD123, наблюдаемое уменьшение или сходство количества CD123 в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что субъект не поражен раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный или эталонный образец получен от субъекта, пораженного раком с экспрессией CD123, наблюдаемое сходство количества CD123 в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что субъект поражен раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления, в которых контрольный или эталонный образец получен от субъекта, пораженного раком с экспрессией CD123, наблюдаемое уменьшение количества CD123 в исследуемом образце по сравнению с наблюдаемым количеством в контрольном или эталонном образце, является указанием на то, что субъект не поражен раком с экспрессией CD123.

В некоторых вариантах осуществления количество CD123 в образце, полученном от субъекта, оценивают путем приведения образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с CD123, например с антителами, описанными в настоящем документе. Образец, оцениваемый на наличие CD123, может быть получен из образца крови, образца сыворотки, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалов биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п.

В различных аспектах количество CD123 определяют, приводя образец в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с CD123. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с CD123. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с CD123, а затем привести в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с CD123. CD123-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, такие как описанные в настоящем документе, можно использовать в этом качестве.

Для осуществления описанных способов диагностики в качестве "первого" и "второго" антитела и антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации CD123-специфических антител и антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 включает в себя гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмочитоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN).

В некоторых вариантах осуществления количество CD123 определяют таким методом, как вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ, иммуофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или ELISA.

В различных вариантах осуществления описанных способов диагностики используют контрольный или эталонный образец. Этот образец может представлять собой положительный или отрицательный аналитический контроль, гарантирующий, что анализ работает должным образом; например аналитический контроль такого рода можно обычно использовать для иммуногистохимических анализов. Альтернативно, образец может представлять собой стандартизованный эталон количества CD123 в биологическом образце от здорового субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровни CD123, наблюдаемые у исследуемого субъекта, можно сравнивать с уровнями CD123, наблюдаемыми в образцах от субъектов с известным диагнозом рака с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления контрольный субъект может быть поражен конкретным интересующим видом рака. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет раннюю стадию рака, который может быть или может не быть раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет промежуточную стадию рака, который может быть или может не быть раком с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления известно, что контрольный субъект имеет позднюю стадию рака, который может быть или может не быть раком с экспрессией CD123.

Способы контроля рака.

В настоящем документе предлагаются способы контроля рака с экспрессией CD123 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 включает в себя гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмочитоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN). В некоторых вариантах осуществления описанные способы включают в себя оценку того, прогрессирует, регрессирует или остается стабильным рак с экспрессией CD123, путем определения количества CD123, присутствующего в биологическом образце, полученном от субъекта; и сравнения наблюдаемого количества CD123 с количеством CD123 в биологическом образце, полученном сходным образом у субъекта в более ранний момент времени, причем различие между количеством CD123 в исследуемом образце и более раннем образце служит показателем того, является ли рак прогрессирующим, регрессирующим или стабильным. В этом отношении увеличенное количество CD123 в исследуемом образце по сравнению с более ранним образом может указывать на прогрессирование рака с экспрессией CD123. Напротив, уменьшенное количество CD123 в исследуемом образце по сравнению с более ранним образом может указывать на регрессию рака с экспрессией CD123.

Соответственно, незначительное различие количества CD123 в исследуемом образце по сравнению с более ранним образом может указывать на стабильное течение рака с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления количество CD123 в биологическом образце, полученном от субъекта, оценивают путем приведения образца в контакт с антителом или фрагментом антитела, специфически связывающимся с CD123, например с антителами, описанными в настоящем документе. Образец, оцениваемый на наличие CD123, может быть получен из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т.е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, материалы биопсии, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т.п. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления способы контроля рака с экспрессией CD123 будут включать в себя приведение биологического образца от субъекта в контакт с CD123-специфическим антите-

лом или его антигенсвязывающим фрагментом (например, производными антител и фрагментов, представленных в табл. 1), количественную оценку CD123, присутствующего в образце, сравнение количества CD123, присутствующего в образце, с количеством CD123, определенном в биологическом образце, полученном сходным образом от того же субъекта в более ранний момент времени; и определение того, изменился ли уровень CD123 у субъекта со временем. Увеличенное количество CD123 в исследуемом образце по сравнению с количеством в более раннем образце может указывать на прогрессирование рака. Напротив, уменьшенное количество CD123 в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на регрессию рака с экспрессией CD123. Соответственно, несущественное различие количества CD123 в исследуемом образце по сравнению с более ранним образцом может указывать на стабильное течение рака с экспрессией CD123. В некоторых вариантах осуществления уровни CD123 в образце можно сравнивать с известным стандартом или эталонным образцом отдельно или в качестве дополнения к сравнению с уровнями CD123, наблюдавшимися в образце в более ранний момент времени. В дополнительном варианте осуществления за проведением диагностического способа может следовать дополнительный этап назначения специфического противоракового лечения. В некоторых вариантах осуществления специфическое противораковое лечение может быть направлено против типов рака с экспрессией CD123, как, например, мультиспецифические антитела к CD123 × CD3, описанные в настоящем документе.

В различных аспектах количество CD123 определяют, приводя образец в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, специфически связывающимся с CD123. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт более чем с одним типом антител или их антигенсвязывающих фрагментов, связывающихся с CD123. В некоторых вариантах осуществления образец можно привести в контакт с первым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с CD123, а затем привести в контакт со вторым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, который специфически связывается с CD123. Антитела, такие как описаны в настоящем документе, можно использовать в этом качестве.

Для осуществления описанных способов контроля в качестве "первого" и "второго" антитела и антигенсвязывающего фрагмента можно применять различные комбинации антител и антигенсвязывающих фрагментов, представленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 включает в себя гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN).

В некоторых вариантах осуществления количество CD123 определяют таким методом, как вестерн-блоттинг, радиоиммунологический анализ, иммунофлуориметрия, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммунологический анализ, иммуногистохимия, цитометрия посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или ELISA.

Наборы для обнаружения CD123.

В настоящем документе предлагаются наборы для обнаружения CD123 в биологическом образце. Эти наборы включают в себя одно или более CD123-специфических антител, описанных в настоящем документе, или их антигенсвязывающих фрагментов и инструкции по применению набора.

Предлагаемое CD123-специфическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент может находиться в растворе; быть лиофилизированным; прикрепленным к субстрату, носителю или планшету; или может быть меченым с возможностью обнаружения.

Описанные наборы также могут включать в себя дополнительные компоненты, используемые для осуществления способов, описанных в настоящем документе. В качестве примера наборы могут содержать средства для получения образца от субъекта, контрольный или эталонный образец, например образец от субъекта с медленно прогрессирующим раком и/или субъекта без рака, одно или более отделений для образцов и/или материалы инструкций, описывающие осуществление способов изобретения, и тканеспецифические контроли или стандарты.

Средства для определения уровня CD123 могут дополнительно включать, например, буферы и другие реагенты, предназначенные для применения в анализе для определения уровня CD123. Инструкции могут представлять собой, например, печатные инструкции по выполнению анализа и/или инструкции по оценке уровня экспрессии CD123.

Описанные наборы также могут включать в себя средства для выделения образца у субъекта. Эти средства могут содержать один или более элементов оборудования или реагентов, которые можно использовать для получения текучей среды или ткани от субъекта. Средства для получения образца у субъекта также могут представлять собой средства для выделения компонентов крови, таких как сыворотка, из образца крови. Предпочтительно набор предназначен для применения у человеческого индивида.

Мультиспецифические антитела.

Связывающие домены антител к CD123, описанные в настоящем документе, распознают клетки, экспрессирующие на своей поверхности CD123. Как отмечалось выше, экспрессия CD123 может являться показателем раковой клетки. Более специфическое нацеливание на конкретные субпопуляции клеток

можно добиться путем получения биспецифических молекул, например, антител или фрагментов антител, которые связываются с CD123 и с другой мишенью. Примеры таких дополнительных мишеней включают CD3 и CD33. Этого достигают путем получения молекулы, содержащей первую область, связывающуюся с CD123, и вторую область, связывающуюся с дополнительным антигеном. Антигенсвязывающие области могут иметь любую форму, позволяющую специфически распознавать мишень, например связывающая область может представлять собой или может включать в себя переменный домен тяжелой цепи или Fv (комбинацию переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи). Соответственно, предлагаются биспецифические молекулы, содержащие две антигенсвязывающие области, которые связываются с CD123 и с другим антигеном соответственно.

Некоторые мультиспецифические антитела, описанные в настоящем документе, содержат две разные антигенсвязывающие области, которые связываются с CD123 и CD3 соответственно. В предпочтительном варианте осуществления предлагаются мультиспецифические антитела, связывающиеся с CD123 и CD3 (мультиспецифические антитела к CD123 × CD3), и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3 содержит первую тяжелую цепь (HC1) и первую легкую цепь (LC1), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD123, и вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), которые спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3 представляет собой биспецифическое антитело, содержащее CD123-специфическое плечо, которое содержит первую тяжелую цепь (HC1) и первую легкую цепь (LC1), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD123, и CD3-специфическое плечо, которое содержит вторую тяжелую цепь (HC2) и вторую легкую цепь (LC2), которые спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела настоящего изобретения включают в себя антитела, имеющие полную структуру антитела. Термин "полноразмерное антитело" в настоящем документе означает антитело, имеющее две полноразмерные тяжелые цепи антитела и две полноразмерные легкие цепи антитела. Полноразмерная тяжелая цепь антитела (HC) включает в себя переменные и константные домены тяжелой цепи VH, CH1, CH2 и CH3. Полноразмерная легкая цепь антитела (LC) включает в себя переменные и константные домены легкой цепи VL и CL. Полноразмерное антитело может не содержать C-концевого лизина (K) либо в одной, либо в обеих тяжелых цепях. Термин "Fab-плечо" или "полумолекула" означает одну пару тяжелая цепь-легкая цепь, специфически связывающуюся с антигеном.

CD123-связывающее плечо мультиспецифических антител, предложенных в настоящем документе, может быть получено из любого из CD123-специфических антител, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающее плечо связывается с эпитопом, включающим в себя один или более остатков из (i) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 195-202 (RARERVYE (SEQ ID NO: 234)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 156-161 (RKFRYE (SEQ ID NO: 232)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 173-178 (TEQVRDR (SEQ ID NO: 233)), или (ii) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 164-175 (IQKRMQPVITEQ (SEQ ID NO: 228)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 184-189 (LLNPGT (SEQ ID NO: 229)). В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающее плечо конкурирует за связывание с CD123 с CD123-специфическим антителом или антигенсвязывающим фрагментом, связывающим эпитоп, который включает в себя один или более остатков из (i) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 195-202 (RARERVYE (SEQ ID NO: 234)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 156-161 (RKFRYE (SEQ ID NO: 232)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 173-178 (TEQVRDR (SEQ ID NO: 233)), или (ii) сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 164-175 (IQKRMQPVITEQ (SEQ ID NO: 228)), и/или сегмента CD123 SP2 ECD, содержащего остатки 184-189 (LLNPGT (SEQ ID NO: 229)). CD123-связывающие плечи, которые связываются по меньшей мере с одним остатком из этих эпитопов, могут также связываться с дополнительными остатками в CD123 ECD. В некоторых вариантах осуществления связывающееся с CD123 плечо является нейтрализующим. Нейтрализующее CD123-связывающее плечо включает в себя те, которые способны ингибировать связывание IL-3 с CD123, что определяют посредством измерения снижения фосфорилирования STAT5 при стимуляции клеток TF-1 при помощи rhIL-3. В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD123-связывающее плечо связывается с человеческим CD123 SP1, предпочтительно с его внеклеточным доменом.

В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, полученные из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких

CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB6, I3RB7, I3RB8, I3RB9, I3RB11, I3RB12, I3RB16, I3RB17, I3RB18, I3RB19, I3RB20, I3RB21, I3RB22, I3RB24, I3RB28, I3RB29, I3RB30, I3RB32, I3RB33, I3RB34, I3RB35, I3RB36, I3RB37, I3RB38, I3RB40 или I3RB47. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB6, I3RB7, I3RB8, I3RB9, I3RB11, I3RB12, I3RB16, I3RB17, I3RB18, I3RB19, I3RB20, I3RB21, I3RB22, I3RB24, I3RB28, I3RB29, I3RB30, I3RB32, I3RB33, I3RB34, I3RB35, I3RB36, I3RB37, I3RB38, I3RB40 или I3RB47. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит вариабельный домен тяжелой цепи, полученный из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, полученные из клона антитела, представленного в табл. 1. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит вариабельный домен тяжелой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB6, I3RB7, I3RB8, I3RB9, I3RB11, I3RB12, I3RB16, I3RB17, I3RB18, I3RB19, I3RB20, I3RB21, I3RB22, I3RB24, I3RB28, I3RB29, I3RB30, I3RB32, I3RB33, I3RB34, I3RB35, I3RB36, I3RB37, I3RB38, I3RB40 или I3RB47. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP1-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB6, I3RB7, I3RB8, I3RB9, I3RB11, I3RB12, I3RB16, I3RB17, I3RB18, I3RB19, I3RB20, I3RB21, I3RB22, I3RB24, I3RB28, I3RB29, I3RB30, I3RB32, I3RB33, I3RB34, I3RB35, I3RB36, I3RB37, I3RB38, I3RB40 или I3RB47.

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD123-связывающее плечо связывается с человеческим CD123 SP2, предпочтительно с его внеклеточным доменом. В предпочтительных вариантах осуществления биспецифических антител CD123-связывающее плечо связывается с человеческим CD123 SP1 и человеческим CD123 SP2 и более предпочтительно с их внеклеточными доменами. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP2-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB18, I3RB19 или I3RB30. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP2-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB18, I3RB19 или I3RB30. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP2-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит вариабельный домен тяжелой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB18, I3RB19 или I3RB30. В некоторых примерах осуществления таких CD123 SP2-связывающих плеч первая антигенсвязывающая область, которая связывается с CD123, содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи клона I3RB1, I3RB2, I3RB5, I3RB18, I3RB19 или I3RB30.

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD123-связывающее плечо также связывается с CD123 яванского макака, предпочтительно с его внеклеточным доменом.

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD123-связывающее плечо получено из CD123-специфического антитела, которое конкурирует за связывание с CD123 с клоном антитела I3RB2, I3RB60, I3RB70, I3RB79 или I3RB118. В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD123-связывающее плечо получено из CD123-специфического антитела, которое конкурирует за связывание с CD123 с клоном антитела I3RB18, I3RB49 или I3RB55. Конкуренцию за связывание можно определить с помощью анализа конкурентного связывания ELISA в соответствии с методикой, описанной ниже в примере 5. Конкурентное связывание можно определить путем обнаружения по меньшей мере 20% ингибирования связывания первого антитела вторым антителом независимо от порядка, в котором антитела связываются с CD123 (т.е. если при связывании антитела А с CD123 до антитела В наблюдается только 10% ингибирование, но при связывании антитела В с CD123 до антитела А наблюдается 30% ингибирование, то поскольку в одном из экспериментов наблюдается более чем 20% ингибирование, можно сделать вывод о конкурентном связывании).

В некоторых вариантах осуществления CD123-связывающее плечо мультиспецифического антитела представляет собой IgG или его производное, например изоформы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых CD123-связывающее плечо имеет изоформы IgG1, оно содержит замену(ы) L234A, L235A и K409R в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых CD123-связывающее плечо имеет изоформы IgG4, оно содержит замену(ы) S228P, L234A и L235A в области Fc.

В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител второе антигенсвязывающее плечо связывается с человеческим CD3. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления CD3-специфическое плечо биспецифического антитела к CD123 × CD3 получено из CD3-специфического антитела, которое связывает и активирует первичные Т-клетки человека и/или первичные Т-клетки яванского макака. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо связывается с эпителием

на N-конце CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо контактирует с эпитопом, включающим в себя шесть N-концевых аминокислот CD3ε. В некоторых вариантах осуществления CD3-специфическое связывающее плечо биспецифического антитела получено из мышинового моноклонального антитела SP34, мышинового изоформа IgG3/λ. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо содержит CDR антитела SP34. Такие CD3-связывающие плечи могут связываться с CD3 с аффинностью 5×10^{-7} М или менее, например 1×10^{-7} М или менее, 5×10^{-8} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 5×10^{-9} М или менее или 1×10^{-9} М или менее. CD3-специфическое связывающее плечо может представлять собой гуманизированный вариант плеча мышинового моноклонального антитела SP34. Для гуманизации антитела к CD3, из которого получают CD3-специфическое плечо, можно использовать адаптацию для человеческого каркаса (HFA). В некоторых вариантах осуществления биспецифических антител CD3-связывающее плечо содержит пару из тяжелой и легкой цепей, выбранных из табл. 2. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо биспецифического антитела к CD123 × CD3 получено из вариантов, представленных в табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо представляет собой IgG или его производное. В некоторых вариантах осуществления CD3-связывающее плечо представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых CD3-связывающее плечо имеет изоформы IgG1, оно содержит замену(ы) L234A, L235A и F405L в области Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых CD3-связывающее плечо имеет изоформы IgG4, оно содержит замену(ы) S228P, L234A, L235A, F405L и R409K в области Fc. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG-AA Fc. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой IgG-AA Fc-L234A, L235A и F405L. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных человеческих Т-клетках. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных Т-клетках яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты связываются с CD3ε на первичных Т-клетках человека и яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты активируют первичные человеческие Т-клетки CD4+. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты активируют первичные Т-клетки CD4+ яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к CD123 × CD3, имеющее CD123-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, Ab7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к CD123 × CD3, имеющее CD123-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, Ab7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к CD123 × CD3, имеющее CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, Ab7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к CD123 × CD3, имеющее CD123-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, mAb7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466, и CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, Ab7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466. В некоторых вариантах осуществления предлагается биспецифическое антитело к CD123 × CD3, имеющее CD123-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, Ab7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466, и CD3-связывающее плечо, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь клона антитела I3RB179, I3RB180, I3RB181, I3RB182, I3RB183, I3RB186, I3RB187, I3RB188, I3RB189, CD3B191, Ab7959, Ab3978, Ab7955, Ab9958, Ab8747, Ab8876, Ab4435 или Ab5466.

Предпочтительные биспецифические антитела к CD123 × CD3 представлены в табл. 13 и 17.

Описаны разные форматы биспецифических антител, и обзор по ним недавно был представлен в публикации Chames and Baty (2009) Curr. Opin. Drug. Disc. Dev. 12: 276.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело настоящего изобретения представляет собой диатело, кросстело или биспецифическое антитело, полученное путем контролируемого

обмена Fab-плечами, например способами, описанными в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СНЗ для усиления гетеродимеризации; рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, причем каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG сливаются с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные антитела сливаются с константными доменами тяжелой цепи, Fc-областями или их частями; слитые молекулы Fab, в которых сливаются друг с другом разные Fab-фрагменты; антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) сливаются друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

В некоторых вариантах осуществления IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СНЗ включают в себя молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotechthe), "выступы во впадины" (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически-спариваемые (Amgen), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и DuoBody (Genmab A/S).

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием включают в себя молекулы (DT)-Ig двойного нацеливания (GSK/Domantis), антитело "два в одном" (Genentech), поперечно-сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-body (CovX/Pfizer).

В некоторых вариантах осуществления слитые молекулы IgG включают в себя молекулы (DVD)-Ig с двойным переменным доменом (Abbott), IgG-подобную биспецифическую молекулу (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche).

В некоторых вариантах осуществления слитые Fc-молекулы включают в себя слияния ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), антитело, полученное в соответствии с технологией двойного перенаправления аффинности (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

В некоторых вариантах осуществления к биспецифические антитела со слитыми Fab включают в себя F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), "двойного действия" или Bis-Fab (Genentech), "причал на замке" (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диатела и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический T-клеточный энгейджер (BITE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), антитело, полученное в соответствии с технологией двойного перенаправления аффинности (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние ScFv человеческого сывороточного альбумина альбумина (Merrimack) и COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

Полноразмерные биспецифические антитела настоящего изобретения можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, введя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции изомеризации дисульфидной связи и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются, и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч могут быть сконструированы так, чтобы они способствовали гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на CD123 (IL3-R α) и эпитопом на CD3.

Термин "гомодимеризация" в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин "гомодимер" в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Термин "гетеродимеризация" в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин "гетеродимер" в настоящем документе обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию "выступ во впадину" (см., например, международную публикацию РСТ № WO 2006/028936). Вкратце, выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергнуть

мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, стимулируя образование гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, специфически связывающегося со вторым антигеном. После коэкспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с "впадиной" и тяжелой цепи с "выступом" образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются следующие (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Можно использовать другие стратегии, например стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US 2010/0015133; патентной публикации США № US 2009/0182127; патентной публикации США № US 2010/028637 или патентной публикации США № US 2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T34W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F_Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US 2012/0149876 или патентной публикации США № US 2013/0195849.

В дополнение к вышеописанным способам биспецифические антитела настоящего изобретения можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в СНЗ-областях двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO 2011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD123 (IL3-R α)) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD3) конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, обеспечивающие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных, чтобы цистеины в шарнирной области подверглись изомеризации дисульфидной связи; и в результате обмена плечами Fab образуется биспецифическое антитело. Условия инкубации можно оптимально вернуть к невозстанавливающим условиям. К примерам пригодных для использования восстанавливающих агентов относятся 2-меркаптоэтиламин (2-МЕА), дитиотреитол (DTT), дитиоэритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиваллил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и β -меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис-(2-карбоксиваллил)фосфина. Например, можно использовать инкубацию в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-МЕА или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при значении pH от 5 до 8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

Наряду с описанными мультиспецифическими антителами к CD123 \times CD3 также предлагаются полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3. В настоящем документе также предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие мультиспецифические антитела к CD123 \times CD3. Также описываются клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, E. coli). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками.

Терапевтическая композиция и способы лечения с применением мультиспецифических антител и их мультиспецифических антигенсвязывающих фрагментов.

Биспецифические антитела к CD123, описанные выше, например вышеописанные биспецифические антитела к CD123 \times CD3, полезны в терапии. В частности, биспецифические антитела к CD123 полезны при лечении рака. Также в настоящем документе предлагаются терапевтические композиции для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих, содержащие терапевтически эффективное количество мультиспецифического антитела или мультиспецифического антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 \times CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 \times CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 \times CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В

одном варианте осуществления указанная фармацевтическая композиция предназначена для лечения рака с экспрессией CD123, включая (без ограничений) следующие виды рака: гемобласты с экспрессией CD123, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмодитоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN); и другие виды рака, которые пока не определены как имеющие экспрессию CD123. Конкретные биспецифические антитела, которые можно применять для лечения рака, например гемобласта, включая конкретные виды рака, описанные выше, включают в себя антитела 7959, 3978, 7955, 9958, 8747, 4435 и 5466. Одним примером биспецифического антитела, полезного для лечения рака, например гемобласта, включая эти конкретные виды рака, является антитело 9958. Другим примером биспецифического антитела, полезного для лечения рака, например гемобласта, включая эти конкретные виды рака, является антитело 3978. Другим примером биспецифического антитела, полезного для лечения рака, например гемобласта, включая эти конкретные виды рака, является антитело 8747. Другим примером биспецифического антитела, полезного для лечения рака, например гемобласта, включая эти конкретные виды рака, является антитело 7959.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем документе, содержат: а) эффективное количество мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения, и б) фармацевтически приемлемый носитель, который может быть инертным или физиологически активным. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент. Термин "фармацевтически приемлемые носители" в этом описании включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры приемлемых носителей, разбавителей и/или эксципиентов включают одно или более из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буферного раствора, декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также любую их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. В частности, соответствующие примеры приемлемого носителя включают: (1) фосфатно-солевой буферный раствор по Дульбекко, рН около 7,4, содержащий или не содержащий от около 1 до 25 мг/мл человеческого сывороточного альбумина, (2) 0,9% солевой раствор (0,9% мас./об. хлорида натрия (NaCl)) и (3) 5% (мас./об.) декстрозу; и также он может содержать антиоксидант, например триптами, и стабилизирующий агент, такой как Твин 20®.

Композиции, описанные в настоящем документе, также могут содержать дополнительный терапевтический агент, являющийся необходимым для конкретного расстройства, которое лечат. Предпочтительно, чтобы мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела и дополнительное активное соединение имели комплементарные виды активности, отрицательно не влияющие друг на друга. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

Композиции изобретения могут быть представлены в различных формах. Эти формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, но предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и от терапевтического применения. Типичные предпочтительные композиции имеют форму растворов, пригодных для инъекций или инфузии. Предпочтительным способом введения является парентеральный (например, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, подкожный). В предпочтительном варианте осуществления выполняют внутривенное болюсное введение композиции изобретения или ее вводят в виде непрерывной инфузии в течение некоторого периода времени. В другом предпочтительном варианте осуществления их вводят внутримышечно, подкожно, внутрисуставно, внутрь опухоли, около опухоли, в пораженную ткань или около пораженной ткани, чтобы они оказывали локальный и системный терапевтические эффекты.

Стерильные композиции для парентерального введения можно получать, вводя антитело, фрагмент антитела или конъюгат антитела настоящего изобретения в нужном количестве в подходящий растворитель с последующей стерилизацией посредством микрофльтрации. В качестве растворителя или носителя можно использовать воду, солевой раствор, фосфатно-солевой буферный раствор, декстрозу, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинацию. Во многих случаях будет предпочтительно включать в композицию изотонические агенты, такие как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия. Эти композиции также могут содержать вспомогательные вещества, в частности смачивающие, изотонизирующие, эмульгирующие, диспергирующие и стабилизирующие агенты. Стерильные композиции для парентерального введения также можно получать в виде стерильных твердых композиций, растворяемых во время применения в стерильной воде или любой другой пригодной для инъекций стерильной среде.

Мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела также можно вводить перорально. В каче-

стве твердых композиций для перорального применения можно использовать таблетки, пилюли, порошки (желатиновые капсулы, саше) или гранулы. В этих композициях активный ингредиент настоящего изобретения в потоке аргона смешивают с одним или более инертными разбавителями, такими как крахмал, целлюлоза, сахароза, лактоза или диоксид кремния. Эти композиции также могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например, одно или более смазывающих веществ, таких как стеарат магния или тальк, красители, покрытия (таблетка с сахарным покрытием) или глазурь.

В качестве жидких композиций для перорального введения можно использовать фармацевтически приемлемые растворы, суспензии, эмульсии, сиропы и эликсиры, содержащие инертные разбавители, такие как вода, этанол, глицерин, растительные масла или парафиновое масло. Эти композиции могут содержать вещества, отличные от разбавителей, например смачивающие вещества, подсластители, загустители, ароматизирующие или стабилизирующие продукты.

Дозы зависят от желаемого эффекта, продолжительности лечения и применяемого способа введения; как правило, они составляют от 5 до 1000 мг в сутки перорально для взрослых, при разовых дозах в диапазоне от 1 до 250 мг активного вещества. В целом соответствующую дозировку определяет врач в зависимости от возраста, массы тела и других факторов, специфичных для субъекта, подлежащего лечению.

Также в настоящем документе предлагаются способы уничтожения клеток CD123+ путем введения пациенту, нуждающемуся в этом, мультиспецифического антитела, которое связывается с указанным CD123 и способно рекрутировать Т-клетки для уничтожения указанных клеток CD123+ (т.е. перенаправление Т-клеток). В терапевтических целях можно применять любые из мультиспецифических антител или фрагментов антител настоящего изобретения. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

В предпочтительном варианте осуществления мультиспецифические антитела или фрагменты антител применяют для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих. В более предпочтительном варианте осуществления для лечения гиперпролиферативного расстройства у млекопитающих применяют одну из вышеописанных фармацевтических композиций, содержащих мультиспецифическое антитело или фрагмент антитела. В одном варианте осуществления упомянутое расстройство представляет собой рак. В частности, рак представляет собой рак с экспрессией CD123, включая (без ограничений) следующие виды рака: гемобластомы с экспрессией CD123, например, острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитомоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN); и другие виды рака, которые пока не определены как имеющие экспрессию CD123. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент.

Соответственно, фармацевтические композиции изобретения могут применяться для лечения или профилактики различных видов рака, включая (без ограничений), следующие: рак с экспрессией CD123, включая (без ограничений) следующие виды рака: гемобластомы с экспрессией CD123, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитомоидную дендритноклеточную опухоль (DPDCN); и другие виды рака, которые пока не определены как имеющие экспрессию CD123.

Аналогично, в настоящем документе дополнительно предлагается способ ингибирования роста выбранных популяций клеток, включающий в себя приведение экспрессирующих CD123 клеток-мишеней или ткани, содержащей такие клетки, в контакт с эффективным количеством мультиспецифического антитела или фрагмента антитела настоящего изобретения, отдельно или в комбинации с другими цитотоксическими или терапевтическими агентами, в присутствии моноклеарных клеток периферической крови (PBMC). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. В предпочтительном варианте осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. Способ ингибирования роста выбранных популяций клеток можно использовать на практике *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Примеры использования *in vitro* включают в себя обработку аутогенного костного мозга перед его трансплантацией тому же пациенту с целью уничтожения пораженных или злокачественных клеток; обработку костного мозга перед его трансплантацией с целью уничтожения компетентных Т-клеток и предотвращения реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD); обработку клеточных культур с целью уничтожения всех клеток, за исключением нужных вариантов, которые не экспрессируют антиген-мишень; или с целью уничтожения вариантов, экспрессирующих нежелательный антиген. Условия неклинического применения *in vitro* может легко определить специалист в данной области.

Примерами клинического применения *ex vivo* являются удаление опухолевых клеток из костного мозга перед аутотрансплантацией при лечении рака. Лечение можно проводить описанным ниже образом. Костный мозг берут у пациента или другого субъекта, а затем инкубируют в среде, содержащей сыворотку, к которой добавлен цитотоксический агент изобретения. Диапазон концентраций составляет от около 10 до 1 мкМ, период времени от около 30 мин до около 48 ч при температуре около 37°C. Точные условия по концентрации и времени инкубации, т.е. дозе, может легко определить специалист в данной области. После инкубации клетки костного мозга промывают средой, содержащей сыворотку, и возвращают пациенту путем в/в инфузии в соответствии с известными способами. В тех случаях, в которых между моментом отбора костного мозга и обратного введения обработанных клеток пациент получает другие виды лечения, например курс абляционной химиотерапии или облучения всего тела, обработанные клетки костного мозга хранят замороженными в жидком азоте с использованием стандартного медицинского оборудования.

При клиническом применении *in vivo* терапевтически эффективное количество мультиспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента вводят требующему этого субъекту. Например, мультиспецифические антитела к CD123 × CD3 и их мультиспецифические антигенсвязывающие фрагменты можно использовать при лечении рака с экспрессией CD123 у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD123 представляет собой гемобластоз, например острый миелолейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ALL, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелолейкоз (CML) или бластную плазмцитомную дендритноклеточную опухоль (DPDCN). В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим, предпочтительно человеком. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в виде раствора, протестированного на стерильность.

Схемы дозировки при вышеописанных способах лечения и применения корректируют для обеспечения оптимального желательного ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно выполнить одно болюсное введение, ввести несколько разделенных доз в течение некоторого периода времени, либо доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена по показаниям, требуемым терапевтической ситуацией. Парентеральные композиции могут готовить в виде стандартных единиц дозирования для упрощения введения и для унификации дозирования.

Эффективные дозировки и схемы дозирования мультиспецифических антител и фрагментов зависят от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и могут быть определены специалистом в данной области. Не имеющим ограничительного характера примером диапазона терапевтически эффективного количества соединения настоящего изобретения является диапазон около 0,001-10 мг/кг, например около 0,001-5 мг/кг, например около 0,001-2 мг/кг, например около 0,001-1 мг/кг, например около 0,001, около 0,01, около 0,1, около 1 или около 10 мг/кг.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и назначить необходимое эффективное количество фармацевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с более низких доз мультиспецифического антитела или фрагмента в фармацевтической композиции, чем необходимо для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозировку до достижения желаемого эффекта. В целом, приемлемой суточной дозой биспецифического антитела настоящего изобретения будет такое количество соединения, которое является наименьшей дозой, вызывающей терапевтический эффект. Введение может быть, например, парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить путем инфузии в еженедельной дозе, рассчитанной в мг/м². Такие дозы, например, можно рассчитать на основании дозы в мг/кг, описанной выше, согласно следующей формуле: доза (мг/кг) × 70 : 1,8. Такое введение можно повторять, например, от 1 до 8 раз, например от 3 до 5 раз. Введение можно осуществлять путем непрерывной инфузии в течение периода времени от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить путем медленной непрерывной инфузии в течение длительного времени, например более 24 ч, чтобы уменьшить побочные токсические эффекты.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить в еженедельной дозе, рассчитанной как фиксированная доза, вводимая до восьми раз, например от четырех до шести раз, один раз в неделю. Такую схему можно повторять один или более раз по мере необходимости, например через шесть месяцев или двенадцать месяцев. Такие фиксированные дозы могут основываться, например, на вышеуказанных дозах в мг/кг в расчете на предполагаемую массу тела 70 кг. Дозу можно определять или корректировать, измеряя количество биспецифического антитела настоящего изобретения в крови после введения, например, путем отбора биологического образца и использования антиидиотипических антител, нацеленных на CD123-связывающую область мультиспецифических антител настоящего изобретения.

В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело или фрагмент можно вводить в виде поддерживающей терапии, например, один раз в неделю в течение периода шесть или более месяцев.

Мультиспецифическое антитело или фрагмент можно также вводить профилактически, чтобы снизить риск развития рака, замедлить начало развития событий при прогрессировании рака и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии рака.

Мультиспецифические антитела и их фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными для лечения заболевания или состояния. Соответственно, в одном варианте осуществления лекарственное средство, содержащее антитело, предназначено для комбинирования с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, например химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления этот другой терапевтический агент представляет собой цитарабин, антрациклин, гистамина дигидрохлорид или интерлейкин 2. Такое комбинированное введение может быть одновременным, раздельным или последовательным, в любом порядке. При одновременном введении агенты можно вводить в виде одной композиции или в виде отдельных композиций в зависимости от ситуации.

В одном варианте осуществления предлагается способ лечения у субъекта расстройства с вовлечением клеток, экспрессирующих CD123, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например биспецифического антитела к CD123 × CD3, описанного в настоящем документе, и проведения лучевой терапии. В одном варианте осуществления предлагается способ лечения или предотвращения рака, причем способ включает в себя введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества мультиспецифического антитела или фрагмента, например антитела к CD123 × CD3, описанного в настоящем документе, и проведение лучевой терапии. Предлагается лучевая терапия, которая может включать в себя облучение или соответствующее введение радиофармацевтических препаратов пациенту. Источник излучения может быть внешним или внутренним по отношению к получающему лечение пациенту (лучевая терапия может, например, представлять собой наружную дистанционную лучевую терапию (EBRT) или брахитерапию (BT)). Радиоактивные элементы, которые можно использовать на практике для этих способов, включают в себя, например, радий, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, йод-123, йод-131 и индий-111.

Наборы.

Также в настоящем документе предлагаются наборы, например, содержащие описанное мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и инструкции по применению антитела или фрагмента для уничтожения определенных типов клеток. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент. Инструкции могут включать в себя указания по использованию мультиспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Как правило, набор имеет отделение, содержащее мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть в лиофилизированном виде, жидком виде или другом виде, пригодном для включения в набор. Набор также может содержать дополнительные элементы, необходимые для практического использования описанного способа согласно инструкциям к набору, например стерилизованный раствор для разведения лиофилизированного порошка, дополнительные агенты для комбинации с мультиспецифическим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом перед введением пациенту, и инструменты, помогающие вводить мультиспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент пациенту.

Диагностические виды применения.

Мультиспецифические антитела и фрагменты, описанные в настоящем документе, также можно применять для диагностических целей. Следовательно, также предлагаются диагностические композиции, содержащие мультиспецифическое антитело или фрагменты, описанные в настоящем документе, и

их применение. В предпочтительных вариантах осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой мультиспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент, а более предпочтительно биспецифическое антитело к CD123 × CD3, как описано в настоящем документе, или его биспецифический к CD123 × CD3 антигенсвязывающий фрагмент. В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предлагается набор для диагностики рака, содержащий контейнер, который содержит биспецифическое антитело к CD123 × CD3 и один или более реагентов для обнаружения связывания антитела с CD123. Реагенты могут включать в себя, например, флуоресцентные метки, ферментативные метки и другие обнаруживаемые метки. Реагенты также могут включать вторичные или третичные антитела или реагенты для ферментативных реакций, причем в результате ферментативных реакций образуется продукт, который можно визуализировать. Например, мультиспецифические антитела, описанные в настоящем документе, или их антигенсвязывающие фрагменты можно пометить радиоактивной меткой, флуоресцентной меткой, эпитопной меткой, биотином, хромофорной меткой, ECL-меткой, ферментом, рутением, ¹¹¹In-DOTA, ¹¹¹In-диэтиленetriаминпентауксусной кислотой (DTPA), пероксидазой хрена, щелочной фосфатазой и β-галактозидазой, или полигистидином, или подобными метками, известными специалистам.

Представленные ниже примеры приводятся в качестве дополнения к приведенному выше описанию и в целях лучшего понимания объекта изобретения, описанного в настоящем документе. Эти примеры не следует считать ограничивающими описанный объект изобретения. Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и в свете этого специалистам будут очевидны различные модификации и изменения, которые следует включать в объем изобретения, и которые можно вносить, не отклоняясь от объема изобретения.

Пример 1. Материалы.

Создание клеточных линий CD123.

Был получен набор векторов pDisplay™, презентующих человеческий CD123 SP1 ECD (аминокислоты 20-305) (SEQ ID NO: 1), человеческий CD123 SP2 ECD (аминокислоты 19-227 из SEQ ID NO: 2) и CD123 ECD яванского макака (аминокислоты 19-305 из SEQ ID NO: 3) для применения в качестве инструментов скрининга при оценке лидерных антител к CD123. Был использован экспрессионный вектор млекопитающих pDisplay (Invitrogen), позволяющий отображать белки на клеточной поверхности (фиг. 1). Белки, экспрессированные в pDisplay™, сливали на N-конце с лидерной последовательностью κ-цепи мышинового Ig, которая направляет белок по секреторному пути, а на C-конце - с трансмембранным доменом рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), который фиксирует белок в плазматической мембране, отображая его на внеклеточной стороне. Рекомбинантные белки, экспрессируемые из pDisplay™, содержат эпитопы гемагглютинина А и тус для обнаружения методом вестерн-блоттинга или иммунофлуоресценции. Экспрессией управляет промотор CMV.

Векторы были на временной основе трансфицированы в клетки HEK293T с использованием стандартных способов. Прикрепляющиеся трансфицированные клетки 293F отбирали по стабильной интеграции плазмиды, затем сортировали отдельные клетки и количественно оценивали экспрессию поверхностного рецептора CD123 методом FACS с применением набора BangsLabs Quantum FITC-5kit (кат. № 855, Bangs Laboratories, Inc). Для скрининга отбирали по 10 клонов отдельных клеток для каждой клеточной линии и проводили количественную оценку экспрессии CD123 ECD. Клеточные линии, использованные для последующего скрининга хитов, экспрессировали на своей поверхности приблизительно 500000 копий CD123 ECD на клетку.

Получение растворимого белка CD123 ECD.

Рекомбинантный человеческий белок CD123 SP1 ECD с His-меткой (партия № LV081110A), соответствующий аминокислотам 20-305 CD123 SP1 (SEQ ID NO: 1) получали от R&D Systems (№ 301-R3/CF), и применяли в фаговом пэннинге и скрининге хитов. Перед применением белок тестировали на эндотоксин и биотинилировали для исследований с фаговым пэннингом. Этот материал также использовали для измерений связывания и аффинности.

Рекомбинантный человеческий белок CD123 SP2 ECD, соответствующий аминокислотам 18-225 человеческого CD123 SP2 (SEQ ID NO: 2), очищали для применения в измерении связывания и аффинности. кДНК получали с использованием методов генного синтеза (патент США № 6670127; патент США № 6521427). Плазмиды для экспрессии CD123 ECD SP2 получали с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Фрагмент гена CD123 ECD SP2 с N-концевой сигнальной последовательностью gp67 и C-концевой 6-His-меткой клонировали в сайты EcoRI и NotI вектора pFastbacl (Invitrogen) и экспрессировали с системой Bac to Bac (Invitrogen) в клетках High Five (Invitrogen). Секретированный белок (SEQ ID NO: 226) очищали с использованием колонок HisTrap (GE) и Superdex 75 (GE). Этот материал также использовали для измерений связывания и аффинности и для картирования эпитопов.

Растворимые белки CD123 ECD биотинилировали при помощи набора для биотинилирования Sure-Link Biotinylation Kit (KPL № 86-00-01) согласно инструкциям производителя. Для подтверждения мономерного состояния проводили электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецил-

сульфата натрия (SDS/PAGE).

Антитело к CD3 для рентгенокристаллографии.

Моноклональное антитело SP34, мышинный изотип IgG3/λ, приобретенное в BD Biosciences Pharmingen (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), кат. № 556611, и содержащее легкие и тяжелые цепи, показано в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно.

Пример 2. Определение mAb к CD123 человека.

Пэннинг в растворе полученных *de novo* человеческих библиотек Fab-pIX [Shi, L., et al., *J. Mol. Biol.*, 2010, 397(2), p. 385-396. WO 2009/085462], состоящих из библиотек тяжелых цепей VH1-69, 3-23 и 5-51 в паре с библиотеками легких цепей VK1-39, 3-11, 3-20 и 4-1, выполняли с использованием метода захвата на магнитных гранулах, покрытых стрептавидином, биотинилированного антигена, как описано (Rothe et al., *J. Mol. Biol.* 376:1182-1200, 2008; Steidl et al., *Mol. Immunol.* 46: 135-144, 2008) за четыре последовательных раунда.

Ген pIX вырезали из фагемидной ДНК после четвертого раунда пэннинга и получали растворимые кодирующие Fab-области с his-метками. Fab-области экспрессировали в *E. coli* и подвергали скринингу на связывание с рекомбинантным человеческим белком CD123 SP1 ECD, меченным His, в анализе ELISA. Коротко, 96-луночные планшеты Nunc Maxisorp (Nunc № 437111) покрывали овечьими антителами к человеческому Fd (The Binding Site № PC075) в PBS с концентрацией 1 мкг/мл в течение ночи при 4°C. Колонии бактерий, содержащих экспрессионный вектор Fab, культивировали в 450 мкл 2xYT (карбенециллин) в глубоколоночных культуральных планшетах до помутнения (ОП 600 ≈ 0,6). Экспрессию Fab индуцировали путем добавления IPTG в концентрации 1 мМ. Культуры растили в течение ночи при 30°C, а затем очищали путем центрифугирования. Покрытые антителами к Fd планшеты Maxisorp промывали однократно TBS с 0,5% твин-20 (Sigma № 79039-10ПАК) и блокировали добавлением 200 мкл PBS-твин (0,5%)+обезжиренного сухого молока (3%) на лунку в течение 1 ч при комнатной температуре. На этом и всех последующих этапах планшеты трехкратно промывали TBS с 0,5% твин-20 (Sigma № 79039-10ПАК). В каждую лунку вводили по 50 мкл супернатанта Fab, после чего инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. После промывки добавляли 50 мкл биотинилированного CD123 и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После промывки добавляли 50 мкл комплекса стрептавидин: HRP (Pierce № 21130) в разведении 1:5000, и планшеты инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и добавляли 50 мкл хемилюминесцентного субстрата PoD (Roche № 121-5829500001) согласно инструкциям производителя. Далее планшеты просканировали на люминесценцию на планшетном сканере Envision (Perkin Elmer). Хитами считали лунки, в которых сигнал более чем в 5 раз превышал фоновый уровень.

Клоны, демонстрирующие связывание с рекомбинантным человеческим белком CD123 SP1 ECD с His-меткой, секвенировали по вариабельным областям тяжелой (HC) и легкой (LC) цепей. Всего посредством фагового пэннинга идентифицировали 52 уникальные последовательности Fab, и 45 в конечном счете были преобразованы в изотип IgG1 клонированием методом *in-fusion* (табл. 1). Клонирование методом *in-fusion* выполняли путем ПЦП-амплификации вариабельных областей HC и LC с использованием набора для ПЦП SuperMix High Fidelity (Life Technologies № 10790-020) и клонирования в участки Esp31 вектора VDR149 для HC и вектора VDR157 для LC с использованием набора In-Fusion® HD Cloning Plus (Clontech № 638909). Области VH и VL для хитов показаны ниже в табл. 4.

Последовательности CDR для mAb, полученные в результате фагового пэннинга против рекомбинантного человеческого белка CD123 SP1 ECD с His-меткой (соответствующие SEQ ID NO показаны в скобках)

ИДЕНТИФИКАЦИОНН ЫЙ НОМЕР	H- CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
I3RB1	DYGMS (6) VKG (7)	VIRGGSSKYYADS	HSGSFRFNELD Y (8)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (9)	WASTRE S (10)	QQYYSTPL T (11)
I3RB2	GYWMH (12) VKG (13)	AIRSDGSSKYYADS	DGVIEDTFDY (14)	RASQSVSSYLA (15)	DASNRA T (16)	QQRSNWFL T (17)
I3RB3	SYWMS (18) VKG (19)	GIKYDGGSKYYADS	KWMSYFDY (20)	KSSQSVLYSSNNK NYLA (9)	WASTRE S (10)	QQYYSTPL T (11)
I3RB4	GYGMS (21) VKG (22)	AISGSGSTYYADS	GNWYYGLGFDY (23)	RASQSVSSYLA (24)	GASSRA T (25)	QQYGSSFL T (26)
I3RB5	GYWMS (27) VKG (28)	GINYDGGSTYYADS	DHFLAEFDY (29)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB6	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	GLFNWSNVALD Y (35)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB7	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	GKRWLADAGDF DY (36)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB8	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	HGFAWNDYSL DY (37)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB9	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	GARWFNPPENL DY (38)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB10	SYGIS (39) FQG (40)	WISAIFGNTNYAQK	GGLLYYASYLD Y (41)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
ИДЕНТИФИКАЦИОНН ЫЙ НОМЕР	H- CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
I3RB11	SYGIS (39) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	DLFSWRYSNFD Y (42)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB12	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	ADRVWDYLDY (43)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB13	SYGIS (39) FQG (44)	GIIPFGNTNYAQK	QSGFYVVRLDY (45)	RASQSVSSYLA (15)	DASNRA T (16)	QQRSNWFL T (17)
I3RB14	SYGIS (39) FQG (46)	WISAIFGTTNYAQK	GGPLRYNHF Y (47)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB15	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	DLFSLRYSFLD Y (48)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB16	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	GAVWGDQWFEDY (49)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB17	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	GALSLSWYSFLD Y (50)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB18	SYWIS (51) FQG (52)	IIDPSDSDTRYSPS	GDGSTDLDY (53)	RASQSVSSYLA (24)	GASSRA T (25)	QQDYGFPW T (54)
I3RB19	NYAMS (55) VKG (56)	GIRNGSSTYYADS	GGPIGARFPDY LDY (57)	RASQSIGDFLN (58)	YASSLQ S (59)	QQSYSTPL T (32)
I3RB20	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	DDQIWGSYHLD Y (60)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB21	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	EGWVGQGFEDY (61)	RASQSVANFLA (62)	AASNRA T (63)	QQYFHWPY T (64)
I3RB22	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	NLFYWADSVYL DY (65)	RASQSVNKKWLA (66)	YASNRA T (67)	QQGIDWPR T (68)
I3RB23	SYGIS (39) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	EGSSWKNPRYV FDY (69)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQYDFDFPL T (70)
I3RB24	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	HTDAWGYRLDY (71)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB25	SYGIS (39) FQG (72)	GISAIFGNANYAQK	RFKWWESYFDY (73)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S (31)	QQSYSTPL T (32)
I3RB26	SYGIS (39) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	NGFAWSVSGNL DY (74)	RASQSVDNWLA (75)	GASNRA T (76)	QQSISAPY T (77)
I3RB27	SYAIS (33) FQG (34)	GIIPFGTANYAQK	AGWWNLRYGLD Y (78)	RASQSVAKSLA (79)	AASNRA T (63)	QQFIGWPI T (80)
I3RB28	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK	APFTWDYSRLD Y	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQSYSTPL T

ИДЕНТИФИКАЦИОНН ЫЙ НОМЕР	H- CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
		(34)	(81)		(31)	(32)
I3RB29	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	DSRIWSPSLDY (82)	RASQSIGEWLN (83)	AASSLQ S	QQYHFPPL T
I3RB30	SYAIS (33) FQG	WIIPFGTANYAQK (34)	LVYSSDFDY (86)	RASQSVANWLA (87)	YASNRA T	QQYDGPWR T
I3RB31	SYAIS (33) FQG	GISAYFGNANYAQK (33)	SYFGDAYFDY (90)	RASQSVDKDLA (91)	(67) T	(88) T
I3RB32	SYGIS (39) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	GAWWAYDTYLD Y	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQSYSTPL T
I3RB33	SYGIS (39) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	GYWHWNYDYLD Y	RASQSVNDWLA (95)	GASNRA T	QQYKRAPY T
I3RB34	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	GWSYYRLDY (97)	RASQSVDKWLA (98)	YASNRA T	QQFDRAPF T
I3RB35	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	HLEWDAGPLDY (100)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQYFSPPPY T
I3RB36	SYGIS (39) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	DLHWWAYSNEFD Y	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQSYSTPL T
I3RB37	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	DKTDFPSRLDY (103)	RASQSIATWLN (104)	AASSLQ S	QQYITFPL T
I3RB38	SYGIS (39) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	DLMIWRPENFD Y	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQSYSTPL T
I3RB39	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	EYGLDY (107)	RASQSVADFLA (108)	KASNRA T	QQYNGFWF T
I3RB40	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	GQWADTWFDY (111)	RASQSVAKWLA (112)	GASNRA T	QQYHTAPW T
I3RB41	SYAMS (114) VKG	AISGSGGSTYYADS (22)	VAYWEFFVYES (115)	RASQSVSSSYLA (24)	GASSRA T	QQYGS SPL T
I3RB42	SYAMS (114) VKG	AISGSGGSTYYADS (22)	HDWAFWIVFLD Y	RASQSVSSSYLA (15)	DASNRA T	QQRSNWPL T
I3RB43	SYWMH (117) VKG	AIRSDGSSKYYADS (13)	DGIVMDTFDY (118)	RASQSVSSSYLA (15)	DASNRA T	QQRSNWPL T
I3RB44	SYWIS (51) FQG	IIDPSDS DTRYSPS (52)	GDGSTDLDY (53)	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQSYSTPL T
I3RB47	SYAIS (33) FQG	GIIPFGTANYAQK (34)	DLFSWRYSNEFD Y	RASQSISSYLN (30)	AASSLQ S	QQSYSTPL T
		(34)	(42)		(31)	(32)

Последовательности V_H и V_L mAb, полученные путем пэннинга фагов относительно CD123

Идентификатор mAb AA	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
I3RB01	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGMWVVRQAPGKGLEWVSVIRGGSSSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHSGRFRNELDYWGQGTLLVTVSS	119	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYSTPLTFGGQGTKVEIK	164
I3RB02	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMHWVVRQAPGKGLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIETFDYWGQGTLLVTVSS	120	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGQGTKVEIK	165
I3RB03	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVVRQAPGKGLEWVSGIRYDGGSSKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKWMSYFDYWGQGTLLVTVSS	121	DIVMTQSPDLSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDFRFGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYSTPLTFGGQGTKVEIK	164
I3RB04	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYGMWVVRQAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGNWYGLGFDYWGQGTLLVTVSS	122	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPLTFGGQGTKVEIK	166
I3RB05	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMWVVRQAPGKGLEWVSGINVDGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHFLAEFDYWGQGTLLVTVSS	123	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
I3RB06	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYAISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGLFNWSNVALDYWGQGTLLVTVSS	124	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
	QGTLLVTVSS			
I3RB07	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYAISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGKRWLADAGFDYWGQGTLLVTVSS	125	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
I3RB08	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYAISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARHGFANNDYSLLDYWGQGTLLVTVSS	126	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
I3RB09	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYAISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGARWFNPPENLDYWGQGTLLVTVSS	127	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
I3RB10	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYGISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARGLLYASYLDYWGQGTLLVTVSS	128	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
I3RB11	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYGISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDLFSWRYSNFDYWGQGTLLVTVSS	129	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167
I3RB12	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGCTFSSYAISWVVRQAPGQGLEWMSGIIPFGTANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARADRVNDYLDYWGQGTLLVTVSS	130	DIQMTQSPSLSASVGRVTTITCRASQISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGQGTKVEIK	167

I3RB13	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARQSGFYVRLDYWGQ GTLVTVSS	131	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRTAG IPARFSGSGSDFTLTIS SLEPEDFAVYCCQQRSNWP LTFGQGTKVEIK	165
I3RB14	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GWISAI FGTNYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARGGFLRYNHFDYWG QGTLVTVSS	132	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB15	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARDLFLRYSFLDYWG QGTLVTVSS	133	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB16	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AIGWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARGAVWGDQWFDYWGQ GTLVTVSS	134	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB17	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARGALSLWYSFLDYWG QGTLVTVSS	135	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB18	EVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTSY WISWVRQMPGKGLEWM GIIDPDSDDTRYSPSF QGQVTISADKISISTAY LQWSSLKASDTAMYYC ARGDGGTDLDYWGQGT LVTVSS	136	EIVLTQSPGTLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ FGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSDFTLTISRLE FEDFAVYCCQDYGFPTFG QGTVEIK	168
I3RB19	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSNY AMSWVRQAPGKLEWV SGIRNGSSTYYADSV KGRFTISRDNKNTLY	137	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSIGDFLNWYQQ KPGKAPKLLIYASSLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP	169
	LQMNSLRAEDTAVYYC AKGGFIGARFPDYLDY WGQGLVTVSS		LTFGQGTKVEIK	
I3RB20	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARDDQIWGSYHLDYWG QGTLVTVSS	138	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB21	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC AREGWGQKFDYWGQ GTLVTVSS	139	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVANFLAWYQQK GQAPRLLIYAASNRTAGIPA RFSGSGSDFTLTISLEP EDFAVYCCQYFHWPYTFGQ GKVEIK	170
I3RB22	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARNLFYWADSVYLDYWG QGTLVTVSS	140	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVNKLAWYQQK GQAPRLLIYASNRTAGIPA RFSGSGSDFTLTISLEP EDFAVYCCQGDWPRTFGQ GKVEIK	171
I3RB23	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC AREGSSWKNRVPDY WGQGLVTVSS	141	EIVLTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQYFDFP LTFGQGTKVEIK	172
I3RB24	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARHTDAWGRLDYWGQ GTLVTVSS	142	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB25	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGISAI FGNANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYC ARRFKWWEYFDYWGQ GTLVTVSS	143	DIQMTQSPSSLSASVGD TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASLQSG VPSRFSGSGSDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167

I3RB26	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARNGFARVSVGNLDYW QGTLVTVSS	144	DIQMTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVNDWLAWYQKQP GQAPRLLIYGASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELEP EDFVAVYCCQSSISAPYTFGQ GTKVEIK	173
I3RB27	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARAGWNLRYGLDYWG QGTLVTVSS	145	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVAKSLAWYQQ KPGQAPRLLIYAASNRAITG IPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFVAVYCCQYFIGWPF ITFGQGTKVEIK	174
I3RB28	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARAPFTWDYRDLWYG QGTLVTVSS	146	DIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB29	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARDSRIWFSFLDYWGQ GTLVTVSS	147	DIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQSIGEWLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYCCQYYHFP LTFGQGTKVEIK	175
I3RB30	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GWIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARLVYSDFDYWGQGT LVTVSS	148	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVANWLAWYQKQP GQAPRLLIYASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELEP EDFVAVYCCQYDGPRTFGQ GTKVEIK	176
I3RB31	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGISAYFGNANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARSYFGDAYFDYWGQ TLVTVSS	149	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVKDLAWYQKQP GQAPRLLIYGASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELEP EDFVAVYCCQYDRAPITFGQ GTKVEIK	177
I3RB32	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARGAWWAYDYLWYG QGTLVTVSS	150	DIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB33	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARGYWHWNYDYLWYG QGTLVTVSS	151	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVNDWLAWYQKQP GQAPRLLIYGASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELEP EDFVAVYCCQYKRAPYTFGQ GTKVEIK	178
I3RB34	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARGWSYRDLWYGQGT LVTVSS	152	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVKWLAWYQKQP GQAPRLLIYASNRATGIPA RFGSGSGTDFTLTISSELEP EDFVAVYCCQFDRAPTFGQ GTKVEIK	179
I3RB35	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARNILFDAGFLDYWGQ GTLVTVSS	153	DIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYCCQYFSP YTFGQGTKVEIK	180
I3RB36	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARDLHVWYNSFDYWG QGTLVTVSS	154	DIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB37	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARDKTFPSRLDYWGQ GTLVTVSS	155	DIQMTQSPSSLSASVGDV ITCRASQSIATWLNWYQKQP GKAPKLLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQ EDFATYCCQYITFPLTFGQ GTKVEIK	181
I3RB38	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGGTFSSY GISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDNAVYYC ARDLMIWRNFYWG QGTLVTVSS	156	DIQMTQSPSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYCCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167

I3RB39	QVQLVQSGAEVKKPFGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYC AREYGLSDYWGQGLTV TVSS	157	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVADFLAWYQOKP GQAPRLLIYKASNRATGIPA RFGSGSGSDTFTLTSSLEP EDFAVYYCQQYNGWPWTFGQ GTKVEIK	182
I3RB40	QVQLVQSGAEVKKPFGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYC ARGQWADTWFDYWGQ GTLVTVSS	158	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVAKWLAWYQOKP GQAPRLLIYGASNRATGIPA RFGSGSGSDTFTLTSSLEP EDFAVYYCQQYHTAPWTFGQ GTKVEIK	183
I3RB41	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGTYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDVAVYYC AKVAYWEFFVYESLDY WGQGLTVTVSS	159	EIVLTQSPGTLTSLSPGERA TLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAT GIPDRFSGSGSDTFTLTI SRLEPEDFAVYYCQYGS PLTFGQGTKVEIK	166
I3RB42	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWV SAISGSGGTYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDVAVYYC AKHDWAFWIVFLDYWG QGLTVTVSS	160	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQOKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGSDTFTLTSSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIK	165
I3RB43	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSSY WMHWVRQAPGKGLEWV SAIRSDGSSKYYADSV KGRFTISRDNKNTLY LQMNLSRAEDVAVYYC AKDGI VMDTFDYWGQ GLTVTVSS	161	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSSYLAWYQOKP GQAPRLLIYDASNRATGIPA RFGSGSGSDTFTLTSSLEP EDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTKVEIK	165
I3RB44	EVQLLESGAEVKKPGE SLKISCKGSGYSFTSY WISWVRQMPGKGLEWM GIIDPDSDDTRYSFSP QGQVTSIAUKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYC ARGDGSDDLVDYWGQGT LVTVSS	162	DIQMTQSPFSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPKGAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSDTFTLTIS SLQPEDFATYYCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
I3RB47	QVQLVQSGAEVKKPFGS SVKVSCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWM GGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAY MELSSLRSEDVAVYYC ARDLFSWRYSNFDYWG QGLTVTVSS	163	DIQMTQSPFSSLSASVGDV TITCRASQSISSYLNWYQQ KPKGAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSDTFTLTIS SLQPEDFATYYCQSYSTP LTFGQGTKVEIK	167
	MELSSLRSEDVAVYYC ARDLFSWRYSNFDYWG QGLTVTVSS		LTFGQGTKVEIK	

Пример 3. Связывание клеток с hCD123 SP1, hCD123 SP2 и супоCD123 SP1 по данным анализа методом MSD.

Связывание антител к CD123 со сконструированными клетками rDisplay оценивали с помощью анализа связывания клеток MSD (Mesoscale). Целью данного скринингового анализа была идентификация антител, связывающихся с клетками, экспрессирующими hCD123 SP1 и SP2, а также перекрестной реактивности с клетками, экспрессирующими супоCD123 SP1.

Клетки иммобилизовали и фаги оценивали в трех повторах. Коротко, экспрессионные супернатанты или очищенные антитела к CD123 нормализовали к 10 мкг/мл. Высеивали по 5000 клеток в лунку 384-луночного планшета (MA6000, кат. L21XB, MSD) и оставляли для прикрепления на 2 ч. После этого клетки блокировали 20% фетальной бычьей сывороткой (FBS) в PBS (Gibco) в течение 15 мин. Затем добавляли супернатанты антител и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Клетки промывали 3 раза PBS, после чего добавляли меченные рутением вторичные антитела (Jackson Immuno Research) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем выполняли дополнительный этап промывки, после которого добавляли по 35 мкл в лунку буфера для считывания MSD Read buffer T (без поверхностно-активных веществ) и инкубировали в течение 30 мин для обнаружения. Далее выполняли сканирование прибором Sector Imager 2400 (MSD). Данные нормализовали к контрольным значениям и отображали на графике с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, версия 5. Молекулы с положительным связыванием считались хитом, если сигнал в 3 раза превышал фоновый уровень (фиг. 2А, В и С). Анализ повторяли для непротиворечивости данных, и лучше всего связывающиеся молекулы отбирали для дальнейшей разработки. Следующие хиты имели позитивное связывание со всеми тремя клеточными линиями: I3RB2, I3RB5, I3RB8, I3RB18, I3RB20, I3RB21 и I3RB35.

Пример 4. Измерение аффинности методом SPR.

Измерения аффинности методом ProteOn.

Аффинность связывания 29 потенциальных антител к CD123 с рекомбинантным человеческим CD123 SP1 ECD и CD123 SP2 ECD измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением матричной системы белковых взаимодействий ProteOn XPR36 (BioRad).

Для каждого варианта измеряли скорости ассоциации и диссоциации с CD123 SP1 ECD или CD123 SP2 ECD. Поверхность биосенсора подготовили методом ковалентного связывания козьих антител к человеческому IgG (Fc) с поверхностью чипа GLC (BioRad) согласно инструкциям производителя по про-

ведению химической реакции связывания аминов. Иммуобилизовали 8800 ОЕ (отвечающих единиц) козьих антител к человеческому IgG (Fc) (Jackson ImmunoResearch laboratories продукт № 109-005-098). Иммуобилизованные ОЕ также включали в себя козье антитело к мышинному Fc, которое было добавлено для захвата других антител, не включенных в число отмеченных в описании. Поскольку использовалась смесь 1:1, предполагается, что около 50% этих иммуобилизованных ОЕ представляли собой козьи антитела к человеческому Fc. Кинетические эксперименты проводили при 25°C в подвижном буфере (PBS pH 7,4, 0,005% P20, 3 mM EDTA). Приготовили 4-кратные (1:3) последовательные разведения человеческого CD123 SP1 ECD и CD123 SP2 ECD, начиная с концентрации 400 нМ, в подвижном буфере. В среднем на каждый канал сенсорного чипа было захвачено 300 ОЕ mAb (174-600). В качестве эталонной поверхности использовали эталонные пятна (поверхность, модифицированную козьими антителами к человеческому IgG (Fc)), не содержащие захваченного потенциального антитела. После захвата mAb проводили 3-минутную инъекцию (фаза ассоциации) раствора антигена в концентрации 40 мкл/мин, затем 10-минутную инъекцию проточного буфера (фаза диссоциации). Поверхность чипа регенерировали путем инъекции 0,85% фосфорной кислоты со скоростью 100 мкл/мин. Данные обрабатывали на программном обеспечении прибора. Проводили двойное эталонное вычитание данных, вычитая графики, полученные при инъекции буфера, из эталонных графиков, полученных при инъекциях анализируемых веществ. Кинетический анализ данных проводили, используя лэнгмюровскую модель связывания 1:1 с аппроксимацией групп. Результат для каждого mAb представлен в формате K_a (kon или скорость ассоциации), K_d (koff или скорость диссоциации), K_D (равновесная константа диссоциации) (табл. 5).

Результаты показали, что все 29 mAb связывались с CD123 SP1 ECD, но только шесть из них связывались с CD123 SP2 ECD. Для оценки воспроизводимости данных четыре антитела анализировали по меньшей мере в двух повторах. В целом результаты продемонстрировали хорошую воспроизводимость при повторах, за исключением варианта I3RB1, показавшего низкие скорости ассоциации.

Таблица 5

Оценка аффинности для хитов в фаговой панели 1 методом SPR

CD123 SP1	CD123 SP1			CD123 SP2		
	Название образца	kon (1/мс)	koff (1/с)	K_D (нМ)	kon (1/мс)	koff (1/с)
I3RB1	2,37E+0 4	5,69E- 04	24,00	1,48E+0 4	4,57E- 04	30,8
I3RB1	6,22E+0 3	1,88E- 04	30,30	3,52E+0 3	3,70E- 04	105
I3RB1	5,97E+0 4	7,82E- 05	1,31	2,67E+0 4	< 5e-5	< 1,87
I3RB1	6,06E+0 4	2,45E- 04	4,05	1,57E+0 4	1,50E- 04	9,59
I3RB2	1,06E+0 6	4,77E- 03	4,50	1,81E+0 6	3,35E- 03	1,85
I3RB5	8,91E+0 5	1,14E- 02	12,80	1,32E+0 6	6,43E- 03	4,88
I3RB5	8,61E+0 5	1,11E- 02	12,90	1,52E+0 6	6,23E- 03	4,09
I3RB6	5,14E+0	5,93E-	11,50	NBO		

	5	03				
I3RB7	9,54E+0 5	1,47E- 02	15,40	NBO		
I3RB8	5,68E+0 5	1,95E- 03	3,43	NBO		
I3RB9	6,80E+0 5	8,43E- 03	12,40	NBO		
I3RB11	8,74E+0 5	2,53E- 03	2,89	NBO		
I3RB12	8,12E+0 5	7,80E- 03	9,61	NBO		
I3RB16	4,24E+0 5	2,12E- 03	5,00	NBO		
I3RB16	3,87E+0 5	2,23E- 03	5,77	NBO		
I3RB17	5,85E+0 5	2,01E- 03	3,44	NBO		
I3RB18	1,44E+0 6	8,20E- 04	0,57	2,69E+0 6	9,78E- 04	0,363
I3RB19	2,11E+0 5	2,51E- 02	119,00	3,34E+0 5	1,61E- 02	48,3
I3RB20	6,31E+0 5	1,06E- 03	1,68	NBO		
I3RB21	5,21E+0 5	1,14E- 03	2,19	NBO		
I3RB22	2,57E+0 5	1,06E- 03	4,12	NBO		
I3RB24	1,13E+0 6	2,26E- 01	201,00	NBO		
I3RB28	5,28E+0 5	2,11E- 03	3,99	NBO		
I3RB29	2,24E+0 5	1,32E- 03	5,90	NBO		
I3RB30	7,25E+0 5	3,02E- 03	4,17	1,45E+0 5	4,80E- 02	330
I3RB32	8,68E+0 5	9,42E- 04	1,09	NBO		
I3RB33	4,17E+0 5	1,77E- 03	4,23	NBO		
I3RB34	4,97E+0 5	2,83E- 02	56,80	NBO		
I3RB35	1,04E+0 6	2,93E- 03	2,83	NBO		
I3RB36	6,75E+0 5	1,66E- 03	2,47	NBO		
I3RB37	1,07E+0 6	6,69E- 03	6,27	NBO		
I3RB37	1,21E+0 6	6,21E- 03	5,15	NBO		
I3RB38	8,88E+0 5	4,34E- 04	0,49	NBO ¹		
I3RB40	5,74E+0 5	3,46E- 03	6,02	NBO		
I3RB47	1,59E+0 5	2,12E- 03	13,40	NBO		

¹ NBO=связывание не наблюдалось.

Измерения аффинности методом Вiasore.

Аффинность нескольких антител к CD123 SP1 ECD и CD123 SP2 ECD также измерили методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) как в формате антител (Ab), так и в формате Fab, с использо-

ванием прибора Biacore. Кинетические исследования выполняли при 25°C, используя прибор Biacore 3000 (Biacore, Inc., в настоящее время входит в GE Healthcare). Специфическое козье антитело к человеческому IgG (Fc) (Jackson ImmunoResearch laboratories продукт № 109-005-098) ковалентно присоединили к двум проточным ячейкам (обычно 1 и 2) с золотыми поверхностями, покрытыми карбоксиметилдекстраном (чип CM-5, Biacore). Специфическое овечьё антитело к человеческому Fd (The Binding Site продукт № PC075) ковалентно присоединили к двум проточным ячейкам (обычно 3 и 4) с золотыми поверхностями, покрытыми карбоксиметилдекстраном (чип CM-5, Biacore). Карбоксиметильные группы декстрана активировали при помощи N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидросукцинимидом (NHS). Антитела присоединяли при pH 4,5 в 10 mM растворе ацетата натрия. Оставшиеся реакционноспособные сайты на поверхности блокировали путем реакции с этаноламином. Для кинетических измерений связывания антитела к CD123 захватывали на специфическом антителе к человеческому Fc γ , тогда как Fab захватывали на специфическом антителе к Fd, путем введения молекул этих антител к CD123 со скоростью потока 5 или 6 мкл/мин. Было захвачено около 75 ОЕ антител и около 50 ОЕ Fab соответственно. После захвата Ab и Fab выполняли инъекцию человеческого CD123 SP1 или человеческого CD123 SP2 в концентрациях от 1,6 до 400 нМ со скоростью 40 мкл/мин. Данные об ассоциации собирали в течение 2 мин, после чего в течение 10 мин собирали данные о диссоциации. Поверхность регенерировали, используя 30 мкл 100 mM H₃PO₄, 100 мкл/мин. Все пробы готовили в буферном растворе D-PBS, содержащем 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20. Приведенные данные представляют собой разность сигнала SPR между проточной ячейкой, содержащей захваченное антитело или Fab, и эталонной ячейкой, не содержащей захваченного антитела или Fab. Дополнительно погрешность, вносимую прибором в сигнал, устраняли, вычитая данные ввода холостой пробы из сигнала с вычтенным эталонным сигналом. Данные получали в трех повторах и анализировали, аппроксимируя фазы ассоциации и диссоциации при всех концентрациях (глобальная аппроксимация) моделью связывания 1:1, используя программное обеспечение BIAevaluation (Biacore, Inc.). Были проведены дублирующие эксперименты, показавшие хорошее согласование. Представленные данные являются средними.

Результаты показали, что аффинность связывания CD123 SP1 ECD и CD123 SP2 ECD с mAb (I3RB2, I3RB18, I3RB35, I3RB37) согласуется с соответствующими Fab (I3RB120, I3RB119, I3RB121, I3RB122) (табл. 6). Результаты для всех проанализированных молекул антител к CD123 также показали, что диапазон аффинности связывания Fab с CD123 SP1 ECD и CD123 SP2 ECD составляет 1,8-46,9 нМ и 0,4-12,5 нМ соответственно; а диапазон аффинности для связывания mAb составляет 1,2-52 нМ и 0,3-11,7 нМ соответственно.

Таблица 6
Аффинность и значения скорости ассоциации/диссоциации для хитов фаговой панели 1 антител к CD123, полученные методом SPR (Biacore)

Конструкт	Класс	rhCD123 SP1 K _D (нМ)	rhCD123 SP2 K _D (нМ)	rhCD123 SP1 k on средн. (M ⁻¹ s ⁻¹)	rhCD123 SP1 k off средн. (с ⁻¹)
I3RB2	MAb	7,7	1,4	4,81E+05	3,72E-03
I3RB120	Fab	8,5	1,4	3,57E+05	3,04E-03
I3RB18	MAb	1,2	0,3	6,88E+05	8,08E-04
I3RB119	Fab	1,8	0,4	4,93E+05	8,91E-04
I3RB35	MAb	4,8	ND	5,40E+05	2,58E-03
I3RB121	Fab	6,3	1,2**	3,87E+05	2,45E-03
I3RB37	Mab	9,7	ND	5,45E+05	5,30E-03
I3RB122	Fab	11,5	ND	3,93E+05	4,50E-03

** Ответ в анализе ниже ожидаемого;

ND: очевидное связывание, но сигнал за пределами критериев приемлемости; (<5 ОЕ и низкое качество данных или неправильная сенсограмма).

Пример 5. Конкуренция с 7G3.

Конкурентный анализ связывания с CD123 методом ELISA.

Провели скрининг панели антител к CD123 в конкурентном анализе связывания 7G3 методом ELISA. 7G3 представляет собой нейтрализующее моноклональное антитело, эпитоп которого локализован в первых 50 аминокислотах антигена CD123 SP1 (US 6177078 B1). Моноклональное антитело 7G3

было приобретено в BD Biosciences Pharmingen (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США, кат. № 554526) и помечено NHS-эфиром MSD Sulfo-Tag™ согласно инструкциям производителя (Meso Scale Discovery).

Для анализа конкурентного связывания с CD123 методом ELISA в 96-луночные прозрачные планшеты Maxisorb наносили по 100 мкл/лунка 2 мкг/мл раствора антител к 6х гистидину (R&D Systems кат. № MAB050) в бикарбонатном буфере, pH 9,4 (Pierce № 28382) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Далее планшеты трижды промывали промывочным буфером для ELISA (PBS, 0,01% твин-20) и блокировали 300 мкл/лунка раствора StartingBlock, содержащего твин-20, PBST (Thermo Scientific № 37539). Во все лунки вносили 1 нг рекомбинантного huCD123 ECD SP1, и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Несвязанный huCD123 ECD SP1 отмывали промывочным буфером для ELISA. Готовили раствор 7G3 или IgG2A (mIgG2A) в среде для экспрессии (Freestyle™ Expression media, Gibco № 12338-018) в концентрации 20 мкг/мл и добавляли в двух повторах в планшет в соответствующие лунки по 50 мкл/лунка, а исследуемые mAb к CD123 добавляли в оставшиеся лунки по 50 мкл/лунка в концентрации 2 мкг/мл или без разведения и планшеты инкубировали в течение 1 ч комнатной температуре при умеренном встряхивании. Затем добавляли биотинилированные 7G3 в конечной концентрации 100 нг/мл во все лунки, и планшеты инкубировали еще 1 ч. После этого планшеты промывали трехкратно промывочным буфером для ELISA, и связавшиеся биотинилированные 7G3 обнаруживали с использованием конъюгата SA-HRP при оптической плотности 450 нм.

mAb к CD123, ингибирующие связывание 7G3:CD123, определялись при уровне ингибирования активности 20%. Таким образом, антитело считалось ингибитором, если оно было способно ингибировать связывание биотинилированного 7G3 с человеческим CD123 ECD по меньшей мере на 20%. На основании этого критерия отбора были выявлены три ингибитора: 13RB18, 13RB34 и 13RB44 (фиг. 3).

Пример 6. Функциональный анализ по pSTAT5.

Для оценки агонистической или антагонистической активности антител провели скрининг панели в клеточном анализе индуцированного IL-3-фосфорилирования STAT5 с использованием клеток TF-1 (где закуплены). Присутствие ингибиторных mAb к CD123 приводило к снижению фосфорилирования STAT5 при стимуляции rhIL-3. Для функционального анализа по STAT5 использовали 20% критерий ингибирования (20% ингибирование активности rhIL-3).

Высевали приблизительно по 50000 клеток TF-1 (человеческий эритролейкоз) в каждую лунку 96-луночного планшета в 60 мкл среды RPMI, содержащей 10% FBS, и инкубировали при 37°C в термостате с подачей 5% CO₂ в течение ночи. Все образцы готовили в среде для экспрессии (FreeStyle™ Expression media, Gibco № 12338-018). Для получения контрольных образцов вводили по 70 мкл/лунка раствора 20 мкг/мл либо 7G3, либо изотипического контроля mIgG2A. В оставшиеся лунки вводили по 70 мкл/лунка образцов mAb к человеческому CD123 в концентрации 2 мкг/мл или неразведенного. Все образцы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в термостате с подачей 5% CO₂. После этого к клеткам добавляли рекомбинантный человеческий IL-3 rhIL-3 (PeproTech кат. № 200-03) в конечной концентрации 10 нг/мл в среде RPMI, содержащей 10% FBS, за исключением клеток с обработкой холостым раствором, 7G3 или изотипическим контролем. Далее образцы инкубировали еще 15 мин при 37°C в термостате с подачей 5% CO₂. Клетки лизировали, добавляя 46,7 мкл ледяного полного лизирующего буфера в каждую лунку, и образцы инкубировали на льду в течение 30 мин. Лизаты перемешивали путем пипетирования вверх-вниз 10 раз. Далее определяли фосфорилированный STAT5 (pSTAT5a,b), используя набор Phospho(Tyr694)/Total STAT5a,b производства Meso Scale Discovery (MSD № K15163D-2) и согласно инструкциям производителя.

mAb к CD123, ингибирующие фосфорилирование STAT5 при помощи rhIL-3, определялись при 20% уровне ингибирования активности. Таким образом, антитело считалось ингибитором, если оно было способно ингибировать фосфорилирование STAT5 при помощи rhIL-3 по меньшей мере на 20%.

Пять mAb продемонстрировали способность блокировать индуцированную IL-3 стимуляцию STAT5 (фиг. 4A). К этим пяти антителам относились 13RB18, а также 13RB19, 13RB30, 13RB34 и 13RB44. Однако при тестировании концентрации 1 мкг/мл только одно антитело, 13RB18, блокировало индуцированную IL-3 стимуляцию фосфорилирования STAT5 в клетках TF-1 (фиг. 4B). Более того, 13RB18 (B18) продемонстрировало в этом анализе дозозависимую зависимость (фиг. 4C). На основании этих данных был сделан вывод, что 13RB18 является единственным антагонистическим антителом.

Пример 7. Подтверждение одновалентной аффинности hCD123.

Связывание Fab из двух хитов антител к CD123 (I3RB120 (I3RB2 Fab), I3RB119 (I3RB18 Fab), с экспрессированными на клеточной поверхности молекулами CD123 SP1 человека или яванского макака анализировали в двух повторах методом MSD-Cell Affinity Technology с получением показателя одновалентного связывания с экспрессированным на клеточной поверхности CD123.

Одновалентные аффинности выбранных лидеров антител к CD123 к экспрессированным на клеточной поверхности hCD123 или супоCD123 получали с использованием методики MSD-Cell Affinity Technique (MSD-CAT). MSD-CAT был разработан как собственный метод без использования меток, предназначенный для определения аффинности на интактных клетках в формате, обеспечивающем высокую производительность. Эти эксперименты выполняли для оценки аффинности и специфичности связыва-

ния потенциальных антител к CD123 с экспрессированными на клеточной поверхности молекулами CD123 SP1 человека или яванского макака (супо). Этот анализ позволил сравнить аффинности потенциальных антител к CD123 с антигеном человека или яванского макака в отсутствие рекомбинантного растворимого супоCD123. Использовались клеточные линии pDisplay CD123 SP1 человека и pDisplay CD123 SP1 яванского макака. Чтобы измерить аффинность этих взаимодействий с использованием метода MSD-CAT, приготовили серию смесей с фиксированной концентрацией антител к CD123 (1000, 200, 40 и/или 8 пМ) и различными концентрациями клеток ($1,5 \times 10^7$ - $0,762 \times 10^7$ клеток/мл) и дали им достичь равновесия путем вращательного перемешивания планшетов в течение 24 ч при 4°C. Эти образцы были приготовлены в среде DMEM Glutamax, содержащей 0,05% азида, 1% BSA и 3 мМ EDTA. Количества рецепторов, составлявшие $(3,15-4,18) \times 10^6$ hCD123/клетка и $(4,78-9,24) \times 10^6$ супоCD123/клетка, конвертировали в молярную концентрацию рецепторов в смеси, основываясь на объеме реакционной смеси, плотности клеток (клеток/л) и числе Авогадро. В результате получили диапазон концентраций от 104 нМ до 5,3 пМ для человеческого CD123 и от 12 нМ до 0,6 пМ для CD123 яванского макака. После доведения до равновесия планшет центрифугировали в течение 5 мин при ~1000 об/мин и определяли в супернатанте свободные антитела к CD3. Свободные антитела к CD123 в смеси определяли по электрохемилюминесценции (ECL) с использованием сканера Mesoscale Discovery (MSD). Для определения антител к CD123 в доведенной до равновесия смеси методом электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ECL) были приготовлены планшеты для обнаружения. Чтобы приготовить планшеты для обнаружения (антиген, связанный с планшетами SA-MSD), стандартные планшеты MSD со стрептавидином блокировали буфером для анализа по 50 мкл/лунка (PBS, (Life Sciences GIBCO 14190-136), 0,05% твин 20, 0,2% BSA) в течение 5 мин. Буфер для анализа удаляли без промывки и в планшеты MSD добавляли по 50 мкл/лунка 0,7 мкг/мл биотинилированного антигена в буфере для анализа и инкубировали в течение ночи (~16 ч при 4°C). После инкубации в течение ночи планшеты блокировали, добавляя по 150 мкл/лунка буфера для анализа без удаления покрывающего антигена, инкубировали в течение ~1 ч при температуре окружающей среды и промывали 5 раз промывочным буфером (буфер для анализа без BSA). Из планшета с образцами переносили по 50 мкл/лунка супернатантов в покрытые антигеном планшеты, инкубировали в течение 60 мин, а затем трижды промывали промывочным буфером. После этого добавляли по 50 мкл на лунку меченных рутением детектирующих антител (к человеческим H+L) и инкубировали в течение 1 ч. Через 1 ч планшеты промывали и добавляли по 150 мкл на лунку буфера для считывания MSD Read Buffer (приготовлен путем разведения 1:4 маточного раствора в дист. H₂O). После этого планшеты сразу же сканировали на сканере MSD Sector Imager 6000, определяя уровни люминесценции. Сигнал ECL, определенный сканером MSD, выражали в % свободного антитела в смеси и данные анализировали для определения аффинности с применением пользовательского уравнения (выведенного на основании закона действующих масс), введенного в программное обеспечение Prism. Данные показывают, что I3RB18 и его Fab-фрагмент (I3RB119) лучше всего связываются с экспрессированными на поверхности CD123 SP1 с пиколярной аффинностью (или кажущейся аффинностью в случае mAb), но > в 10 раз слабее связываются с CD123 SP1 яванского макака. В случае I3RB18 и его Fab-фрагмента (I3RB119) было невозможно получить значение аффинности для mAb или Fab в отношении клеток, экспрессирующих супоSP1. Все, что можно сказать, это что аффинность была >12 нМ. Однако, хотя I3RB120 связывается с наномолярной аффинностью с обоими антигенами, он связывается с равной или <5-кратной аффинностью с CD123 SP1 человека и яванского макака. Аффинности, полученные методом SPR для hCD123 SP1, являются более слабыми, чем наблюдаемые на клетках. Эта разница наиболее вероятно обусловлена презентированием антигена на клеточной поверхности и местоположением эпитопа антитела. Результаты приведены в табл. 7.

Таблица 7

Значения аффинности Fab-фрагментов к клеткам с CD123, полученные методом MSD-CAT

	Клетки hCD123	Клетки hCD123	Клетки супоCD123	Клетки супоCD123
	K _D (анализ-1)	K _D (анализ-2)	K _D (анализ-1)	K _D (анализ-2)
Fab I3RB119	293 пМ	367 пМ	> 15 нМ ^a	> 11,9 нМ ^a
Fab I3RB120	~ 3,37 пМ 3,44 нМ ^b	~ 3,84 нМ 3,81 нМ ^b	2,4 нМ	> 11,9 нМ ^a
mAb I3RB18	55 ^c пМ	343 ^c пМ	832 ^c пМ	> 11,9 ^c нМ ^a
mAb 7G3	-	154 пМ	-	57 пМ

^a Это значение K_D больше, чем указанное, но определить реальное значение не представляется возможным.

^b При этой аппроксимации параметр, именуемый V₀, был ограничен, чтобы получить точное значение вместо приблизительного. Алгоритм аппроксимации иногда дает аппроксимацию, когда в кривой присутствует вариабельность.

^c Это кажущееся значение K_D, поскольку на него может влиять avidность, обусловленная двухвалентным связыванием.

Измеренная аффинность I3RB2 Fab согласуется с данными по mAb, полученными с использованием Proteon. Кроме того, имеется хорошее связывание данного Fab с клетками супоCD123, и это четко показывает, что I3RB2 является перекрестно-реагирующим хитом. Оценка mAb I3RB18 и соответствующего ему Fab-фрагмента (I3RB119) показывает, что полученные при помощи Proteon аффинности к рекомбинантному CD123 SP1 слабее, чем наблюдаемые на клетках; 1 нМ для рекомбинантного белка в сравнении с 55-300 пМ для клеток. Эта разница наиболее вероятно обусловлена презентированием антигена на клеточной поверхности и местоположением эпитопа антитела. Было невозможно получить значение аффинности ни для mAb, ни для Fab (аффинность >12 нМ). Это может означать, что в одновалентной форме антитело не является перекрестно-реагирующим. Предыдущие данные о связывании с клетками показали перекрестную реактивность, которая, скорее всего, была обусловлена двухвалентным связыванием с клеточной поверхностью.

Пример 8. Эндogenous связывание с клетками.

Для подтверждения измеряли связывание I3RB2 и I3RB18 с эндогенным CD123 на клетках AML. Клетки OCI-AML5 (DSMZ), которые экспрессируют приблизительно 75000 копий CD123 на клеточной поверхности, использовали в анализе дозозависимого клеточного связывания MSD. Связывание антител к CD123 с клетками AML оценивали с помощью анализа на связывание клеток MSD (Mesoscale). Коротко, экспрессионные супернатанты или очищенные антитела к CD123 использовали в диапазоне концентраций от 40 до 0,039 мкг/мл. Клетки высевали по 50000 в лунку 96-луночного планшета (Mesoscale high bind plate) и оставляли прикрепляться на 2 ч. Далее клетки блокировали 20% FBS в PBS с добавлением Fc-блокатора (Fc-блокатор представляет собой очищенный Fc-фрагмент расщепленного папаином антитела (SEQ ID NO: 209)) в течение 15 мин. Затем добавляли супернатанты антител и оставляли при комнатной температуре на 1 ч. Клетки промывали 3 раза PBS, после чего добавляли меченные рутением вторичные антитела (Jackson Immuno Research) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем выполняли дополнительный этап промывки, после которого добавляли по 150 мкл в лунку буфера для считывания MSD Read buffer T (без поверхностно-активных веществ) и инкубировали в течение 30 мин для обнаружения. Далее выполняли сканирование прибором Sector Imager 2400 (MSD). Данные нормализовали к контрольным значениям и отображали на графике с использованием программного обеспечения GraphPad Prism, версия 5.

Результаты показали, что I3RB2 и I3RB18 связываются с эндогенным CD123, экспрессированным на клетках OCI-AML5, дозозависимым способом (фиг. 5 А и В). Для сравнения в это исследование также включали положительный контроль, mAb 7G3 (фиг. 5С).

Пример 9. Конкурентный анализ связывания mAb к CD123 с I3RB2 и I3RB18.

Провели анализ на конкуренцию I3RB2 и I3RB18 относительно других перекрестно-реагирующих хитов к CD123 SP1/SP2 и контрольных антител 7G3 для определения конкурентных групп антител к CD123 или "эпитопных корзин".

При конкурентном ELISA 5 мкл очищенного человеческого белка CD123 ECD (20 мкг/мл), синтезированного в соответствии с описанием, приведенным в примере 1, вносили как покрытие в лунки планшета MSD HighBind (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) и выдерживали 2 ч при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли 150 мкл аликвоты 5% блокирующего буфера А MSD (Meso Scale Discovery) и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Планшеты трижды промывали буфером 0,1М HEPES, pH 7,4, затем добавляли смесь меченых mAb к CD123 с разными конкурирующими агентами mAb к CD123. Меченые антитела (20 нМ) инкубировали с 2 мкМ немеченых антител к CD123, затем смесь вносили в обозначенные лунки в объеме 25 мкл. После 2 ч инкубации с осторожным встряхиванием при комнатной температуре планшеты 3 раза промывали буфером 0,1М HEPES (pH 7,4). Буфер считывания MSD Read Buffer T разбавляли дистиллированной водой (4-кратно), разливали в объеме по 150 мкл/лунка и анализировали с помощью SECTOR Imager 6000.

Антитела метили эфиром MSD Sulfo-Tag™ NHS согласно инструкции производителя (Meso Scale Discovery).

Результаты конкурентного ELISA показывают, что I3RB2 конкурирует с I3RB60, I3RB70, I3RB79 и I3RB118, но не конкурирует с другими антителами, включая I3RB18 (фиг. 6А). Следует отметить, что когда молекула I3RB2 была меченной, наблюдалась конкуренция с I3RB60; однако когда меченной была молекула I3RB60, конкуренция не наблюдалась. Одной возможной причиной этого являются некоторые неспецифические связывающие взаимодействия. При оценке I3RB18 было обнаружено, что эта молекула конкурирует с I3RB49 и I3RB55, но не с I3RB2 (фиг. 6В).

Анализ конкурентного связывания выявил две конкурентные группы среди перекрестно-реагирующих антител к CD123 SP1/SP2 (табл. 8). Моноклональное антитело I3RB2 не конкурирует с I3RB18, и они принадлежат к разным эпитопным группам. Группа 1 (окрашена в темно-серый цвет) включает mAb I3RB2, I3RB60, I3RB70, I3RB79 и I3R118. Группа 2 (окрашена в светло-серый цвет) состоит из антител I3RB18, I3RB49 и I3RB55. Коммерческие mAb 7G3 не конкурируют ни с одними из разработанных антител к CD123.

Результаты по конкурентному связыванию меченных рутением I3RB2 и I3RB18, и антител к CD123

Конкурент	Ru-меченное антитело						
	I3RB2	I3RB70	I3RB79	I3RB18	I3RB55	I3RB60	7G3
I3RB2	+	+	+	-	-	-	-
I3RB60	+	+	+	-	±	+	-
I3RB70	+	+	+	-	±	-	-
I3RB79	+	+	+	-	±	-	-
I3RB118 (B102)	+	+	+	-	-	-	-
I3RB18	-	-	-	+	±	-	-
I3RB49	-	-	-	+	+	-	-
I3RB55	-	-	-	+	+	-	-
7G3	-	-	-	-	-	-	+

Пример 10. Картирование эпитопов I3RB2 и I3RB18.

Исследования с заменой H/D.

Для идентификации эпитопов для I3RB2 и I3RB18 на человеческом CD123 была выполнена водород/дейтерийобменная масс-спектрометрия (HDX-MS) с использованием соответствующих Fab. При замене H/D процедуры, используемые для анализа возмущения Fab-фрагментами, были аналогичны описанным ранее (Namigo et al., J. Biomol. Techniques 14:171-182, 2003; Horn, J.R., et al., Biochemistry, 45: 8488-8498, 2006) с некоторыми модификациями. Для этих исследований использовали антиген CD123 SP2 ECD, поскольку этот антиген менее сложен, чем молекула SP1, из-за меньшего количества участков гликозилирования.

Рекомбинантный CD123 SP2 ECD (SEQ ID NO: 226) инкубировали в растворе на основе дейтерированной воды в течение указанного периода времени, при этом в него внедрялся дейтерий, заменяющий атомы водорода. Дейтерированный CD123 SP2 ECD находился в комплексе либо с I3RB119 (Fab-фрагмент из I3RB18), либо I3RB120 (Fab-фрагмент из I3RB2) в 43 мкл оксида дейтерия (D₂O) при 4°C в течение 30 с, 2 мин, 10 мин и 60 мин. Реакцию обмена гасили при помощи низкого pH, и белки расщепляли пепсином. Уровни дейтерия в выявленных пептидах отслеживали по сдвигу масс на ЖХ-МС. В качестве эталонного контроля использовали образец CD123 SP2 ECD, обрабатываемый сходным образом, за исключением того, что он не находился в комплексе с молекулами Fab. Областями, связанными с Fab, считались те, в которых замена дейтерия на водород происходила в минимальной степени, и, таким образом, в них содержалось больше дейтерия, чем в эталонном образце CD123 SP2 ECD. Около 94% белка можно было картировать относительно специфических пептидов.

Решения карты возмущений HDX-MS для CD123 ECD SP2 в комплексе с I3RB119 и I3RB120 представлены на фиг. 7A и 7B соответственно. Один сегмент, остатки 176-184 (RARERVYEF (SEQ ID NO: 227)), соответствующие аминокислотным остаткам 195-202 CD123 sp2, хорошо защищен при помощи I3RB119. Две другие области, остатки 145-156 (IQKRMQPVITEQ (SEQ ID NO: 228)) и остатки 165-170 (LLNPGT (SEQ ID NO: 229)), соответствующие остаткам 164-175 и остаткам 184-189 CD123 sp2, соответственно, распознавались I3RB120. Эти результаты HDX-MS указывают на пептидном уровне на эпитопы I3RB119 и I3RB120. У этих двух антител не было перекрывающихся эпитопных областей.

Эти результаты согласуются с предыдущими данными по конкурентному связыванию об отсутствии конкуренции между I3RB2 и I3RB18.

Пример 11. Картирование эпитопов антитела к CD123 I3RB18 по кристаллической структуре.

Эпитоп связывания антитела I3RB18 определяли методом рентгенокристаллографии.

Получали одноцепочечный Fv-фрагмент моноклонального антитела к CD123 I3RB18 в следующей форме: VL-(Gly4Ser)4-VH-Gly-His6 (SEQ ID NO: 230). Его экспрессировали в клетках HEK293 Expi и очищали аффинной (HisTrap) и ионообменной (Source 15S и Mono S) хроматографией.

Изоформу sp2 человеческого CD123 ECD (SEQ ID NO: 231) с C-концевой SxHis-меткой экспрессировали в инфицированных бакуловирусом клетках насекомых и очищали аффинной (HisTrap) и эксклюзионной (Superdex 75) хроматографией.

Комплекс CD123:I3RB18 scFv получали, смешивая 1,8 мг CD123 (1,1 мг/мл) с 2,4 мг одноцепочечного Fv (scFv) (1,6 мг/мл) с приблизительным молярным соотношением 1:1,2 (избыток scFv) и инкубировали в течение ночи при 4°C. Образование небольшого количества (150 мкг) SEC указывало на формирование комплекса. Этот белок концентрировали до 18 мг/мл в 20 мМ HEPES, pH 7,5; 100 мМ NaCl.

Кристаллизацию проводили методом диффузии паров при 20°C в формате сидячей капли на 2-луночных планшетах MRC для кристаллизации (Swissci). Кристаллы комплекса, подходящие для рентгеновского эксперимента, получали при следующих условиях: 2,0M (NH₄)₂SO₄, 0,1M буфер MES, pH 6,5. Данные кристаллографии приводятся в табл. 9. Один кристалл был перенесен в маточный раствор с добавлением 24% глицерина, заморожен в жидком азоте и использован для получения данных рентгеновской дифракции. Структуру определяли с разрешением 3,5 Å.

Параметры кристалла, данные рентгенографического анализа и статистика оптимизации

Параметры кристалла.		
Пространственная группа	P4 ₁ 2 ₁ 2	
Оси элементарной ячейки (Å)	111, 32, 111, 32, 192, 19	
Молекулы/асимм. ячейка	2	
V _m (Å ³ /Да)	2, 86	
Содержание растворителя (%)	57	
Данные рентгеноструктурного анализа.		
Разрешение (Å)	50–	(3, 70–3, 56)
	3, 56	
Число измеряемых отражений	136	(5 853)
	381	
Число уникальных отражений	13 977	(929)
Полнота (%)	93, 4	(64, 2)
Избыток	9, 8	(6, 3)
R-объединение	0, 195	(0, 490)
<I/σ>	10, 8	(2, 3)
В-фактор (Уилсон) (Å ²)	66, 1	
Оптимизация.		
Разрешение (Å)	20–	
	3, 56	
Число отражений, использованных при оптимизации	13 128	
Полнота (%)	92, 1	
Число всех атомов	6568	
Число молекул воды	0	
R-фактор (%)	23, 1	
R-свободные (%) (данные 5%)	32, 3	
RMSD длин связей (Å)	0, 005	
RMSD углов связей (°)	1, 1	
Средний В-фактор (Å ²)	120, 3	

В скобках показаны значения для оболочки с наивысшим разрешением.

I3RB18 связывается с CD123 sp2 на C-концевом (ближнем к клеточной поверхности) домене ECD.

Эпитоп является

конформационным и включает три сегмента цепи CD123 sp2, остатки 156-161 (RKFRYE (SEQ ID NO: 232)), 173-178 (TEQVRD (SEQ ID NO: 233)) и 195-202 (RARERVYE (SEQ ID NO: 234)), соответствующие остаткам 234-239, 251-256 и 273-280 из CD123 sp1. Взаимодействия антитело-антиген являются преимущественно электростатическими. Эпитоп на CD123 sp2 содержит большое количество основных остатков, тогда как CDR-области I3RB18 населены кислотными остатками. Остатки антител, вовлеченные в связывание с CD123, включают в себя 7 остатков из легкой цепи и 9 остатков из тяжелой цепи (фиг. 8). В связывании участвуют все CDR, кроме LCDR2.

Связывание I3RB18 с CD123 sp2 (фиг. 9A) отличается от другого антитела к CD123, 7G3, которое связывается с N-концевым доменом 1 в CD123 sp1 ECD, как показывают данные кристаллической структуры гуманизированного 7G3 Fab, CSL362, в комплексе с CD123 sp1 (фиг. 9B) (pdb:4JZJBroughton et al. Cell Rep. 2014; 8:410-419).

Пример 11. Кристаллическая структура Fab-фрагмента антитела к CD3.

Кристаллическую структуру SP34 Fab определяли с разрешением 2,1 Å. Была выявлена полная аминокислотная последовательность и выявлены возможные мышинные зародышевые линии, из которых получен mAb SP34.

Материалы.

Моноклональное антитело SP34, мышинный изотип IgG3/λ, приобретенное в BD Biosciences Pharmingen (г. Сан-Диего, штат Калифорния, США), кат. № 556611. Согласно данным спецификации они были очищены из супернатанта тканевой культуры аффинной хроматографией и хранились при 4°C. Fab-фрагмент был получен путем папаинового расщепления mAb (Pierce, кат. № 44985, Thermofisher) и отделен от Fc с использованием колонки Nab Protein A Plus Spin (Pierce, кат. № 44985, Thermofisher) согласно протоколу производителя. Fab дополнительно очищали на колонке MonoS HR (GE Healthcare), уравновешенной в 20 mM MES, pH 6,5 (буфер А). Элюирование проводили буфером А в градиенте 13-28% 1M NaCl в 50 объемах колонки. Фракции, соответствующие основному пику, объединяли, концентрировали до 9,2 мг/мл и использовали для кристаллизации.

Кристаллизация.

Кристаллизацию проводили методом диффузии паров при 20°C в формате сидячей капли на 96-

луночных планшетах Corning 3550. Кристалл Fab, использованный для рентгенокристаллографического анализа, был получен из 12% PEG 3350, 0,2М тартрата K/Na (pH 7,4), 3% изопропанола и 3% диоксана. Данные кристаллографии приводятся в табл. 10.

Таблица 10

Параметры кристалла, данные рентгенографического анализа и статистика оптимизации

Параметры кристалла.		
Пространственная группа	P21	
Оси элементарной ячейки (Å)		
	55,14, 141,23, 61,29	
Углы элементарной ячейки (°)		
	90, 99,02, 90	
Молекулы/асимм. ячейка	2	
V_m (Å ³ /Да)	2,48	
Содержание растворителя (%)	50	
Данные рентгеноструктурного анализа.		
Разрешение (Å)	30-2,1	(2,15-2,10) *
Число измеряемых отражений	179 420	(11 506)
Число уникальных отражений	53 483	(3 667)
Полнота (%)	98,9	(92,5)
Избыток	3,4	(3,1)
R-объединение	0,038	(0,393)
$\langle I/\sigma \rangle$	18,7	(3,8)
В-фактор (Уилсон) (Å ²)	45,4	
Оптимизация.		
Разрешение (Å)	15-2,1	
Число отражений, использованных при оптимизации	52 212	
Полнота (%)	96,8	
Число всех атомов	6 886	
Без молекул воды	219	
R-фактор (%)	20,5	
R-свободные (%)	26,2	
RMSD длин связей (Å)		0,008
RMSD углов связей (°)		1,2
RMSD В-фактора основной цепи (Å ²)		2,7
Средний В-фактор (Å ²)	53,7	

* Числа в скобках относятся к оболочке с наивысшим разрешением.

Регистрация данных рентгеновской кристаллографии и определение структуры.

Для сбора данных рентгена один кристалл замачивали на несколько секунд в маточном растворе с добавлением 20% глицерина и мгновенно замораживали в жидком азоте. Данные по дифракции получали в Advanced Photon Source (Argonne, Иллинойс, США), канал излучения IMCA, с использованием детектора Pilatus CCD. Статистика данных рентгенографического анализа представлена в табл. 10.

Структуру разрешали с использованием молекулярной замены с применением модели Fab, созданной по мышинному антителу к антигену Томсона-Фриденрайха Jaa-F11 (PDB 3gnm), относящегося к типу IgG3/κ. Все кристаллографические расчеты проводили с использованием пакета CCP4 программ [CCP4. 1994, Acta Crystallogr. D50:760-763]. Коррекцию модели осуществляли с помощью программы

COOT [Emsley P., and Cowtan K. 2004. Acta Crystallogr. D60:2126-2132]. Данные по оптимизации приведены в табл. 10.

Последовательность SP34 показана на фиг. 10, причем остатки 1-215 легкой цепи и остатки 1-230 тяжелой цепи получены непосредственно из карты электронных плотностей, а остатки 231-455 получены из IGHG3_MOUSE (мышинный IgG3, изоформа 2).

Пример 12. Адаптация к человеческому каркасу антитела SP34 к CD3.

Мышиное антитело SP34 к человеческому CD3 было гуманизировано способом адаптации к человеческому каркасу (Fransson, et al., JMB, 2010 398 (2):214-31). Четыре разные тяжелые цепи комбинировали с тремя разными легкими цепями, получив 12 гуманизированных вариантов.

Гуманизация SP34 и созревание аффинности.

Выбор человеческих зародышевых линий.

Для исследования выбрали матрицу из человеческих последовательностей переменных участков четырех тяжелых и трех легких цепей. Выбор человеческих последовательностей основывался исключительно на общем сходстве последовательностей с SP34 в каркасной области (FR). При отборе не учитывались ни последовательности CDR, ни их канонические структуры.

Самыми близкими совпадениями для тяжелой цепи были человеческие зародышевые линии IGHV3-72 и IGHV3-73. Другая зародышевая линия, IGHV3-23, была выбрана из-за высокой частоты встречаемости в репертуаре человеческих В-клеток.

Самыми близкими совпадениями для легкой цепи были человеческие зародышевые линии IGLV7-43 (также известна как 7a), IGLV7-46 (также известна как 7b) и IGLV1-51 (также известна как 1b). IGLV7-46 является практически идентичной IGLV7-43, но имеет благоприятный признак присутствия Ala в положении 2, т.е. как в SP34.

В качестве J-областей были выбраны следующие: IGHJ1 для тяжелой цепи; IGLJ3 для легкой цепи лямбда.

Обратные мутации.

Чтобы сохранить конформацию CDR-H3, необходимо было сохранить остатки в нескольких каркасных областях в VL, наиболее существенными из которых являются Val38, Gly48 и Gly51 (фиг. 11). Эти "обратные мутации" были добавлены в план гуманизации.

Остаток Asp в положении 57 тяжелой цепи в этой структуре не имеет хорошей плотности боковой цепи. Также он находится в середине CDR-H2 и направлен от типичного сайта связывания. На основании этого анализа, он может не вносить существенного вклада в связывание. Кроме этого, такая геометрия каркаса находится в области, наиболее благоприятной для остатка Gly на графике Рамачадрана. Следовательно, в плане созревания он был обрезан до Gly, чтобы обеспечить необходимую гибкость и потенциально повысить стабильность (путем снижения связанного с неглициновым остатком локального структурного напряжения) без влияния на связывание.

При разработке плана гуманизации присутствовали еще несколько соображений. Во-первых, в человеческих зародышевых линиях IGLV7-46 и IGLV7-43 вводится остаток Trp в положении 59 с нежелательным окислительным потенциалом. В двух других зародышевых линиях в этом положении находится Gly, что соответствует мышинной последовательности. Следовательно, в обоих вариантах IGLV7-46 и IGLV7-43 сохранили Gly59. Наконец, Ala в положении 49 в VH может быть важным. Также на связывание с антигеном может влиять остаток в положении 99 (Val в SP34). Для проверки этих положений в некоторых вариантах были введены обратные мутации (фиг. 12).

Матрица HFA.

Матрица адаптации для человеческого каркаса (HFA) (табл. 11) состоит из четырех вариантов VH и трех вариантов VL (фиг. 12). Для целей HFA используется определение CDR от AbM (K.R. Abhinandan and A.C. Martin, 2008. Mol. Immunol. 45, 3832-3839).

Варианты VH:

CD3H141 (SEQ ID NO: 184): IGHV3-72*01 с **МЫШИНЫМИ**
CDR+Gly49Ala

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA
TYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV
SS

CD3H142 (SEQ ID NO: 185): IGHV3-23*01 с **МЫШИНЫМИ**
CDR+Ser49Ala

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV
SS

CD3H143 (SEQ ID NO: 186): IGHV3-23*01 с **МЫШИНЫМИ**
CDR+Ser49Ala, Ala99Val

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYA
TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV
SS

CD3H144 (SEQ ID NO: 187): IGHV3-73*01 с **МЫШИНЫМИ**
CDR+Asn57Gly

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQASGKGLEWVGRIRSKYNGYA
TYYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWGQGLTVTV
SS

Варианты VL:

CD3L63 (SEQ ID NO: 188): IGLV7-46*01 с **МЫШИНЫМИ** CDR+F38V,
A48G, Y51G, W59G

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPG
TPARFSGSLLGGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

CD3L64 (SEQ ID NO: 189): IGLV1-51*01 с **МЫШИНЫМИ** CDR+Y38V,
L48G, Y51G

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCRSSTGAVTTSNYANWVQQLPGTAPKGLIGGTNKRAPG
IPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

CD3L66 (SEQ ID NO: 190): IGLV7-43*01 с **МЫШИНЫМИ** CDR+F38V,
A48G, Y51G, W59G

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPG
TPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

Матрица тяжелых и легких цепей для CD3 (все были получены с использованием IgG1-AA Fc, содержащего L234A, L235A и F405L)

	CD3L63 (LV7-46/W59G) SEQ ID NO. 188	CD3L64 (LV1-51) SEQ ID NO: 189	CD3L66 (LV7-43/W59G) SEQ ID NO: 190
CD3H141 (HV3-72+G49A) SEQ ID NO: 184	CD3B143	CD3B144	CD3B146
CD3H142 (HV3-23+S49A) SEQ ID NO: 185	CD3B147	CD3B148	CD3B150
CD3H143 (HV3-23 +S49A, A99V) SEQ ID NO: 186	CD3B151	CD3B152	CD3B154
CD3H144 (VH3-73 с G49) SEQ ID NO: 187	CD3B155	CD3B156	CD3B158

Аминокислотные последовательности подвергли обратной транскрипции в ДНК, и методами генного синтеза получили кДНК (патент США № 6670127; патент США № 6521427). Варибельные области тяжелых цепей (HC) субклонировали на человеческий IgG1-AA Fc, содержащий мутации L234A, L235A и F405L, с применением экспрессионного вектора собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии. Варибельные области легких цепей (LC) субклонировали на человеческие константные области лямбда (λ) с применением экспрессионного вектора собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии. Полученные плазмиды трансфицировали в клетки Expi293F (Invitrogen) и выполняли экспрессию mAb. Очистку выполняли стандартными способами на колонке с белком А (колонка hiTrap MAbSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2. Последовательности VH и VL антител показаны в табл. 12.

Таблица 12

Последовательности VH и VL антител к CD3

mAb	HC	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	LC	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO:
CD3B143	CD3H141	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYC ARHGNGFGNSYVSWF AYWGQGLTVTVSS	184	CD3L63	QAVVTQEPSTLVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKPK GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGAQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	188
CD3B144	CD3H141	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYC ARHGNGFGNSYVSWF AYWGQGLTVTVSS	184	CD3L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGA VTTSNYANWVQQLP GTAPKGLIGGTNKR APGIPDRFSGSKSG TSATLGLTGLTGD EADYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	189
CD3B146	CD3H141	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYAASVKGRF TISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYC ARHGNGFGNSYVSWF AYWGQGLTVTVSS	184	CD3L66	QTVVTQEPSTLVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKPK GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGSGVQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	190
CD3B148	CD3H142	EVQLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC AKHGNGFGNSYVSWF AYWGQGLTVTVSS	185	CD3L63	QAVVTQEPSTLVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKPK GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGAQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	188

CD3B14 8	CD3H 142	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC AKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	185	CD3 L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGA VTTSNYANWVQQLP GTAPKGLIGGTNKR APGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTDG EADYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	189
CD3B15 0	CD3H 142	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC AKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	185	CD3 L66	QTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKQP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGVPQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	190
CD3B15 1	CD3H 143	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC VKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	186	CD3 L63	QAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKQP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGAPQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	188
CD3B15 2	CD3H 143	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC VKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	186	CD3 L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGA VTTSNYANWVQQLP GTAPKGLIGGTNKR APGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTDG EADYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	189
CD3B15 4	CD3H 143	EVQLLESGGGLVQP GGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPG KGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYC VKHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	186	CD3 L66	QTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKQP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGVPQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	190
CD3B15 5	CD3H 144	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFT FNTYAMNWRQASG KGLEWVGRIRSKYN GYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYC TRHGNFGNSYVSWF	187	CD3 L63	QAVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKQP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGAPQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	188
		AYWGQGTLLTVSS				
CD3B15 6	CD3H 144	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFT FNTYAMNWRQASG KGLEWVGRIRSKYN GYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYC TRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	187	CD3 L64	QSVLTQPPSVSAAP GQKVTISCRSSTGA VTTSNYANWVQQLP GTAPKGLIGGTNKR APGIPDRFSGSKSG TSATLGITGLQTDG EADYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	189
CD3B15 8	CD3H 144	EVQLVESGGGLVQP GGSLKLSAASGFT FNTYAMNWRQASG KGLEWVGRIRSKYN GYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQ MNSLKTEDTAVYYC TRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLTVSS	187	CD3 L66	QTVVTQEPSLTVSP GGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQKQP GQAPRGLIGGTNKR APGTPARFSGSLLG GKAALTLGVPQPED EAEYYCALWYSNLW VFGGGTKLTVL	190

Было создано моноспецифическое антитело CD3B143 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 184 и VL с SEQ ID NO: 188 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A, F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B144 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 184 и VL с SEQ ID NO: 189 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B146 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 184 и VL с SEQ ID NO: 190 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B147 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 185 и VL с SEQ ID NO: 188 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B148 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 185 и VL с SEQ ID NO: 189 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B150 к CD3,

содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 185 и VL с SEQ ID NO: 190 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B151 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 186 и VL с SEQ ID NO: 188 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B152 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 186 и VL с SEQ ID NO: 189 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B154 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 186 и VL с SEQ ID NO: 190 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B155 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 187 и VL с SEQ ID NO: 188 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B156 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 187 и VL с SEQ ID NO: 189 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L. Было создано моноспецифическое антитело CD3B158 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 187 и VL с SEQ ID NO: 190 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и F405L.

Пример 13. Эндогенное клеточное связывание гуманизированных хитов антител к CD3 с первичными Т-клетками.

Полученную панель антител к CD3 протестировали на связывание с CD3ε клеточной поверхности на первичных человеческих Т-клетках. Для этого связывание антител из экспрессионных супернатантов визуализировали с использованием поликлонального вторичного антитела к иммуноглобулину человека и анализировали методом проточной цитометрии. Коротко, связывание антител к CD3 с CD3ε на клеточной поверхности анализировали методом проточной цитометрии с использованием человеческих Т-лимфоцитов, очищенных отрицательной селекцией (Biological Specialty, Colmar, USA). Экспрессионные супернатанты или очищенные антитела нормализовали к 10 мкг/мл в среде или в буфере для FACS (BD BioSciences) соответственно. Аликвоты по 2×10^5 клеток вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета (CoStar) для мечения. Антитела в экспрессионном супернатанте добавляли к клеткам и инкубировали в течение 45 мин при 4°C. После центрифугирования при 1300 об/мин в течение 3 мин и удаления супернатанта 50 мкл вторичного антитела к IgG человека (H+L) Alexa Fluor 647 (Life technologies Inc.) инкубировали с клетками в конечной концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при 4°C в месте, защищенном от прямого света. Затем промывали и ресуспендировали в 30 мкл буфера для FACS (BD BioSciences). Сбор образцов выполняли в системе Intellicyt HTFC с использованием программного обеспечения ForeCyt. Перед анализом связывания проводили селекцию жизнеспособных одиночных клеток, используя зеленый или красный фиксируемый краситель для живых/мертвых клеток (Life Technologies Inc.) и параметры площади и высоты для прямого/бокового рассеяния соответственно. Графики получали в программном обеспечении GraphPad Prism версии 5, используя средние значения интенсивности флуоресценции.

Хотя была выполнена серия титрований, на фиг. 13 для ясности представлена промежуточная концентрация. В качестве контролей использовали два полученных с использованием фагов терапевтических антитела собственной разработки с одинаковой областью Fc: в качестве положительного контроля использовали не обладающее перекрестной реактивностью с яванским макаком агонистическое антитело G11 (HC SEQ ID NO: 222, LC SEQ ID NO: 223), а в качестве не связывающегося/не агонистического антитела для оценки неспецифического связывания использовали CD3B94 (HC - SEQ ID NO: 224, LC - SEQ ID NO: 225). Коммерческое антитело SP34 в этом исследовании для сравнения не использовали, поскольку это мышинное антитело, и использование другого вторичного детектирующего реагента не позволило бы напрямую сравнивать исследуемые варианты.

Данные продемонстрировали матрицу потенциала связывания в панели гуманизированных хитов антител к CD3, где два антитела (CD3B144, CD3B152) продемонстрировали полную потерю связывания с человеческими Т-клетками. Остальные антитела продемонстрировали некоторый диапазон потенциала связывания, который в широком смысле можно разделить на сильно связывающиеся и слабо связывающиеся, используя в качестве порога связывание антитела G11. По этим параметрам в панели вариантов были идентифицированы семь сильно связывающихся и семь слабо связывающихся антител (фиг. 13).

Затем проводили анализ связывания хитов антител к CD3 с первичными Т-клетками CD4⁺ яванского макака, чтобы оценить сохранение перекрестной реактивности. Использовали очищенные Т-клетки CD4⁺ из периферической крови яванского макака (Zen Bio, Triangle Research Park, США). Протоколы исследований были сходными с описанными выше. Поскольку антитело G11 не обладает перекрестной реактивностью к CD3ε яванского макака, в качестве положительного контроля в данном анализе использовали CD3B124, химерное антитело собственной разработки, полученное из SP34, имеющее VH и VL от SP34, мышинный каркас и Fc человеческого IgG1 (фиг. 14). Интересно, что несколько вариантов продемонстрировали сниженный потенциал связывания по сравнению с наблюдаемым на человеческих клетках. Сюда относились сильно связывающиеся антитела CD3B150, CD3B151 и CD3B154, у которых связывание было снижено, и несколько слабо связывающихся антител, у которых связывание выше фонового более не определялось. Такая утрата связывания не была связана с какой-то конкретной цепью имму-

ноглобулина, и это может означать, что в потере перекрестной реактивности играет роль комбинация тяжелой и легкой цепей. В сочетании эти анализы позволили идентифицировать варианты, сохраняющие перекрестную реактивность к CD3ε человека и яванского макака.

Пример 14. Функциональный анализ гуманизированных хитов антител к CD3 в первичных Т-клетках.

Анализ связывания показал, что панель хитов антител к CD3 демонстрирует некоторый диапазон связываний с Т-клетками человека и яванского макака. Чтобы исследовать способность каждого варианта к индукции активации через перекрестное связывание с CD3ε, первичные Т-клетки культивировали в течение ночи в присутствии антитела, конъюгированного с гранулами. На следующий день клетки собирали и метили антителом к CD69 для измерения активации (фиг. 15). Гуманизированные антитела к CD3 связывали с покрытыми белком А магнитными гранулами (SpheroTech, г. Лейк Форест, США) путем инкубации в течение ночи с антителом в концентрации 10 мкг/мл. На следующий день высевали по 2×10^5 первичных человеческих Т-клеток на круглодонные культуральные планшеты в трех повторах и добавляли по 2×10^5 гранул с покрытием. После инкубации в течение ночи при 37°C клетки собирали и метили антителом к CD69 Alexa Fluor® 488 (клон FN50; Biolegend) для оценки повышения уровня этого маркера активации. Сбор образцов и анализ проводили, как описано выше применительно к связыванию. Использовали несколько отрицательных контролей, в том числе только Т-клетки, Т-клетки с гранулами без покрытия и Т-клетки с гранулами, покрытыми изотипическим контролем (CD3B94). Все эти контроли демонстрировали сходные средние значения интенсивности флуоресценции, сопоставимые с неокрашенными Т-клетками, и это означает, что фон в данном анализе был низким. Для сравнения использовали несколько положительных контролей, включая ОКТ3 (US 5929212) и коммерческие антитела SP34-2.

Гуманизированные хиты антител к CD3 далее тестировали на способность активировать первичные Т-клетки CD4+ яванского макака (Zen Bio, Triangle Research Park, США) в том же анализе (фиг. 16). Антитело FN50 к CD69 описано как перекрестно-реагирующее с нечеловеческим белком, и, следовательно, его можно использовать для проверки активации этих клеток.

Данные об активации у человека и яванского макака коррелировали с данными о связывании в том, что панель хитов продемонстрировала некоторый диапазон потенциалов активации. Ряд молекул с сильным связыванием продемонстрировал способность активировать человеческие Т-клетки в равной или большей степени по сравнению с коммерческими антителами SP34-2. Несколько вариантов продемонстрировали потенциал активации более низкий, чем у SP34-2, а некоторые связывающиеся антитела не проявили признаков стимуляции CD69. Неспособность к активации наблюдалась только у вариантов, не проявлявших или проявлявших слабое связывание, а все варианты с сильным связыванием проявили какой-либо уровень активации, что указывает на корреляцию между связыванием и потенциалом активации как в случае человека (фиг. 17А), так и в случае яванского макака (фиг. 17В).

Пример 15. Получение антител в биспецифическом формате в IgG1 L234A, L235A.

Несколько моноспецифических антител к CD123 экспрессировали в виде IgG1, имеющих в Fc замены L234A, L235A и K409R (на антителе к CD123) (нумерация согласно реестру ЕС) в Fc-областях. Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях НЕК. Моноспецифические антитела к CD3 представляли собой IgG1 с заменами в Fc L234A, L235A и F405L.

Было создано моноспецифическое антитело I3RB135-K409R к CD123, содержащее области VH и VL антитела I3RB2 к CD123, имеющего VH с SEQ ID NO: 120 и VL с SEQ ID NO: 165 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и K409R.

Было создано моноспецифическое антитело I3RB125-K409R к CD123, содержащее области VH и VL антитела I3RB18 к CD123, имеющего VH с SEQ ID NO: 136 и VL с SEQ ID NO: 168 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и K409R.

В качестве контроля было создано моноспецифическое антитело B21M к RSV, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 191 и VL с SEQ ID NO: 192 и константную область IgG1 с заменами L234A, L235A и либо K409R, либо F405L, для сочетания в качестве пустого плеча либо с CD3-, либо с CD123-плечом биспецифического антитела.

Моноспецифические антитела очищали с помощью стандартных способов с использованием колонки с белком А (колонка HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Моноспецифические антитела к CD123 объединяли во время обмена Fab-плечами *in vitro* в матрице с созданием биспецифических антител, которые впоследствии дополнительно характеризовали (табл. 13).

Матрица моноклональных антител CD123 × CD3 для получения биспецифических антител

		ПЛЕЧИ CD123		Контроль
		I3RB135	I3RB125	B21M, 409R
		(I3RB2)	(I3RB18)	
mAb CD3	CD3B146	I3RB179	I3RB186	I3RB192
	CD3B147	I3RB180	I3RB187	I3RB193
	CD3B151	I3RB181	I3RB188	I3RB194
	CD3B154	I3RB182	I3RB189	I3RB195
	CD3B155	I3RB183	CD3B191	I3RB196
Контроль	B21M, F405L	I3RB185	I3RB191	I3RB198
mAb				

Биспецифические антитела к CD123 × CD3 создавали, объединяя моноспецифическое mAb к CD3 и моноспецифическое mAb к CD123 во время обмена Fab-плечами *in-vitro* (как описано в WO 2011/131746). Вкратце, около 1-20 мг/мл антитела к CD123/CD3 в молярном соотношении 1,08:1 в PBS, pH 7-7,4, и 75 мМ 2-меркаптоэтанолamina (2-МЕА) смешивали вместе и инкубировали при 25-37°C в течение 2-6 ч, после чего удаляли 2-МЕА посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и/или фильтрации в вихревой ячейке с помощью стандартных способов. Сходным образом были получены контрольные биспецифические антитела с плечом к RSV-(B21M).

Созданные моноспецифические антитела к CD3 и CD123 смешивали для обмена Fab-плечами *in vitro* в матрице и охарактеризовывали с помощью различных анализов. Биспецифическое антитело I3RB179-Ab содержит плечо mAb CD3B146-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB135-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB186-Ab содержит плечо mAb CD3B146-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB125-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB180-Ab содержит плечо mAb CD3B147-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB135-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB187-Ab содержит плечо mAb CD3B147-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB125-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB181-Ab содержит плечо mAb CD3B151-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB135-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB188-Ab содержит плечо mAb CD3B155-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB125-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB182-Ab содержит плечо mAb CD3B154-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB135-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB189-Ab содержит плечо mAb CD3B154-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB125-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB183-Ab содержит плечо mAb CD3B155-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB135-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB191-Ab содержит плечо mAb CD3B155-F405L, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB125-K409R, связывающееся с CD123.

Для получения контрольных биспецифических антител антитело к RSV, B21M (HC SEQ ID NO: 207 показано с мутацией F405L, LC SEQ ID NO: 208), объединяли либо с плечом CD3, либо с плечом CD123, как описано ниже. Биспецифическое антитело I3RB185-Ab содержит плечо mAb B21M-F405L, связывающееся с RSV, и плечо mAb I3RB135-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB191-Ab содержит плечо mAb B21M-F405L, связывающееся с RSV, и плечо mAb I3RB125-K409R, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело I3RB192-Ab содержит плечо mAb B21M-K409R, связывающееся с RSV, и плечо mAb CD3B146-F405L, связывающееся с CD3. Биспецифическое антитело I3RB193-Ab содержит плечо mAb B2M-F409R, связывающееся с RSV, и плечо mAb CD3B147-F405L, связывающееся с CD3. Биспецифическое антитело I3RB194-Ab содержит плечо mAb B2M-F409R, связывающееся с RSV, и плечо mAb CD3B151-F405L, связывающееся с CD3. Биспецифическое антитело I3RB195-Ab содержит плечо mAb B21M-K409R, связывающееся с RSV, и плечо mAb CD3B154-F405L, связывающееся с CD3. Биспецифическое антитело I3RB196-Ab содержит плечо mAb B21M-K409R, свя-

зываются с RSV, и плечо mAb CD3B155-F405L, связывающиеся с CD3.

Тяжелые и легкие цепи биспецифических антител к CD123 × CD3 представлены ниже в табл. 14.

Таблица 14

Последовательности тяжелых и легких цепей биспецифических антител IgG1

Антитело		Аминокислотная последовательность
I3RB179	Тяжелая цепь 1 CD3B146 (SEQ ID NO: 193)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMN WVRQASGKGLEWVGRIRSKYNGYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCTRHGNFG NSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B146 (SEQ ID NO: 194)	QAVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGSAQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 203)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSGYWMH WVRQAPGKGLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDGVIEDT FDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQQDW

		LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 204)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
I3RB180	Тяжелая цепь 1 CD3B147 (SEQ ID NO: 195)	EVQLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHNFG NSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPFVQLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWE.SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B147 (SEQ ID NO: 196)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGSAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSKQSNKY AASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB135 (I3RB2)	EVQLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMH WVRQAPGKLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTI

	(SEQ ID NO: 203)	SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDT FDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSGDSFLLYSRLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 204)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLCLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
I3RB181	Тяжелая цепь 1 CD3B151 (SEQ ID NO: 197)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKKGNGF NSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGDSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B151 (SEQ ID NO: 198)	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG

	NO: 198)	GKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVLGGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSKQSNKY AASSYLSTLPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 203)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMH WVRQAPGKLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDT FDYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 204)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
I3RB182	Тяжелая цепь 1 CD3B154 (SEQ ID NO: 199)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHGNGF NSYVWFAYWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE

		VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B154 (SEQ ID NO: 200)	QTVVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYICALWYSNLWVFGGGTK LTVLGGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTTPSKQSNKY AASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 203)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMH WVRQAPGKLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDT FDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 204)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW YQQKPGQAPRLLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTD FTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
I3RB183	Тяжелая цепь 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN

<p>CD3B155 (SEQ ID NO: 201)</p>	<p>WVRQASGKLEWVGRIRSKYNGYATYYAASVKGRF TISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFG NSYVSWFAYWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>Легкая цепь 1 CD3B155 (SEQ ID NO: 202)</p>	<p>QAVVTQEPSTVSPGGTTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGSAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGKTK LTVLQGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS</p>
<p>Тяжелая цепь 2 I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 203)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMH WVRQAPGKLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDT FDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSN TKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKAGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>Легкая цепь 2</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAW</p>

	I3RB135 (I3RB2) (SEQ ID NO: 204)	YQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSSTD FTLTISSLEPEDFAVYQCQRSNWPLTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
I3RB186	Тяжелая цепь 1 CD3B146 (SEQ ID NO: 193)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQASGKGLEWVGRIRSKYNGYATYYAASVKGRF TISRDDSNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCTRHNFG NSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQLDNLGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ PREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B146 (SEQ ID NO: 194)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTARFSGSLLG GKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 205)	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWGMIIIDPSDSDTRYSFQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSIDL DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFP

		PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 2 I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 206)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
I3RB187	Тяжелая цепь 1 CD3B147 (SEQ ID NO:195)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHGNFG NSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B147 (SEQ ID NO: 196)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYA NHWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNKYY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECS

	<p>Тяжелая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 205)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMMGIIDPSDS DTRYSPSFQGGVTI SADKSI STAYLQWSSSLKASDTAMY CARGDGS TD L DYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
	<p>Легкая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 206)</p>	<p>EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYCYQQDYGFPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>
I3RB188	<p>Тяжелая цепь 1 CD3B151 (SEQ ID NO: 197)</p>	<p>EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYADSVKGRF TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYCYV KHGNFG NSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYKSLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

	<p>Легкая цепь 1 CD3B151 (SEQ ID NO: 198)</p>	<p>QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNKY AASSYLSTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS</p>
	<p>Тяжелая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 205)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGEELKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMIIDPSDSSTRYSPTFQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARGDGSDDL DYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
	<p>Легкая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 206)</p>	<p>EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDEFAVYYCQQDYGFPTWFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC</p>
I3RB189	<p>Тяжелая цепь 1 CD3B154 (SEQ ID NO: 199)</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVKHGNFG NSYVSWFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV</p>

		NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B154 (SEQ ID NO: 200)	QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYA NWWQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGKTK LTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTPSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVA PTECS
	Тяжелая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 205)	EVQLVQSGAEVKKPGEISLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMIIDPSDSDTRYSPSFQGQVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARGDGDSDL DYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPVLDSGDGSFLYSRLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 206)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYCYQQDYGFPTWFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF

		NRGEC
CD3B191	Тяжелая цепь 1 CD3B155 (SEQ ID NO: 201)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMN WVRQASGKGLEWVGRIRSKYNGYATYYAASVKGRF TISRDDSNTAYLQMNLSKTEDTAVYYCTRHGNFG NSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь 1 CD3B155 (SEQ ID NO: 202)	QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NHWQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLG GKAALTLGAQPEDEAEYCALWYSNLWVFGGK LTVLGGPKAAPSVTLPFSSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTTTPSKQSNKY AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTV PTECS
	Тяжелая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 205)	EVQLVQSGAEVKKPGESEKISKCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMIIDPDSDDTRYSFQGGVTTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARGDGSIDL DYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNT KVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQ
		GNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь I3RB125 (I3RB18) (SEQ ID NO: 206)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPPWTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

Пример 16. Оценка биспецифических антител в функциональном анализе уничтожения клеток.

Анализ опосредуемой Т-клетками цитотоксичности представляет собой функциональный анализ по оценке способности биспецифических антител CD123 × CD3 к лизису клеток с использованием Т-клеток от здоровых доноров.

Был использован протокол Laszlo, et al. (Laszlo, G., et al. 2014 BLOOD 123:4, 554-561). Коротко, эф- фекторные клетки собирали, подсчитывали, промывали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 кле- ток/мл в среде RPMI (10% FBS). Клетки-мишени метили CFSE (Invitrogen #C34554) и ресуспендировали в концентрации 2×10^5 клеток/мл в RPMI (Invitrogen № 61870-036) с 10% FBS (Invitrogen № 10082-147). Эффекторные клетки (Е) и меченные CFSE клетки-мишени (Т) смешивали в соотношении Е:Т=5:1 в сте-

рильных 96-луночных круглодонных планшетах. В лунки добавляли аликвоту 5 мкл каждого биспецифического антитела с разными концентрациями. Культуры инкубировали 48 ч при 37°C в условиях 5% CO₂. Через 48 ч к образцам добавляли буфер для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (life technologies кат. № L10119), культуры инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, промывали и ресуспендировали в 170 мкл буфера для FACS. Вызванную препаратом цитотоксичность определяли, используя проточный цитометр CANTO II (BD Biosciences), и анализировали, используя программное обеспечение FlowJo или Dive (BD Biosciences). Интерес представляет популяция дважды позитивных клеток CFSE+/живые/мертвые+.

Представлены результаты по опосредованному Т-клетками лизису клеточных линий AML MV4-11 (фиг. 18 А и В), OCI-AML5 (фиг. 19 А и В) и OCI-M2 (фиг. 20 А и В) после 48 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂. MV4-11 и OCI-AML5 представляют собой клеточные линии с экспрессией CD123, а OCI-M2 имеет весьма низкую экспрессию CD123. Соотношение эффектор/мишень для данного исследования составляло 5:1. Для блокировки функции Fc добавляли аликвоту 2 мг/мл Fc-блокатора.

Как антитело I3RB2, так и I3RB18 при комбинировании с антителом к CD3 в биспецифический формат, эффективно уничтожают клетки CD123+. Кроме этого, данные позволяют четко ранжировать биспецифические антитела с I3RB135 (на основе I3RB2) и I3RB125 (на основе I3RB18), и биспецифические антитела I3RB125 × CD3 являются более эффективными, чем биспецифические антитела I3RB135 × CD3. В пределах каждого семейства биспецифические антитела на основе CD3B146 и CD3B155 (mAb с более высокой аффинностью) были более эффективны, чем биспецифические антитела на основе CD3B151 и CD3B154. На линии клеток OCI-M2 с низкой экспрессией CD123 наблюдается низкий уровень дозозависимой фоновой цитотоксичности.

Пример 17. Оценка биспецифического антитела I3RB186 в модели опухолевого заболевания.

Материалы и способы.

Клеточная линия. Чтобы определить эффективность биспецифического антитела I3RB186 *in vivo*, были выбраны опухолевые клеточные линии с высокой экспрессией CD123. Опухолевые клетки KG-1 (DSMZ, кат. № ACC 14) человеческого острого миелолейкоза (AML) культивировали *in vitro* в среде RPMI с добавлением инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (10% об./об.) при 37°C в воздушной атмосфере с 5% CO₂. Клетки регулярно пересеивали два-три раза в неделю. Клетки, достигшие фазы экспоненциального роста, собирали и подсчитывали для инокуляции клеток опухоли.

Подготовка человеческих PBMC для трансплантации. Для тестирования молекул hIgG1-AA использовали обогащенные мононуклеарами клетки человека Mononuclear Enriched Cells (кат. № 213-15-04), полученные от Biological Specialty Corporation (Colmar, штат Пенсильвания, США). PBMC выделяли путем разделения в градиенте плотности фиколла (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, кат. № 17-1440-03) и добавляли аликвоты по 50×10⁶ клеток во флаконы со средой для замораживания (Recovery Cell Culture Freezing Medium, Gibco, кат. № 12648-010). Флаконы хранили при -80°C приблизительно 24 ч, а затем переносили в жидкий азот для длительного хранения. Для тестирования молекулы IgG4 использовали флаконы с замороженными выделенными мононуклеарными клетками периферической крови (100×10⁶ клеток во флаконе, кат. № PB009-3), полученные от NemaCare (г. Ван-Найс, штат Калифорния, США). Для размораживания PBMC замороженные флаконы помещали на водяную баню при 37°C. Клетки переносили в коническую пробирку, содержащую холодную среду для размораживания. Коническую пробирку центрифугировали и клетки ресуспендировали в стерильном PBS. Жизнеспособность клеток определяли методом вытеснения трипанового синего. Клетки ресуспендировали в концентрации 50×10⁶ клеток/мл в стерильном PBS для инъекций.

Сбор периферической крови для анализа FACS. Для этого 50 мкл крови отбирали у каждого животного через ретроорбитальный синус в пробирки, покрытые гепарином лития. Аликвоту крови 25 мкл из каждого образца помещали в 175 мкл среды (RPMI с 10% FBS) в каждый из двух 96-луночных планшетов. Планшеты центрифугировали и эритроциты лизировали, используя трехкратную обработку лизирующим буфером ACK. Оставшиеся клетки для каждого образца объединяли и окрашивали на CD45, CD3, CD8 и CD4 для количественной оценки циркулирующих человеческих Т-лимфоцитов (см. протокол "Сбор/окрашивание мышинной периферической крови: протокол выделения лейкоцитов и анализа FACS").

Протокол анализа лейкоцитов методом FACS. Периферическую кровь отбирали до двух раз в ходе исследования циркулирующих человеческих PBMC методом цитометрии посредством сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS). Цельную кровь (25 мкл) разводили в 175 мкл среды RPMI в 96-луночных планшетах. Планшеты центрифугировали при 1400 об/мин 4 мин и супернатант сливали. Клетки ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера ACK и инкубировали на льду 5 мин. После центрифугирования при 1300 об/мин в течение 5 мин супернатант отбирали аспирацией. Клетки обрабатывали лизирующим буфером ACK еще два раза, промывали один раз в 200 мкл PBS и снова центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 50 мкл/лунка коктейля антител в PBS, содержащего краситель Live/Dead (Invitrogen, кат. № L10119, 0,25 мкл/лунка маточного раствора. Маточный раствор представляет собой 1 флакон, разводимый в 150 мкл DMSO), и инкубировали

ли при комнатной температуре в темноте 30 мин. Для мечения клеток использовали следующие антитела: CD4 (Becton Dickinson кат. № 557922, 0,5 мкл/лунка), CD8 (Invitrogen, Q010055, 0,5 мкл разведенного 1:10 в PBS/лунка), CD3 (Becton Dickinson, кат. 558117, 0,5 мкл/лунка), CD45 (BioLegend кат. 304006, 0,5 мкл/лунка). Клетки промывали 3 раза буфером для FACS (200 мкл/лунка) и ресуспендировали в 170 мкл буфера для FACS. Отбор образцов выполняли на проточном цитометрическом анализаторе BD LSR Fortessa Flow. Перед анализом связывания проводили селекцию жизнеспособных одиночных клеток, используя краситель для живых/мертвых клеток Near-IR (Life Technologies Inc.) и параметры площади и высоты для прямого/бокового рассеяния соответственно. Данные анализировали, используя программное обеспечение BD FACS Diva версии 7.

Дизайн эксперимента *in vivo*. Самкам мышей линии NSG (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) подкожно вводили клетки KG-1 (5×10^6 клеток в фосфатно-солевом буферном растворе в объеме 200 мкл) в заднюю боковую зону каждого животного. День инокуляции опухолевыми клетками обозначали как день 0. Контроль размеров опухоли проводили дважды в неделю, начиная с седьмого дня после имплантации, пока объем опухоли не достигал 100-150 мм³ (четырнадцатый день после имплантации), и в это время мышам рандомизировали по объему опухоли на экспериментальные группы. Далее мышам внутривенно (в латеральную вену хвоста) прививали человеческие моноклональные клетки периферической крови (PBMC) (10×10^6 в фосфатно-солевом буферном растворе в объеме 200 мкл). Сразу после имплантации PBMC мышам проводили внутривенную терапию биспецифическими антителами I3RB186 (биспецифическое антитело разводили в PBS и вводили в объеме 100 мкл). Лечение проводили приблизительно каждый второй день, всего пять доз (точные дни введения дозы см. в табл. 15). Два раза в неделю регистрировали размер опухолей и массу тела.

Конечными точками исследований были ингибирование роста опухоли, максимальная опухолевая нагрузка (среднее значение по группе меньше 1500 мм³) и потеря массы тела больше 20% от массы тела в момент начала лечения. Размер опухоли измеряли дважды в неделю в двух направлениях с использованием штангенциркуля; объем выражали в мм³ с использованием формулы: $V=0,5 \times a \times b^2$, где a и b представляют собой большой и малый диаметры опухоли соответственно. Полную регрессию опухоли (CR) определяли как уменьшение опухолей до предела, который не обнаруживается при пальпации (50 мм³). Частичную регрессию опухоли (PR) определяли как уменьшение опухолей относительно исходного объема опухоли. Чтобы CR или PR расценивались как устойчивые, требовалось, чтобы CR или PR определялись минимум в течение трех или более последовательных измерений опухоли.

Приживление человеческих PBMC в конечном счете вызывало у мышей реакцию "трансплантат против хозяина" (GVHD), при которой имплантированные донорские Т-клетки активировались и проникали в ткани хозяина, приводя к органной недостаточности, сверхсильной потере веса и неизбежной гибели. Для отслеживания начала и тяжести GVHD в этой модели массу тела регистрировали дважды в неделю и выражали в граммах (г). Процентное изменение массы тела вычисляли по формуле: изменение массы тела = $[(C - I)/I] \times 100$, где C представляет собой текущую массу тела, а I представляет собой массу тела при начале лечения.

В соответствующих таблицах исследований приводится сводная статистика, включая среднее и стандартную погрешность среднего (СПс) по объему опухолей и различия в объеме опухоли в каждой группе для каждой временной точки. Статистический анализ различий по объему опухоли между группами проводили с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для повторяющихся измерений с последующим тестом Бонферрони при помощи программного обеспечения GraphPad Prism версия 5.01. Значения $p < 0,05$ считали статистически достоверными.

Эффективность биспецифических антител к CD123 \times CD3 IgG1, F234A, L235A.

Мышам NSG подкожно имплантировали клетки KG-1, а затем внутривенно трансплантировали человеческие PBMC, описанные выше, и после того как сформировались опухоли (средний объем опухоли = $102 \pm 5,9$ мм³), вводили биспецифическое антитело I3RB186 к CD123 \times CD3 в дозах 0,01, 0,1, 1 и 10 мкг на животное, как описано выше. Подгруппе мышам с наличием опухоли не прививали PBMC, но вводили антитела, и они являлись контрольной группой для механизма действия биспецифических антител в отсутствие контрольных биспецифических антител. Кроме того, части мышам, не имевших опухолей, прививали PBMC и вводили антитела, и они были контролем для FACS-анализа периферической крови (схема эксперимента приведена в табл. 15).

График введения дозы для оценки эффективности I3RB186 in-vivo

Группа	Кол-во	Опухоль	PBMC	Лечение	Доза (мкг/животное)	Путь введения	График введений (дни после имплантации опухоли)	Отбор крови (дни после имплантации и опухоли)
1	10	+	-	PBS	0	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
2	10	+	-	I3RB186	10	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
3	10	+	-	I3RB186	1	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
4	10	+	-	I3RB186	0,1	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
5	10	+	-	I3RB186	0,01	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
6	10	+	+	PBS	0	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
7	10	+	+	I3RB186	10	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
8	10	+	+	I3RB186	1	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53
9	10	+	+	I3RB186	0,1	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53
10	10	+	+	I3RB186	0,01	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30
11	5	-	+	PBS	0	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53
12	5	-	+	I3RB186	10	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53
13	5	-	+	I3RB186	1	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53
14	5	-	+	I3RB186	0,1	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53
15	5	-	+	I3RB186	0,01	в/в	14, 17, 20, 22, 24	30, 53

Результаты анализа эффективности in-vivo.

На фиг. 21 показана эффективность биспецифических антител к CD123 × CD3 IgG1-AA, I3RB186 - IgG1, F234A, L235A при ксенотрансплантации клеток человеческого острого миелолейкоза (AML) KG-1 в присутствии человеческих PBMC при двух дозировках 0,1 и 1 мкг на животное ($p < 0,001$). Биспецифические антитела в дозе 1 мкг на животное (серый заштрихованный квадрат) демонстрируют более быстрый противоопухолевый эффект, чем доза 0,1 мкг, причем полная регрессия наблюдалась у 3 из 8 животных, а частичная регрессия наблюдалась у 3 из 8 животных. Однако у 6 из 8 животных начиная с 55-го дня после имплантации опухоли наблюдали возобновление ее роста. Биспецифические антитела в дозе 0,1 мкг на животное (серый заштрихованный ромб) демонстрировали замедленную, но лучшую эффективность, и у всех животных наблюдалась полная или частичная регрессия опухоли. Эти данные демонстрируют необходимость в присутствии эффекторных Т-лимфоцитов для уничтожения клеток-мишеней биспецифическими антителами.

На фиг. 22 показан анализ методом FACS периферической крови, взятой у мышей на 30-й день после имплантации опухоли. Увеличение количества клеток CD45+, обусловленное увеличением числа Т-лимфоцитов CD8+, было очевидным у мышей с наличием опухоли, получавших биспецифические антитела в дозе 0,1 и 1 мкг. Такое увеличение количества Т-лимфоцитов CD8+ происходило только при наличии клеток-мишеней (KG-1) в тех группах, где наблюдалась противоопухолевая эффективность. Напротив, доза 10 мкг биспецифического антитела, по-видимому, устраняла клетки PBMC CD45+ из периферической крови. Такое устранение эффекторных клеток может объяснять недостаток эффективности, наблюдаемый при этой дозе.

На фиг. 23 показан анализ методом FACS периферической крови, взятой у мышей на 53-й день после имплантации опухоли. Количества клеток CD45+, CD8+ и CD4+ были сходными у мышей с наличи-

ем опухоли, получавших биспецифическое антитело в дозах 0,1 и 1 мкг, а также у мышей без опухолей, получавших PBS и дозы биспецифического антитела 0,01 и 0,1 мкг. Мыши без опухолей, получавшие биспецифическое антитело в дозах 1 и 10 мкг, имели очень низкие уровни клеток CD45+, CD8+ и CD4+; причина этого в настоящий момент неизвестна.

На фиг. 24 показано среднее изменение массы тела в экспериментальных группах с течением времени. Как описывалось ранее, потеря массы тела коррелирует с началом и тяжестью GVHD, вызванной активированными Т-клетками. Как у мышей без опухолей, так и у мышей с опухолями потеря массы тела была наиболее тяжелой при введении 0,1 мкг биспецифического антитела. Мыши с опухолями, получавшие биспецифическое антитело в дозе 1 мкг, не испытывали резкой потери массы тела. Т-лимфоциты присутствовали на 53-й день после имплантации опухоли (по данным анализа FACS, фиг. 23), однако отсутствие потери массы тела и начало реакции GVHD указывает на отсутствие активированных Т-клеток, что может объяснять возобновление роста опухоли, наблюдаемое в этой группе, начиная с 55-го дня после имплантации опухоли (фиг. 21).

Пример 18. Оценка I3RB186 и контрольных биспецифических антител (I3RB191 и I3RB192) *in vivo*.

Во втором эксперименте *in vivo* были добавлены контрольные биспецифические антитела I3RB191 с пустым плечом CD3 и I3RB192 с пустым плечом CD123. Протокол был тот же, что и в примере 16. Опухолевые ксенотрансплантаты клеток KG-1 человеческой AML подкожно имплантировали самкам мышей NSG. Через четырнадцать дней после имплантации мышей рандомизировали по объему опухоли по экспериментальным группам. Человеческие PBMC имплантировали внутривенно, а затем внутривенно вводили I3RB186 и контрольные биспецифические антитела I3RB191 и I3RB192 в дозе 1 мкг на животное (см. график введения дозы в табл. 16). Лечение проводили на 14, 16, 18, 21 и 23-й дни после имплантации опухоли. Стрелки на фигуре показывают дни введения биспецифического Ab.

Таблица 16

График дозирования для 2-го эксперимента *in vivo*

Группа	Кол-во	Опухоль	PBMC	Лечение	Доза (мкг/животное)	Путь введения	График введений (дни после имплантации опухоли)	Отбор крови (дни после имплантации опухоли)
1	8	+	+	PBS	0	в/в	14, 16, 18, 21, 23	36
2	8	+	+	I3RB192	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	36
3	8	+	+	I3RB191	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	36
4	8	+	+	I3RB186	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	36, 63
5	8	+	-	PBS	0	в/в	14, 16, 18, 21, 23	Н/Д
6	8	+	-	I3RB192	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	Н/Д
7	8	+	-	I3RB191	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	Н/Д
8	8	+	-	I3RB186	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	Н/Д
9	4	-	+	PBS	0	в/в	14, 16, 18, 21, 23	36, 63
10	4	-	+	I3RB186	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	36, 63

Противоопухолевая активность биспецифических Ab показана как изменение размера опухоли (мм^3) с течением времени (фиг. 25). Лечение антителом I3RB186 в дозе 1 мкг достоверно ингибировало рост опухоли ($p < 0,001$) по сравнению с животными, получавшими PBS и контрольные биспецифические антитела.

На 36-й день после имплантации опухоли выполняли отбор периферической крови для FACS-анализа циркулирующих человеческих клеток PBMC. В отличие от первого исследования не было отмечено различия в частоте появления человеческих PBMC CD45+ (а) или Т-лимфоцитов CD8+ и CD4+ (б) у животных, получавших I3RB186, по сравнению с PBS и I3RB191 (фиг. 26). Клетки CD45+, CD8+ и CD4+ реже встречались у животных с опухолями и животных без опухолей, получавших I3RB192, контрольные биспецифические антитела с пустым плечом CD123.

На 63-й день после имплантации опухоли выполняли отбор периферической крови для FACS-анализа циркулирующих человеческих клеток PBMC. Из мышей с опухолями выжили только животные, получавшие I3RB186 в дозе 1 мкг (фиг. 27). Не было отмечено увеличения частоты встречаемости человеческих PBMC CD45+ (а) и Т-лимфоцитов CD8+ (б) у мышей с опухолями, получавших 1 мкг I3RB186, по сравнению с мышами без опухолей, получавших PBS или 1 мкг I3RB186 (фиг. 25). Т-лимфоциты CD4+ с равной частотой встречались во всех оставшихся группах. Мыши без опухолей, получавшие PBS

и 1 мкг I3RB186, имели очень низкую частоту появления клеток CD45+, CD8+ и CD4+.

На фиг. 28 показано среднее изменение массы тела в экспериментальных группах с течением времени. Как описывалось ранее, потеря массы тела коррелирует с началом и тяжестью GVHD, вызванной активированными Т-клетками. У мышей с опухолями была отмечена более выраженная потеря массы тела при лечении 1 мкг биспецифического антитела по сравнению со всеми другими группами. Это противоречит первому исследованию, в котором мыши с опухолями, получавшие 1 мкг биспецифического антитела, не испытывали резкой потери массы тела. Т-лимфоциты присутствовали на 63-й день после имплантации опухоли (фиг. 27), однако эффективность дозы 1 мкг была не так выражена, как в первом исследовании (фиг. 21, 25).

Пример 19. Получение антител в биспецифическом формате в IgG4 S228P, F234A, L235A.

Несколько моноспецифических антител к CD3 и CD123 экспрессировали в виде IgG4, S228P, F234A и L235Aх (плечо CD123) или имеющего в Fc-областях замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо CD3) (нумерация согласно индексу ЕС).

Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях CHO под контролем промоторов CMV.

Было создано моноспецифическое антитело CD3B219 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 184 и VL с SEQ ID NO: 190 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. Было создано моноспецифическое антитело CD3B217 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 186 и VL с SEQ ID NO: 188 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. Было создано моноспецифическое антитело CD3B218 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 186 и VL с SEQ ID NO: 190 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K. Было создано моноспецифическое антитело CD3B220 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 187 и VL с SEQ ID NO: 188 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A, F405L и R409K.

Было создано моноспецифическое антитело I3RB218 к CD123, содержащее области VH и VL антитела I3RB2 к CD123, имеющего VH с SEQ ID NO: 120 и VL с SEQ ID NO: 165 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело I3RB217 к CD123, содержащее области VH и VL антитела I3RB18 к CD123, имеющего VH с SEQ ID NO: 136 и VL с SEQ ID NO: 168 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A.

В качестве контроля было создано моноспецифическое антитело к RSV, полученное из B21M, которое содержит области VH и VL, имеющие VH из SEQ ID NO: 191 и VL с SEQ ID NO: 192 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, L235A или F234A, L235A, R409K, F405L для сочетания в качестве пустого плеча либо с CD3-, либо с CD123-плечом биспецифического антитела.

Эти моноспецифические антитела были очищены, и полученные моноспецифические антитела к CD3 и CD123 смешивали для обмена Fab-плечами *in vitro* в матрице (табл. 12), как описывалось ранее в примере 15, и охарактеризовали различными видами анализов. Биспецифическое антитело Ab7959 содержит плечо mAb CD3B219-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB217-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab3978 содержит плечо mAb CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB217-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab7955 содержит плечо mAb CD3B218-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB217-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab9958 содержит плечо mAb CD3B220-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB217-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab8747 содержит плечо mAb CD3B219-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB218-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab8876 содержит плечо mAb CD3B217-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB218-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab4435 содержит плечо mAb CD3B218-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB218-R409, связывающееся с CD123. Биспецифическое антитело Ab5466 содержит плечо mAb CD3B220-F405L, R409K, связывающееся с CD3, и плечо mAb I3RB218-R409, связывающееся с CD123.

В качестве контрольных биспецифических антител создавали антитела B2M1 в формате IgG4 PAA, очищали их и объединяли либо с плечом CD3, либо с плечом CD123 согласно матрице, приведенной в табл. 17 ниже.

Матрица биспецифических антител IgG4

	CD3B219 (I3RB146) SEQ ID NO: 210, 211	CD3B217 (I3RB151) SEQ ID NO: 212, 213	CD3B218 (I3RB154) SEQ ID NO: 214, 215	CD3B220 (I3RB155) SEQ ID NO: 216, 217	B21M IgG4, F045L CD3 пустое
I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 218, 219	7959	3978	7955	9958	CD3 пустое 1 (4309)
I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 220, 221	8747	8876	4435	5466	CD3 пустое 2 (6601)
B21M IgG4, K409R CD123 пустое	CD123 пустое 1	CD123 пустое 2	CD123 пустое 3	CD123 пустое 4	CD123 CD3 пустое 4 (3244)

Тяжелые и легкие цепи биспецифических антител к CD123 × CD3 представлены в табл. 18.

Таблица 18

Последовательности тяжелых и легких цепей биспецифических антител IgG4-РАА

Антитело	Цепь	Аминокислотная последовательность
7959	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (I3RB146) SEQ ID NO: 210	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVSWFAYWGQ CTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (I3RB146) SEQ ID NO: 211	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSV QPEDEAEYYCALWYSLWVFGGKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSIRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 218	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVR QMPGKGLEWMIIDPSDSDTRYSPSFQGVTSADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARGDGSDDLQWGGQTLV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGLK
	Легкая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQDYGFPPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ

	ID NO: 219	SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3978	Тяжелая цепь 1 CD3B217 (I3RB151) SEQ ID NO: 212	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVKHGNGFNSYVSWFAYWQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 1 CD3B217 (I3RB151) SEQ ID NO: 213	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTL GAQPEDEAEYYCALWYSLWVFGGDKLTVLGGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 218	EVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMIIDPSDSDTRYSPFQGVITISADKSI AYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSDDLQYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 219	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQDYGFPPWTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
7955	Тяжелая цепь	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ

	<p>1 CD3B218 (I3RB154) SEQ ID NO: 214</p>	<p>APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHGNGFNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>
	<p>Легкая цепь 1 CD3B218 (I3RB154) SEQ ID NO: 215</p>	<p>QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGKKAALTLSGV QPEDEAEYYCALWYSLWVFGGKTLTVLQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAVKADSSPVKA GVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS</p>
	<p>Тяжелая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 218</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMIIDPSDSDTRYSPSFQGGVTVISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSDDLQYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVDSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSLGK</p>
	<p>Легкая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 219</p>	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQDYGFPPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSPVTKSFNRGEC</p>
9958	<p>Тяжелая цепь 1 CD3B220 (I3RB155) SEQ ID NO: 216</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQ ASGKGLEWVGRIRSKYNAYATYYAASVKGRFTISRDDSK NTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHGNGFNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT</p>

		VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGSPVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
	CD3B220 (I3RB155) SEQ ID NO: 217	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSA QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVLQGPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 218	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMIIDPSDSDTRYSPSFQGGVTISADKSI AYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSDDLQWGGTIVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLG TKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLGK
	Легкая цепь 2 I3RB217 (I3RB18) SEQ ID NO: 219	EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8747	Тяжелая цепь 1 CD3B219 (I3RB146) SEQ ID NO: 210	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNTYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSK NSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWQG GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGSPVFLFPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP

		QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 1 CD3B219 (I3RB146) SEQ ID NO: 211	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGTV QPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVLQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 220	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYMMHWVR QAPGKLEWVSAIRSDGSSKYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDTFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTV PSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
	Легкая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 221	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFTLTISL EPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
8876I	Тяжелая цепь 1 CD3B217 (I3RB151) SEQ ID NO: 212	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVKHGNGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSVTV VPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

	<p>Легкая цепь 1 CD3B217 (I3RB151) SEQ ID NO: 213</p>	<p>QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>
	<p>Тяжелая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 220</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSGYWMHWVR QAPGKLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKDGVIEDTFDYWGQGT LTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQ REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>
	<p>Легкая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 221</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRI.I.IYDASNRATGTPARFSGSGSDFTTITSSI EPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
4435	<p>Тяжелая цепь 1 CD3B218 (I3RB154) SEQ ID NO: 214</p>	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFNTYAMNWVRQ APGKLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVKHGNGNSYVSWFAYWGG GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVF SCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p>
	<p>Легкая цепь 1 CD3B218 (I3RB154)</p>	<p>QTVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL SGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPS VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYS CQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p>

	SEQ ID NO: 215	GVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 220	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMHWVRQ APGKGLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDTFDYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL GTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQ FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYITLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
	Легкая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 221	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSL EPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5466	Тяжелая цепь 1 CD3B220 (I3RB155) SEQ ID NO: 216	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWRQ ASGKGLEWVGRIRSKYNAYATYYAASVKGRFTISRDDSK NTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRHNFGNSYVSWFAYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV VPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREP QVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFV CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
	CD3B220 (I3RB155) SEQ ID NO: 217	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQ KPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGKAALTLGA QPEDEAEYYCALWYSLWVFGGKTLTVLQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKA GVETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECS
	Тяжелая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 220	EVQLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYWMHWVR QAPGKGLEWVSAIRSDGSSKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDGVIEDTFDYWGQGL VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQ REPQVYITLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
	Легкая цепь 2 I3RB218 (I3RB2) SEQ ID NO: 221	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSL EPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 20. Одновалентная аффинность биспецифических антител к CD123 в формате IgG4-ПАА при использовании рекомбинантного антигена.

Были проведены эксперименты методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) для определения кинетики и аффинности связывания биспецифических антител CD3 × CD123 с человеческими CD123 SP1 ECD и CD123 SP2 ECD.

Аффинности биспецифических антител 3978, 7955, 7959, 9958, 8876, 8747, 5466 к CD123 × CD3 к рекомбинантному человеческому CD123 SP1 и рекомбинантному человеческому CD123 SP2 ECD измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением прибора Biacore. Кинетические исследования выполняли при 25°C, используя прибор Biacore T200 (Biacore, Inc., в настоящее время входит в GE Healthcare). Специфическое козье антитело к человеческому IgG (Fc) (Jackson ImmunoResearch laboratories продукт № 109-005-098) ковалентно присоединили к покрытым карбоксиметилдекстраном золотым поверхностям сенсорного чипа CM-5 (GE Healthcare). Карбоксиметильные группы декстрана активировали при помощи N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидросукцинимидом (NHS). Антитела к Fc присоединяли при pH 4,5 в 10 mM растворе ацетата натрия. Оставшиеся реакционноспособные сайты на поверхности блокировали путем реакции с этаноламином. Для измерений кинетики связывания антитела к CD123 захватывали на антитела, специфичные к человеческому Fcγ. Было захвачено 40-70 ОЕ антител. После захвата антител выполняли инъекцию человеческого CD123 SP1 или человеческого CD123 SP2 в концентрациях от 0,4 до 400 нМ со скоростью 40 мкл/мин. Данные об ассоциации собирали в течение 2 мин, после чего в течение 10 мин собирали данные о диссоциации. Поверхность регенерировали, используя 30 мкл 100 mM H₃PO₄, 100 мкл/мин, а затем 50 mM NaOH. Образцы для кинетического анализа готовили в буфере на основе PBS (D-PBS, содержащий 3 mM EDTA и 0,005% поверхностно-активного вещества P20). Приведенные данные представляют собой разность сигнала SPR между проточной ячейкой, содержащей захваченное антитело и эталонной ячейкой, не содержащей захваченного антитела. Дополнительно погрешность, вносимую прибором в сигнал, устраняли, вычитая данные пустой инъекции из сигнала с вычтенным эталонным сигналом. Данные анализировали, аппроксимируя фазы ассоциации и диссоциации при всех концентрациях (глобальная аппроксимация) моделью связывания 1:1, используя программное обеспечение BIAevaluation (Biacore, Inc.). В табл. 20 и 21 приводятся сводные результаты по кинетике и аффинности, полученные Biacore. В обеих таблицах приводятся данные, полученные в трех или более независимых экспериментах.

Данные Biacore показывают, что в пределах одного семейства биспецифические антитела, полученные из I3RB18, и биспецифические антитела, полученные из I3RB2, имеют сходные аффинности связывания с CD123 SP1 (табл. 19) и сходные аффинности связывания с CD123 SP2 (табл. 20). Биспецифические антитела, полученные из I3RB18, связываются с рекомбинантным CD123 SP1 более чем в 10 раз сильнее, чем биспецифические антитела, полученные из I3RB2, с аффинностями ~1 нМ и 14 нМ соответственно. При связывании с рекомбинантным CD123 SP2 биспецифические антитела, полученные из I3RB18, связываются более чем в 5 раз сильнее, чем биспецифические антитела, полученные из I3RB2, с аффинностями ~0,3 нМ и 1,7 нМ соответственно. Стандартные отклонения в табл. 19 и 20 показывают очень высокую воспроизводимость данных.

Полученные с помощью Вiasoge данные по кинетике и аффинности связывания биспецифических антител с рекомбинантным человеческим CD123 SP1

ID образца	Обычное название	Средн. k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	Станд. откл. k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	Средн. k_{off} (s^{-1})	Станд. откл. k_{off} (s^{-1})	Средн. K_D (нМ)	Станд. откл. K_D (нМ)
3978	CD123 (B18) x CD3 (B151)	5,64E+05	3,82E+04	8,30E-04	4,70E-05	1,47	0,129
7955	CD123 (B18) x CD3 (B154)	5,62E+05	4,53E+04	8,40E-04	5,30E-05	1,49	0,153
7959	CD123 (B18) x CD3 (B146)	5,79E+05	3,55E+04	8,80E-04	5,40E-05	1,53	0,132
9958	CD123 (B18) x CD3 (B155m)	5,87E+05	4,57E+04	7,90E-04	5,00E-05	1,34	0,135
8876	CD123 (B2) x CD3 (B151)	3,43E+05	1,10E+04	4,90E-03	1,20E-04	14,4	0,583
4435	CD123 (B2) x CD3 (B154)	3,37E+05	1,25E+04	4,80E-03	1,60E-04	14,3	0,713
8747	CD123 (B2) x CD3 (B146)	3,37E+05	1,25E+04	4,80E-03	2,10E-04	14,3	0,821
5466	CD123 (B2)	3,71E+05	6,43E+03	5,10E-03	6,70E-05	13,7	0,298
	x CD3 (B155m)	05					
3244	B21M x B21M	НС	НС	НС	НС	НС	НС
I3RB18	мAb для Fab I3RB119	7,73E+05	5,68E+04	7,20E-04	3,60E-05	0,935	0,083

НС - нет связывания

Полученные с помощью Вiasoge данные по кинетике и аффинности связывания биспецифических антител к CD123 с рекомбинантным человеческим CD123 SP2

ID образца	Обычное название	Средн. k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	Станд. откл. k_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	Средн. k_{off} (c^{-1})	Станд. откл. k_{off} (c^{-1})	Средн. K_D (нМ)	Станд. откл. K_D (нМ)
3978	CD123 (B18) x CD3 (B151)	3,12E+06	6,34E+05	1,10E-03	5,30E-05	0,356	0,074
7955	CD123 (B18) x CD3 (B154)	3,33E+06	9,37E+05	1,10E-03	2,90E-05	0,344	0,097
7959	CD123 (B18) x CD3 (B146)	3,78E+06	5,43E+05	1,30E-03	1,30E-04	0,335	0,06
9958	CD123 (B18) x CD3 (B155m)	3,57E+06	9,82E+05	1,10E-03	6,90E-05	0,311	0,088
8876	CD123 (B2) x CD3 (B151)	2,83E+06	4,07E+05	5,00E-03	1,30E-04	1,75	0,255
4435	CD123 (B2) x CD3 (B154)	2,88E+06	5,51E+05	5,00E-03	3,20E-04	1,74	0,349
8747	CD123 (B2) x CD3 (B146)	3,19E+06	1,05E+06	5,20E-03	4,50E-04	1,63	0,558
5466	CD123 (B2) x CD3 (B155m)	2,88E+06	2,86E+05	4,90E-03	2,80E-04	1,69	0,193
3244	B21M x B21M	НС	НС	НС	НС	НС	НС

НС - нет связывания

Пример 21. Одновалентная аффинность биспецифических антител к CD123 в формате IgG4-РАА к антигену, экспрессированному на поверхности клеток, по данным MSD-CAT.

Одновалентные аффинности выбранных биспецифических антител к CD123 к экспрессированным на клеточной поверхности hCD123 SP1 и SP2 получали с использованием методики MSD-Cell Affinity Technique (MSD-CAT). MSD-CAT был разработан как собственный метод без использования меток, предназначенный для определения аффинности на интактных клетках в формате, обеспечивающем высокую производительность. Эти эксперименты выполняли для оценки аффинности и специфичности связывания потенциальных антител к CD123 с экспрессированными на клеточной поверхности молекулами CD123 SP1 и CD123 SP2 человека. Использовались человеческие клеточные линии pDisplay CD123SP1 и pDisplay CD123SP2. Использовали антитело, являющееся отрицательным контролем, для проверки того, связывается ли каркас биспецифических антител неспецифическим образом с клетками, и для дифференциации неспецифического и специфического связывания с CD123. Чтобы измерить аффинность этих взаимодействий с использованием метода MSD-CAT, приготовили серию смесей с фиксированной концентрацией антител к CD123 (800, 160, 32 и 6 пМ) и различными концентрациями клеток (от 20 миллионов до 1016 клеток/мл) и дали им достичь равновесия путем вращательного перемешивания планшетов в течение 24 ч при 4°C. Эти образцы были приготовлены в среде DMEM GlutaMax, содержащей 0,05% азида, 1% BSA и 3 мМ EDTA. Количества рецепторов, составлявшие $(0,29-1,08) \times 10^6$ hCD123 SP1/клетка и $(0,57-1,5) \times 10^6$ hCD123 SP2/клетка, конвертировали в молярную концентрацию рецепторов в смеси, основываясь на объеме реакционной смеси, плотности клеток (клеток/л) и числе Авогадро. Это давало концентрации в диапазоне от 35 нМ до 0,5 М для человеческого CD123 SP1; и от 49 нМ до 0,97 пМ для человеческого CD123 SP2. После доведения до равновесия планшет центрифугировали в течение 5 мин при ~1000 об/мин и определяли в супернатанте свободные антитела к CD3. Свободные антитела к CD123 в смеси определяли по электрохемилюминесценции (ECL) с использованием сканера Mesoscale Discovery (MSD). Для определения антител к CD123 в доведенной до равновесия смеси методом электрохемилю-

минесцентного иммуноанализа (ECL) были приготовлены планшеты для обнаружения. Чтобы приготовить планшеты для обнаружения (антиген, связанный с планшетами SA-MSD), стандартные планшеты MSD со стрептавидином блокировали буфером для анализа по 50 мкл/лунка (PBS, (Life Sciences GIBCO 14190-136), 0,05% твин 20, 0,2% BSA) в течение 5 мин. Буфер для анализа удаляли без промывки и в планшеты MSD добавляли по 50 мкл/лунка 0,7 мкг/мл биотинилированного антигена в буфере для анализа и инкубировали в течение ночи (~16 ч при 4 °С). После инкубации в течение ночи планшеты блокировали, добавляя по 150 мкл/лунка буфера для анализа без удаления покрывающего антигена, инкубировали в течение ~1 ч при температуре окружающей среды и промывали 5 раз промывочным буфером (буфер для анализа без BSA). Из планшета с образцами переносили по 50 мкл/лунка супернатантов в покрытые антигеном планшеты, инкубировали в течение 60 мин, а затем 3 раза промывали промывочным буфером. После этого добавляли по 50 мкл в лунку меченных рутением детектирующих антител (к человеческим H+L) и инкубировали в течение 1 ч. Через 1 ч планшеты промывали промывочным буфером и добавляли по 150 мкл в лунку буфера для считывания MSD (Read Buffer T 4X, R92TD-2, MSD). После этого планшеты сразу же сканировали на сканере MSD Sector Imager 6000a, определяя уровни люминесценции. Сигнал ECL, определенный сканером MSD, выражали в % свободного антитела в смеси и данные анализировали для определения аффинности с применением пользовательского уравнения (выведенного на основании закона действующих масс), введенного в программное обеспечение Prism. Результаты экспериментов с MSD-CAT представлены в табл. 21.

Таблица 21

Полученные методом MSD-CAT данные об аффинности антител к CD123 с экспрессированным на поверхности клеток человеческим CD123 SP1 и человеческим CD123 SP2

Данные были аппроксимированы моделью связывания 1:1 с помощью нелинейного метода наименьших квадратов.

ID образца	K_D , [пМ] человека Клетки CD123 SP1	K_D , [пМ] человека Клетки CD123 SP2
3978	153 ± 124	528 ± 296
7955	136 ± 105	436 ± 255
7959	149 ± 98	461 ± 290
9958	121 ± 80	538 ± 430
8876	1291 ± 556	2450 ± 2104
4435	1531 ± 1093	3701 ± 1898
8747	1761 ± 1337	2211 ± 1003
5466	2431 ± 1222	1722 ± 1638
3244	Нет связывания	Нет связывания
mAb I3RB18	* 47 ± 14	* 49 ± 36
mAb I3RB2	Н/Д	* 36 ± 20

Н/Д=нет данных, анализ не выполнялся

Измеренные методом MSD-CAT аффинности биспецифических антител к экспрессированному на поверхности клеток CD123 SP1 были более чем в 6 раз выше, чем по данным SPR для рекомбинантного CD123 SP1; однако аффинности к экспрессированному на поверхности клеток CD123 SP2 были сходными с аффинностями к рекомбинантному CD123 SP2 (разница < чем в 2 раза). Разница в аффинностях к CD123 SP1 по данным SPR и MSD-CAT, вероятнее всего, обусловлена презентацией антигена на клеточной поверхности в сравнении с рекомбинантным антигеном. Анализ MSD-CAT показал, что биспецифические антитела, полученные из I3RB18 (3978, 7955, 7959, 9958), лучше всего связываются с экспрессированным на поверхности клеток человеческого CD123 SP1 и человеческого CD123 SP2 с пикомолярными аффинностями. Аффинности биспецифических антител, полученных из I3RB18, приблизительно в 10 раз и приблизительно в 5 раз выше, чем аффинности биспецифических антител, производных от I3RB2, по отношению к экспрессированному на поверхности CD123 SP1 и CD123 SP2 соответственно. Аффинно-

сти биспецифических антител в пределах одного семейства были сходными.

В целом анализы молекулярных взаимодействий методами Biacore и MSD-CAT согласуются, демонстрируя, что биспецифические антитела, полученные из I3RB18, прочнее связываются с рекомбинантным и экспрессированным на поверхности клеток CD123 (SP1 и SP2), чем биспецифические антитела, полученные из I3RB2.

Пример 22. Одновалентная аффинность к CD123 биспецифических антител в формате IgG4-РАА к антигену, экспрессированному на поверхности клеток, по данным проточной цитометрии.

Проточную цитометрию использовали для измерения значений аффинности нескольких биспецифических антител к CD123 × CD3 к CD3 на человеческих Т-клетках (Biological Specialty, Colmar, США) и Т-клетках яванского макака (Zen Bio, Triangle Research Park, США). Формат исследования включал в себя конкурентное связывание с использованием фиксированной концентрации меченых mAb к CD3 известной аффинности и повышающихся концентраций немеченых исследуемых mAb (Ashkenazi A. et al. PNAS: 88:10535, 1991). Использовали моноклональное антитело к CD3 CD3B146 hu IgG1-AlaAla F405L со значением аффинности, сходным с SP34-2. Величину K_d для SP34-2 определяли с использованием связывания с насыщением, и примеры кривых связывания с Т-клетками человека и яванского макака показаны на фиг. 29. На фиг. 30 представлено конкурентное связывание с меченым B146 и с различными концентрациями немеченых биспецифических антител к CD123 × CD3, полученное для Т-клеток человека (фиг. 30 А) и яванского макака (фиг. 30В). Значения, полученные для Т-клеток человека и яванского макака, были сопоставимыми. Среди проанализированных образцов наблюдались три группы аффинности к CD3: высокая (9-15 нМ), средняя (25-50 нМ) и низкая (110-270 нМ), данные по которым сведены в табл. 22.

Таблица 22

Значения аффинности (K_d) биспецифических антител CD123 × CD3 к Т-клеткам человека и яванского макака - конкурентное связывание с использованием меченых антител B146 и повышающихся концентраций немеченых антител

	Т-клетки человека	Т-клетки яванского макака
Биспецифические антитела	K_d (нМ)	K_d (нМ)
3978	241,2 +/- 57,3	215,0 +/- 17,1
8876	169,2 +/- 27,9	109,6 +/- 4,8
CD123 пустое 2	266 +/- 78,0	217 +/- 18,0
7955	209,6 +/- 31,8	169,1 +/- 8,8
4435	173,6 +/- 48,6	138,9 +/- 2,8
CD123 пустое 3	200,5 +/- 67,3	236,7 +/- 16,4
7959	11,0 +/- 4,3	11,2 +/- 0,3
8747	9,6 +/- 1,5	9,5 +/- 0,1
CD123 пустое 1	13,2 +/- 3,0	13,4 +/- 0,3
9958	43,0 +/- 10,6	29,1 +/- 1,2
5466	27,9 +/- 9,3	25,3 +/- 1,1
CD123 пустое 4	48,6 +/- 14,8	36,8 +/- 0,5
CD3B146	3,2 +/- 1,2	1,1 +/- 0,1

Пример 23. Оценка биспецифических антител IgG4-РАА CD123 × CD3 в функциональном тесте уничтожения клеток.

Анализ опосредуемой Т-клетками цитотоксичности, описанный в примере 16, использовали для оценки способности биспецифических антител CD123 × CD3 к лизису клеток с использованием Т-клеток от двух здоровых доноров. Для этих экспериментов использовали клетки OCI-AML5, KG-1 и JIM3. JIM3 представляет собой миеломную клеточную линию без экспрессии CD123, и она была использована в качестве контроля. Клетки обрабатывали биспецифическими антителами в течение 48 ч. Соотношение Е:Т

для этого исследования составило 5:1, и для блокирования функций Fc-области был добавлен блокатор Fc в концентрации 2 мг/мл.

Представлены результаты по опосредованному Т-клетками лизису клеточных линий OCI-AML (фиг. 31), KG-1 (фиг. 32) и JM3 (фиг. 33) после 48 ч инкубации при 37°C, 5% CO₂. MV4-11 и OCI-AML 5 представляют собой клеточные линии с экспрессией CD123, а JM3 не имеет или имеет очень низкую экспрессию CD123. Соотношение эффектор/мишень для данного исследования составляло 5:1. Для блокировки функции Fc добавляли аликвоту 2 мг/мл Fc-блокатора.

Результаты сходны с предыдущими экспериментами по уничтожению клеток с использованием биспецифических антител к CD123 × CD3 в формате IgG1-AA. Как антитело I3RB217 (I3RB18), так и антитело I3RB218 (I3RB2) при объединении с антителом к CD3 в биспецифический формат эффективно осуществляли специфическое уничтожение клеток CD123+. Уничтожение клеток является специфичным к CD123-содержащим клеткам, что подтверждается отсутствием эффекта в отношении клеток JM3. Более того, данные позволяют четко ранжировать биспецифические антитела I3RB218 (на основе I3RB2) и I3RB217 (на основе I3RB18), причем биспецифические антитела I3RB217 × CD3 являются более эффективными, чем биспецифические антитела I3RB218 × CD3, что согласуется с предыдущими данными по уничтожению клеток.

Пример 24. Анализ биспецифических антител в тесте на гетеродимеризацию рецептора.

Тест на димеризацию рецептора DiscoverX для IL3RA/CD131 (DiscoverX 93-0969-C1) применили для анализа способности антител к CD123 предотвращать индуцированную IL3 гетеродимеризацию IL3Ra(CD123)/IL3RP(CD131). Молекулы CD123 и CD131 метили при помощи ProLink™ (PK) или Enzyme Acceptor (EA). При индуцированной IL3 активации эти белки димеризуются с образованием рецептора к IL3, заставляя два компонента β-gal дополнять друг друга и формировать активный фермент. Активный β-gal генерирует сигнал хемилюминесценции в присутствии субстрата. Антитела к CD123 или биспецифические антитела, демонстрирующие уменьшение сигнала при увеличении концентрации антител, способны предотвращать гетеродимеризацию.

Клетки тестировали на увеличение ферментативной активности в присутствии лиганда IL-3 с применением проявляющих реагентов PathHunter® (DiscoverX) согласно протоколу производителя. Клеточные линии HEK293 IL3RA-PK/CSF2RB-EA высевали в 20 мкл среды для анализа в четырех повторах на 384-луночные планшеты по 5000 клеток/луночка. Маточные растворы антител последовательно разводили в 0,1% BSA/PBS так, чтобы высокая концентрация соединения составляла 10 мкг/мл. Высокую дозу последовательно разводили в соотношении 1:3 и тестировали 11 доз. В лунки добавляли по 5 мкл разведенного антитела. Клетки инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Маточный раствор рекомбинантного человеческого IL-3 с концентрацией 100 мкг/мл разводили таким образом, чтобы в каждую лунку добавлять по 5 мкл раствора с концентрацией 60 нг/мл IL-3. Итоговая концентрация IL-3 составила 10 нг/мл. Клетки инкубировали в течение дополнительных 6 ч при 37°C. К клеткам добавляли проявляющий реагент PathHunter Flash Detection Reagent, содержащий лизирующий буфер и субстрат фермента, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и сканировали на люминометре Envision. Данные проанализировали с помощью статистического программного пакета GraphPad Prism 6. Кривые аппроксимировали сигмовидной кривой доза-ответ с переменным наклоном (четырепараметрической), без ограничений; метод аппроксимации=наименьшие квадраты (нормальная подгонка).

В анализе тестировали биспецифические антитела IgG4 PAA 8747 и 7959, а также их исходные антитела I3RB218 и I3RB217. Анализ проводили два независимых раза в присутствии 10 нг/мл IL-3, а для сравнения в исследовании применяли положительный контроль антитело 7G3 к CD123. Антитела, содержавшие последовательность плеча к CD123 антитела I3RB18, т.е. I3RB217 и 7959 (фиг. 34C и D), оказались способны предотвращать образование функционального рецептора к IL-3 в присутствии лиганда IL-3. Антитела, содержавшие последовательность плеча к CD123 антитела I3RB2, т.е. I3RB218 и 8747 (фиг. 34 A и B), не предотвращали в этом тесте образование функционального рецептора к IL-3. Это согласуется с предыдущими данными, показавшими, что I3RB18 может ингибировать нижележащую сигнализацию, связанную с функциональным рецептором IL-3.

Пример 24. Оценка нескольких биспецифических антител в модели опухоли KG-1.

Несколько биспецифических антител CD123 × CD3 оценивали на эффективность в модели острого миелолейкоза (AML) на мышах с клетками KG-1, как описано выше. Протокол был таким же, как в исследованиях по примерам 16 и 17, за исключением того, что для тестирования биспецифических антител IgG4 использовали флаконы с выделенными человеческими моноклеарами периферической крови (100×10⁶ клеток во флаконе, кат. № PB009-3), приобретенные в компании NemaCare (г. Ван-Найс, штат Калифорния, США). Мышам NSG подкожно инокулировали клетки KG-1, а затем после формирования опухоли (средний объем опухоли=135,7±4,7 мм³), им внутривенно прививали человеческие PBMC. Далее мышам вводили биспецифические антитела IgG4 PAA к CD123 × CD3 с различными аффинностями и контрольные биспецифические антитела в разных дозах, как описано в табл. 23.

График введения доз для 3-го исследования in vivo

Группа	Кол-во	Опухоль	РВМС	Лечение	Доза (мкг/животное)	Путь введения	График введений (дни после имплантации опухоли)	Отбор крови (дни после имплантации и опухоли)
1	10	+	+	PBS	0	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
2	10	+	+	7959	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
3	10	+	+	7959	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
4	10	+	+	9958	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
5	10	+	+	9958	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
6	10	+	+	8747	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
7	10	+	+	8747	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
8	10	+	+	8747	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
9	10	+	+	3978	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
10	10	+	+	3978	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
11	10	+	+	3978	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
12	10	+	+	8876	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
13	10	+	+	8876	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
14	10	+	+	8876	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
15	10	+	+	CD3 пустое 1	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
16	10	+	+	CD3 пустое 1	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
17	10	+	+	CD3 пустое 1	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
18	10	+	+	CD3 пустое 2	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
19	10	+	+	CD3 пустое 2	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
20	10	+	+	CD3 пустое 2	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
21	10	+	+	CD123 пустое 1	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
22	10	+	+	CD123 пустое 1	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
23	10	+	+	CD123 пустое 1	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
24	10	+	+	CD123 пустое 2	0,1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
25	10	+	+	CD123 пустое 2	1	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31
26	10	+	+	CD123 пустое 2	10	в/в	14, 16, 18, 21, 23	31

Результаты исследования эффективности in vivo нескольких биспецифических антител к CD123 × CD3 представлены на фиг. 35-42. На фиг. 35-38 показана эффективность биспецифических антител CD123 × CD3 IgG4-PAA с разными аффинностями и разными дозами при ксенотрансплантации клеток KG-1 человеческого AML. На фиг. 35 биспецифические антитела с высокоаффинными плечами CD123 и CD3 проявили существенную эффективность в сравнении с PBS и контрольными биспецифическими антителами с 25-го по 36-й день после имплантации опухоли ($p < 0,001$). Биспецифическое антитело 9958 в дозе 1 мкг имело существенную эффективность по сравнению с дозой 0,1 мкг и обеими дозами биспецифического антитела 7959 к 36-му дню после имплантации опухоли ($p < 0,01$). Это указывает, что высокая аффинность плеч CD123 и CD3 является необходимой для выраженной эффективности в данной модели.

На фиг. 36 показано, что биспецифическое антитело 3978 в дозе 10 мкг проявило существенную эффективность в сравнении с PBS и контрольными биспецифическими антителами, начиная с 28-го дня ($p < 0,05$) и до 36-го дня ($p < 0,001$) после имплантации опухоли, в дозе 1 мкг с 32-го дня ($p < 0,05$) и до 36-го дня ($p < 0,01$) после имплантации опухоли, а в дозе 0,1 мкг с 32-го дня ($p < 0,01$) и до 36-го дня ($p < 0,001$) после имплантации опухоли. У данного биспецифического антитела имеется дозозависимый ответ, что указывает на то, что высокоаффинное плечо CD123 в высокой дозе может обеспечивать эффективность в этой модели.

На фиг. 37 показано, что биспецифическое антитело 8747 в дозе 0,1 мкг проявило существенную

эффективность в сравнении с PBS и контрольными биспецифическими антителами с 32-го по 36-й день после имплантации опухоли ($p < 0,001$) и по сравнению с дозами 1 и 10 мкг к 36-му дню после имплантации опухоли ($p < 0,001$). Это показывает, что высокоаффинное плечо CD3 при низкой дозе обеспечивает эффективность в этой модели.

На фиг. 38 показано, что биспецифическое антитело 8876 не проявляло существенной эффективности в сравнении с PBS и контрольными биспецифическими антителами ни в одной из доз.

На фиг. 39-42 показано среднее изменение массы тела в экспериментальных группах с течением времени. Как описывалось ранее, потеря массы тела коррелирует с началом и тяжестью GVHD, вызванной активированными Т-клетками.

Животные, получавшие биспецифическое антитело 7959 в дозе 0,1 мкг или биспецифическое антитело 9958 в дозе 1 мкг, имели более выраженную и раньше начинающуюся потерю массы тела по сравнению с животными, получавшими PBS, контрольные биспецифические антитела и другие дозы биспецифических антител 7959 и 9958 (фиг. 39). Эти данные коррелируют с существенной противоопухолевой эффективностью, наблюдаемой при введении дозы 1 мкг биспецифического антитела 9958 (фиг. 35).

Животные, получавшие биспецифическое антитело 3978 в дозе 10 мкг, имели более выраженную и раньше начинающуюся потерю массы тела по сравнению с животными, получавшими PBS и контрольные биспецифические антитела (фиг. 40). У мышей, получавших дозы 1 и 0,1 мкг, наблюдалась дозозависимая потеря массы тела. Эта дозозависимая потеря массы тела коррелировала с дозозависимой противоопухолевой эффективностью, показанной на фиг. 36).

Животные, получавшие биспецифическое антитело 8747 в дозе 0,1 мкг, имели потерю массы тела, сходную с таковой у группы, получавшей PBS, однако мыши снова набирали массу тела, начиная с 39-го дня после имплантации опухоли (фиг. 41). При использовании доз 1 или 10 мкг потеря массы тела не наблюдалась. Потеря массы тела при дозе 0,1 мкг коррелировала с противоопухолевой эффективностью, наблюдаемой при этой дозе (фиг. 37).

У животных, получавших биспецифическое антитело 8876, не наблюдали потерю массы тела, отличную от таковой у мышей, получавших PBS или контрольные биспецифические антитела (фиг. 42), что согласовалось с отсутствием противоопухолевого эффекта у этого биспецифического антитела (фиг. 38).

Таким образом, биспецифические антитела к CD123 × CD3 проявляли устойчивую эффективность относительно экспрессирующих CD123 клеток человеческого AML, KG-1, только в присутствии эффекторных клеток (Т-лимфоцитов). Экспансия Т-клеток наблюдалась вскоре после введения препарата и только при наличии заболевания (ксенотранспланта KG-1). Кроме этого, эффективность биспецифических антител коррелировала с началом реакции "трансплантат против хозяина" (GVHD) согласно данным по снижению массы тела, и это указывает на присутствие активированных Т-лимфоцитов. В совокупности эти данные показывают, что биспецифическое антитело к CD123 × CD3 обладало противоопухолевой эффективностью, опосредованной через предполагаемый механизм, с вовлечением клеток-мишеней и эффекторных клеток, и уничтожение мишеней Т-клетками.

Пример 24. Фармакокинетические исследования *in vivo* на мышах.

Исследуемые препараты антител были приготовлены в фосфатно-солевом буферном растворе в концентрации 0,2 мг/мл. Концентрации были подтверждены с помощью спектрофотометра Nanodrop, а затем препараты стерильно профильтровали через 0,2-микронные шприцевые фильтры.

Трансгенные животные, использованные в этих исследованиях, были получены от мышей C57BL/6. Линия Tg32, лицензированная Jackson Laboratory (Bar Harbor), имеет нокаут гена эндогенного мышинового FcR α и является трансгенной по человеческому гену FcR α , находящемуся под контролем нативного промотора человеческого гена. Линия Tg32 hemi представляет собой мышей, гемизиготных по трансгену FcR α , и она была получена путем скрещивания гомозиготных трансгенных мышей с мышами, нокаутными по FcR α . Наблюдается существенная корреляция между фармакокинетикой человеческих антител или фармакокинетикой антител приматов и мышинной моделью Tg32 hemi, и, следовательно, она была использована в последующих фармакокинетических исследованиях для оценки периода полужизни антител. Разведение мышей полностью проводили в SAGE Research Labs Boyertown, Пенсильванское отделение, США.

Для настоящего исследования использовали мышей в возрасте 6 недель, и 48 самкам мышей Tg32 hemi внутривенно вводили биспецифические антитела hIgG4-РАА, разделив мышей на группы по 5 животных. В одни и те же сроки выполняли отбор крови из ретроорбитального синуса.

После отбора образцов проводили анализ сыворотки. Концентрацию человеческого IgG в образцах сыворотки определяли с помощью электрохемилюминесцентного иммуноанализа в формате MESO Scale Discovery (MSD). На планшеты MSD со стрептавидином наносили 50 мкл/лунка раствора биотинилированного F(ab')₂ козьего антитела к человеческому IgG (H+L, Jackson lot 109-066-08) в концентрации 2 мкг/мл в буфере Starting Block T20 (Thermo) на ночь, 4°C. Планшеты промывали буфером PBS и образцы разводили в 10% мышинной сыворотке (Bioreclamations, г. Нью-Йорк, США) в буфере Starting Block T20. На каждый планшет помещали стандартную калибровку каждого исследуемого препарата, начиная от 0,1

мг/мл, с последовательными 2-кратными разведениями. Планшеты инкубировали 2-3 ч при комнатной температуре, промывали, а затем инкубировали с 2 мкг/мл MSD-TAG (меченное ругением mAb к человеческому IgG, R10Z8E9, MSD) в течение 1 ч при комнатной температуре на встряхивателе. Планшеты промывали, добавляли 200 мкл буфера для считывания MSD Read Buffer (MSD) и сканировали на приборе MSD Sector Imager 6000.

Чтобы определить, имеются ли в образцах сыворотки для фармакокинетических (ФК) исследований заметные иммунные титры, способные повлиять на ФК исследуемых образцов, был выполнен анализ ELISA на планшетах Maxisorb (Nunc), покрытых соответствующим исследуемым препаратом в концентрации 10 мкг/мл и проинкубированных в течение ночи при 4°C. Образцы сыворотки разводили в 1% BSA-PBS и инкубировали на планшетах в течение 2-3 ч со встряхиванием при комнатной температуре. Конъюгированные с пероксидазой хрена ослиные антитела к мышиному IgG (Jackson ImmunoResearch) использовали для обнаружения захваченного антитела; после чего наносили 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (Fitzgerald) для проявления субстрата. Планшеты сканировали и положительными считали показания спектрофотометра, в три раза превышающие показания для буфера или контрольной сыворотки. Иммунные титры выражали в виде 1/разведение сыворотки. Иммунные титры не наблюдались (данные не показаны).

И, наконец, определяли фармакокинетику молекул. Расчеты конечного периода полужизни ($t_{1/2}$) фазы элиминации в ФК-исследованиях проводили с использованием 1-фазной модели экспоненциального спада, с аппроксимацией линейной регрессией зависимости натурального логарифма концентрации от времени с использованием программного обеспечения Prism версии 5.01 (GraphPad Software, Inc.). Двух-фазные модели были исключены, поскольку для каждого исследуемого препарата моделью с наилучшей аппроксимацией была 1-фазная модель экспоненциального спада, что определялось незначимостью F-критерия дополнительной суммы квадратов ($p > 0,05$) для большинства животных. Модель нелинейного спада, полученная методом наименьших квадратов, взвешивалась по величине 1/аппроксимированная концентрация. Период полужизни для фазы элиминации определялся по формуле $t_{1/2} = \ln 2 / \beta$, где β представляет собой наклон линии, аппроксимированной в регрессионном анализе методом наименьших квадратов, начиная после первой дозы.

В описанном здесь ФК-исследовании конечный период полужизни антитела определяли, взяв среднее от значений $t_{1/2}$, вычисленных для каждого животного в экспериментальной группе. Резкими отклонениями при исследовании считали животных, либо демонстрирующих титр мышиных антител к человеческому IgG больше, чем 1 к 1000 приблизительно через 7 дней после введения дозы, либо с исходным значением для сыворотки, более чем в 2 раза ниже, чем у других мышей в группе, что могло быть обусловлено неполным введением.

Прогнозы ФК для человека по данным на мышах основывались на наблюдавшихся различиях в периоде полужизни у трансгенных по huFcRn мышей и у человека для панели из восьми человеческих антител IgG, на выведение которых, как считается, существенно не влияет их связывание с мишенью ни у мышей, ни у человека. На основании этих анализов предположили, что конечный период полужизни для биспецифических антител CD123 × CD3 будет в 2-4 раза дольше, чем наблюдаемый у трансгенных по huFcRn мышей, и при этой экстраполяции подразумевается, что влияние связывания с мишенью на выведение у мышей и у человека сопоставимо. В таблице 24 сведены наблюдавшиеся значения периода полужизни различных вариантов биспецифических антител и соответствующие прогнозируемые значения для человека, отражающие указанное допущение. Поскольку общеизвестный способ прогнозирования ФК для человека, основанный на аллометрическом масштабировании для разных видов, не прошел валидацию по данным мышинной ФК, аллометрическое масштабирование для прогнозирования не использовали. Результаты по ФК представлены на фиг. 43 с графиком зависимости концентрации в сыворотке от времени. Профили ФК демонстрируют линейный спад концентрации в сыворотке в течение 28 дней. Расчетные значения периода полужизни для всех биспецифических антител к CD123 × CD3 были сходными, 5,2-6,6 дня. Во всех группах наблюдались минимальные иммунные титры (<1:40). Данные по ФК у мышей (среднее значение ± стандартное отклонение), а также прогнозируемый клиренс и период полужизни у человека сведены в табл. 24. При прогнозе периода полужизни у человека делается допущение, что связывание с мишенью у человека не превышает таковое у мышей.

Для биспецифических антител IgG4-РАА наблюдались сходные значения в группах I3RB2 и I3RB18 у мышей. Расчеты периода полужизни фазы элиминации проводили с использованием 1-фазной модели экспоненциального спада, с аппроксимацией линейной регрессией зависимости натурального логарифма концентрации от времени, как указано в описании. Значения периода полужизни, вычисленные для восьми биспецифических антител на мышах Tg32 hem1, составили 3978, $6,6 \pm 0,7$ дня; 7955, $5,2 \pm 0,4$ дня; 7959, $6,6 \pm 0,6$ дня; 9958, $6,4 \pm 0,7$ дня; 8876, $4,1 \pm 0,7$ дня; 4435, $5,4 \pm 1,0$ дня; 8747, $6,4 \pm 0,4$ дня; 5466, $5,6 \pm 0,1$ дня. Прогнозы ФК для человека по данным на мышах основывались на наблюдавшихся различиях во времени полужизни у трансгенных по huFcRn мышей и у человека. На основании этих анализов конечный период полужизни у человека биспецифических антител CD123 × CD3 будет в 2-4 раза продолжительнее, чем наблюдавшийся у трансгенных по huFcRn мышей, при допущении, что влияние

связывания с мишенью на выведение у мышей и у человека сопоставимо. В табл. 24 сведены наблюдавшиеся значения периода полужизни различных биспецифических антител и соответствующие прогнозируемые значения для человека, отражающие указанное допущение.

Таблица 24

Сводные данные по ФК биспецифических антител IgG4-РАА к CD123 × CD3

Биспецифическое антитело	Животное №	t1/2 (дни)	Средн. расч. t1/2 (дни)	Прогноз t1/2 (дни)
3978	2	6,71	6,59±0,66	13,2-26,4
	5	7,08		
	7	5,44		
	22	7,02		
	28	6,71		
7955	1	4,85	5,24±0,43	10,5-21,0
	6	4,80		
	8	5,31		
	9	5,39		
	10	5,85		
7959	3	6,31	6,63±0,57	13,2-26,4
	12	7,53		
	13	6,28		
	16	6,86		
	33	6,16		
9958	4	7,15	6,36±0,68	12,7-25,4
	15	5,60		
	18	6,88		
	19	5,77		
	20	6,40		
8876	21	4,65	5,19±0,70	10,4-20,8
	22	6,05		
	23	4,40		
	24	5,10		
	35	5,73		
4435	17	5,39	5,42±0,95	10,8-21,6
	27	3,96		
	29	5,66		
	30	5,47		
	36	6,60		
8747	14	6,38	6,37±0,37	12,7-25,4
	25	6,49		
	31	5,78		
	32	6,80		
	34	6,41		
5466	26	4,81	5,64±0,96	11,3-22,6
	37	5,68		
	38	4,53		
	39	6,61		
	40	6,54		

Результаты фармакокинетических исследований биспецифических антител к CD123 × CD3 на мышах показывают, что наблюдавшиеся у мышей Tg32 hemi значения t1/2 выгодно сравнимы с 8 клиническими антителами, профиль которых был получен сходным образом. (Tam, et al., MAbs (2013) 5(3):3987-405).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к CD123 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

а) тяжелую цепь и легкую цепь, имеющие

CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 012,

CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 013,

CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 014,

CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 015,

CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 016 и

CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 017; или

b) тяжелую цепь и легкую цепь, имеющие

CDR1 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 051,

CDR2 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 052,

CDR3 тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 053,

CDR1 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 024,

CDR2 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 025 и

CDR3 легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 054.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, в котором тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 136, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, которые имеют изотип IgG1 или IgG4.

5. Выделенное биспецифическое антитело к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первую тяжелую цепь (HC1), вторую тяжелую цепь (HC2), первую легкую цепь (LC1) и вторую легкую цепь (LC2), причем

HC1 и LC1 спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD123 (IL3-R α), а

HC2 и LC2 спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3,

или его биспецифический фрагмент, связывающийся с CD123 (IL3-R α) \times CD3, при этом

i) HC1 и LC1 содержат любую из следующих пар:

a) SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 204; или

b) SEQ ID NO: 205 и SEQ ID NO: 206 соответственно; и

ii) HC2 и LC2 содержат любую из следующих пар:

a) SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 194;

b) SEQ ID NO: 195 и SEQ ID NO: 196;

c) SEQ ID NO: 197 и SEQ ID NO: 198;

d) SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 200 или

e) SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 202 соответственно.

6. Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.5, в котором HC1 содержит SEQ ID NO: 203, и LC1 содержит SEQ ID NO: 204, HC2 содержит SEQ ID NO: 193, и LC2 содержит SEQ ID NO: 194.

7. Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.5, в котором HC1 содержит SEQ ID NO: 205, и LC1 содержит SEQ ID NO: 206, HC2 содержит SEQ ID NO: 193, и LC2 содержит SEQ ID NO: 194.

8. Выделенное биспецифическое антитело к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первую тяжелую цепь (HC1), вторую тяжелую цепь (HC2), первую легкую цепь (LC1) и вторую легкую цепь (LC2), причем

HC1 и LC1 спариваются с образованием первого антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD123 (IL3-R α), а

HC2 и LC2 спариваются с образованием второго антигенсвязывающего участка, который иммуноспецифически связывается с CD3,

или его биспецифический фрагмент, связывающийся с CD123 (IL3-R α) \times CD3, где

a) спаренные тяжелая и легкая цепи иммуноспецифически связываются с CD3, где

указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 184, и указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 190; и

b) спаренные тяжелая и легкая цепи иммуноспецифически связываются с CD123, где

i) указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 120, а указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 165; или

ii) указанная тяжелая цепь содержит SEQ ID NO: 136, а указанная легкая цепь содержит SEQ ID NO: 168.

9. Выделенная клетка, экспрессирующая выделенное биспецифическое антитело к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.5-8.

10. Способ лечения субъекта, имеющего рак с клетками, экспрессирующими CD123, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из пп.5-8 пациенту в течение времени, достаточного для лечения рака.

11. Способ ингибирования роста или пролиферации раковых клеток, экспрессирующих CD123, включающий

введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из пп.5-8 для ингибирования роста или пролиферации раковых клеток.

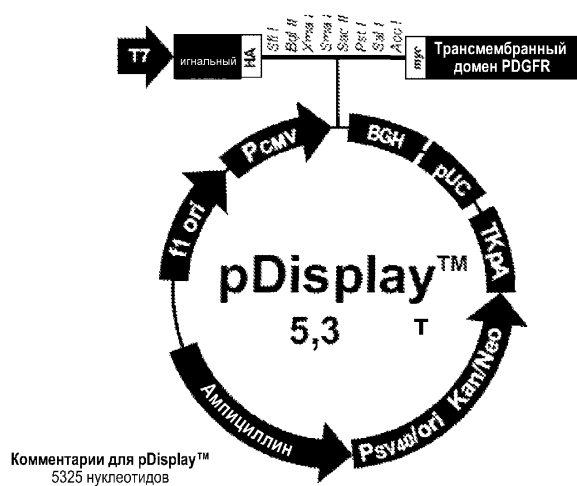
12. Способ перенаправления Т-клеток к экспрессирующей CD123 раковой клетке, включающий введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или биспецифического связывающего фрагмента по любому из пп.5-8 для перенаправления Т-клетки к раковому поражению.

13. Фармацевтическая композиция для лечения рака с клетками, экспрессирующими CD123, содержащая биспецифическое антитело к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по любому из пп.5-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Выделенный синтетический полинуклеотид, кодирующий антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.5-8.

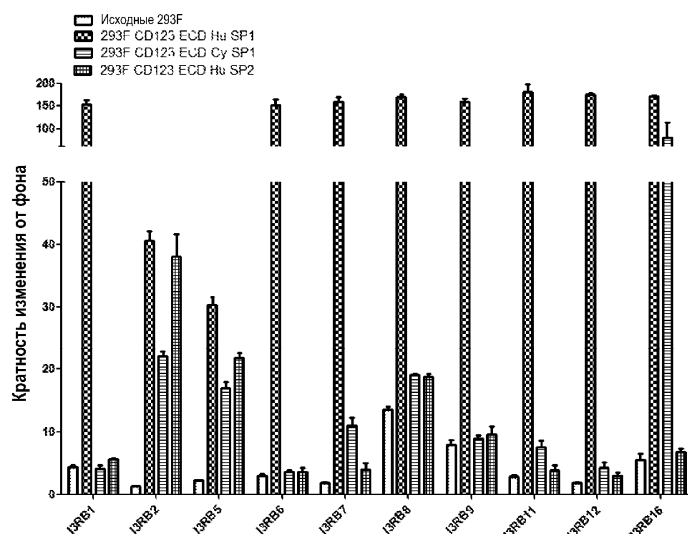
15. Набор для детекции клеток, экспрессирующих CD123, отличающийся тем, что содержит биспецифическое антитело к CD123 (IL3-R α) \times CD3 или биспецифический связывающий фрагмент по любому из пп.5-8.

16. Биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.5-8, которые иммуноспецифически связываются с CD123 SP2 (IL-3R α) и CD123 SP1 (IL3R α).

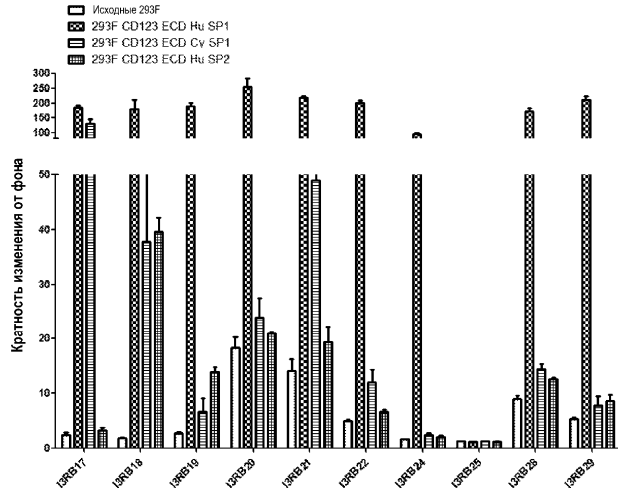


Фиг. 1

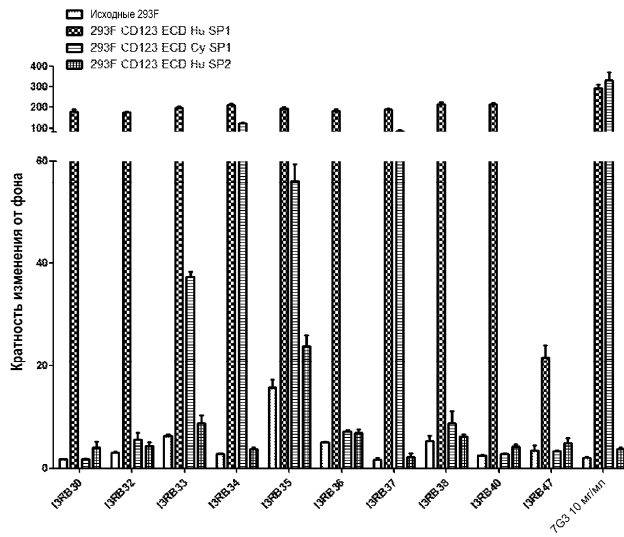
а)



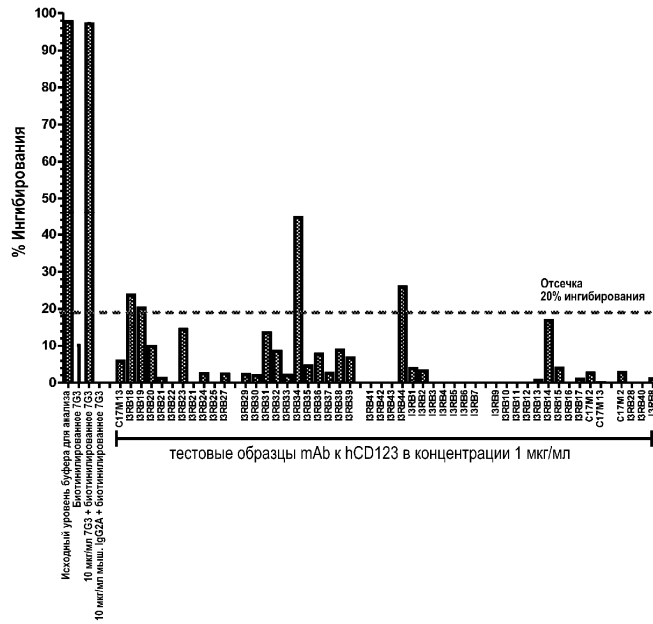
Фиг. 2А



Фиг. 2В

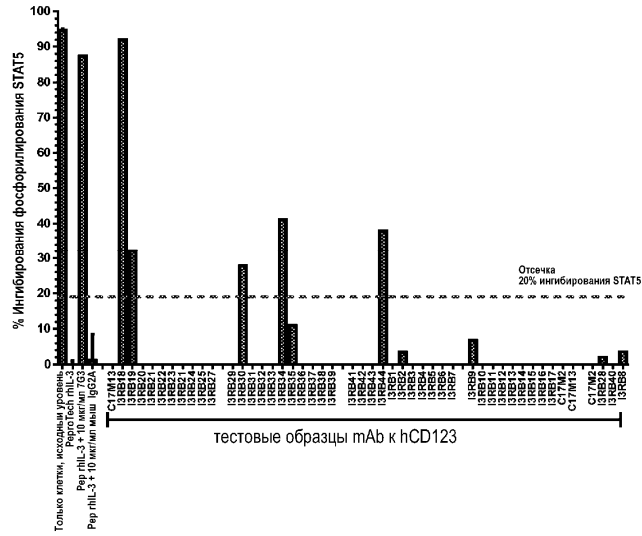


Фиг. 2С

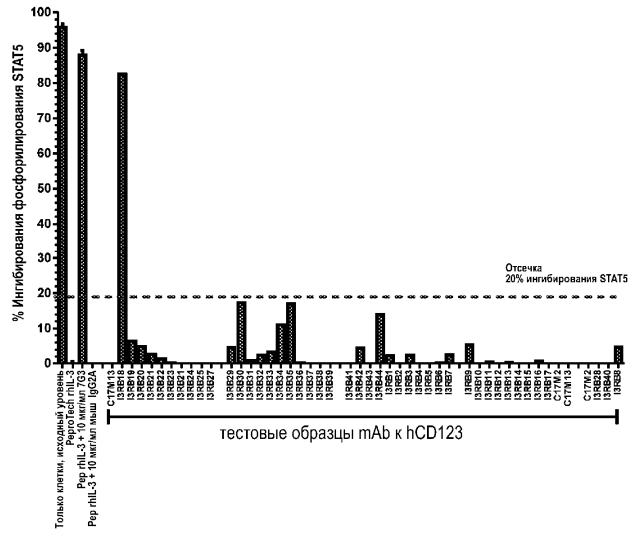


Фиг. 3

А) (Неразведенные)

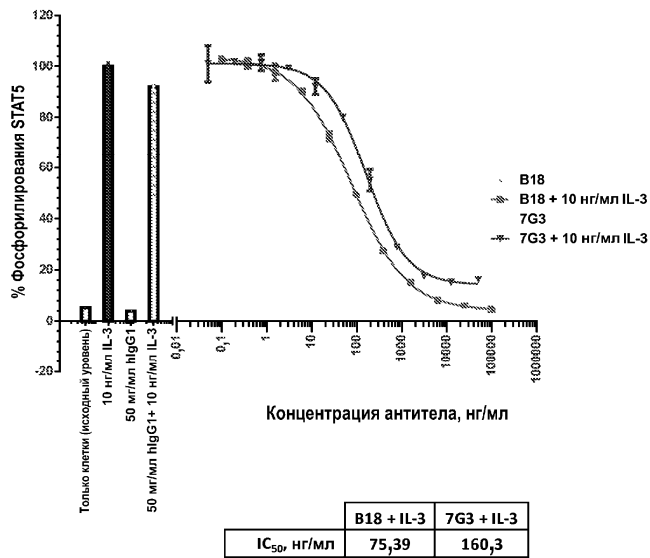


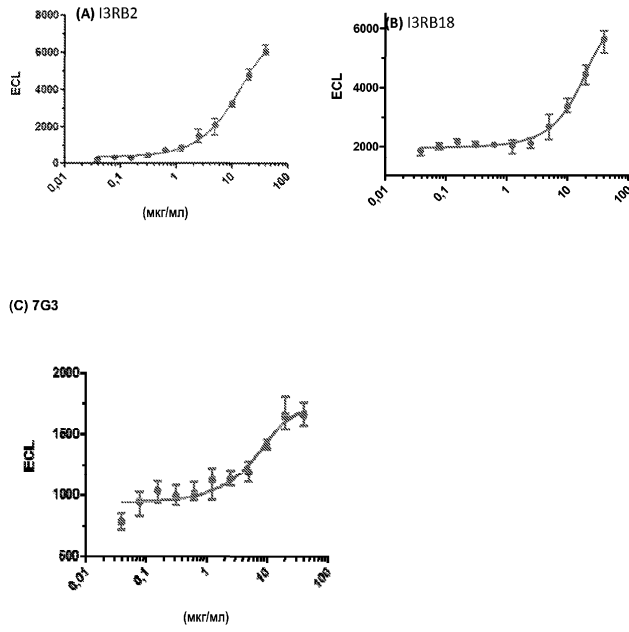
В) (1 мкг/мл)



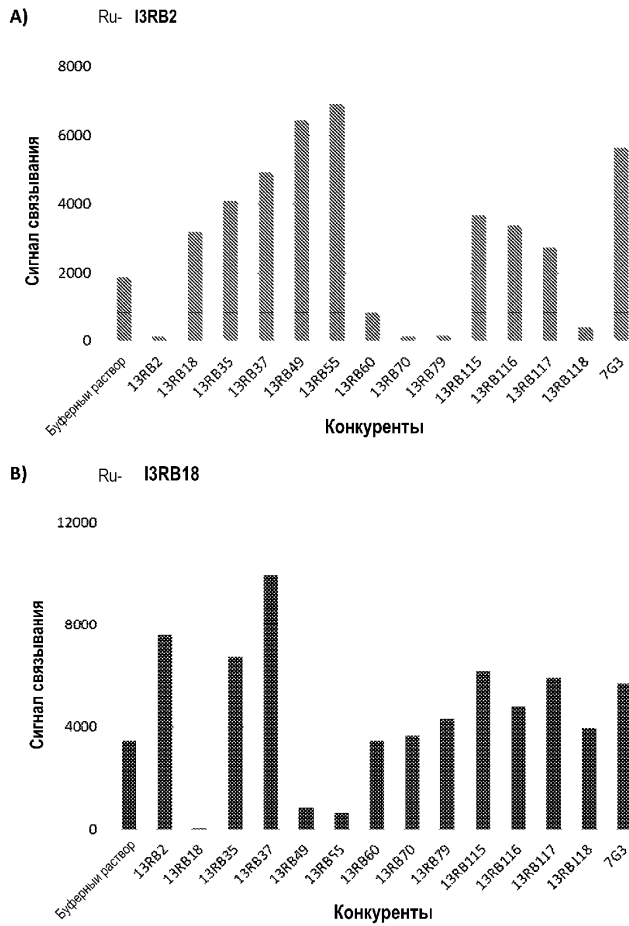
Фиг. 4

С) Дозовая зависимость





Фиг. 5



Фиг. 6

A)

CD123 + Fab B119

```

...20TK 30EGKFWAGAEN 40LTCWIHDVDF 50LSCSWAVGPG 60APADVQYDLY
      70LNVANRRQQY 80ECLHYKTDAA 90GTRIGCRFDD 100ISRLSSGSQS
      110SH ILVRGRSA 120AFG IPCTDKF 130VVFSQ IE ILT 140PPNMTAKCNK
      150THSFMHWKMR 160SHFNKFRYE 170LQIQKRMQPV 180ITEQVRDRTS
      190FQLLNPGTYT 200VQ IRARERVY 210EFLSAWSTPQ 220RFECDAQEEGA
      NTRAHHHHHH
    
```

Нумерация начинается с аминокислоты 19 SP2

B)

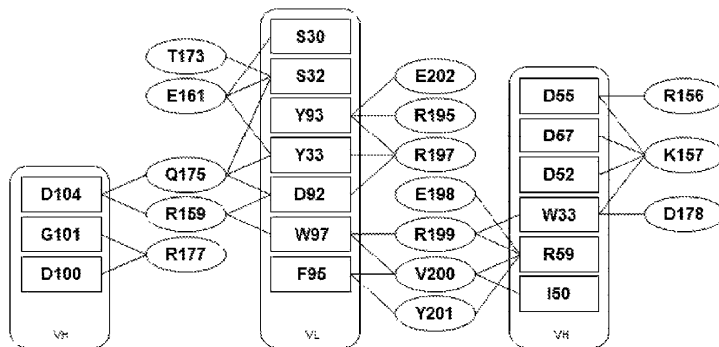
CD123 + Fab B120

```

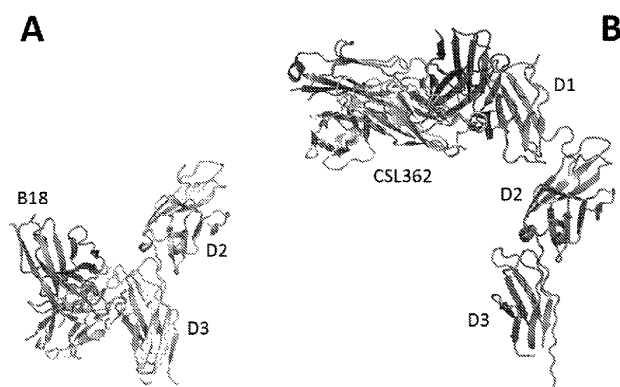
...20TK 30EGKFWAGAEN 40LTCWIHDVDF 50LSCSWAVGPG 60APADVQYDLY
      70LNVANRRQQY 80ECLHYKTDAA 90GTRIGCRFDD 100ISRLSSGSQS
      110SH ILVRGRSA 120AFG IPCTDKF 130VVFSQ IE ILT 140PPNMTAKCNK
      150THSFMHWKMR 160SHFNKFRYE 170LQIQKRMQPV 180ITEQVRDRTS
      190FQLLNPGTYT 200VQ IRARERVY 210EFLSAWSTPQ 220RFECDAQEEGA
      NTRAHHHHHH
    
```

Фиг. 7А-В

Нумерация: овалы относятся к остаткам CD123 SP2, а прямоугольники относятся к остаткам SEQ ID NO: 230



Фиг. 8



Фиг. 9

Легкая цепь (SEQ ID NO: 4)

```

      10      20      30      40      50      60
QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGCTNKRAPGV
      70      80      90     100     110     120
PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGKTLTVLQPKSSPSVTL
     130     140     150     160     170     180
FPPSSELETNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVTQGMETTPQPSKQSNNKYMSSY
     190     200     210
LTLTARAWERHSSYSQVTHEGHTVEKSLSRADCS

```

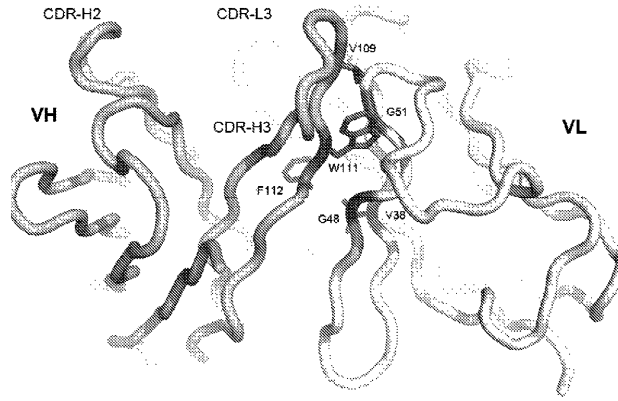
Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 5)

```

      10      20      30      40      50      60
EVKLLESGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT
      70      80      90     100     110     120
YYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNKLTEDTAMYVCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL
     130     140     150     160     170     180
VTVSAATTTAPSVYPLVPGCSDTSGSSVTLGCLVKGYFPEPVTVKWNYGALSSGVRTVSS
     190     200     210     220     230     240
VLOSAYFSLSSLVTPSSSTWPSQTVICNVVHPASKTELIKRIEPRIPKSTPPGSSCPPG
     250     260     270     280     290     300
NILGGPSVFIFPPKPKDALMISLTPKVTQVVDVSEDDPDVHVSWFVDNKEVHTAWTQPR
     310     320     330     340     350     360
EAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGRAQTPQVYTIP
     370     380     390     400     410     420
PPREQMSKKKVS LTCLVTNFFSEAI SVEWERNGELEQDYKNTPPILDSGTYFLYSKLTV
     430     440     450
DTDSWLQGEIFTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSPGK

```

Фиг. 10

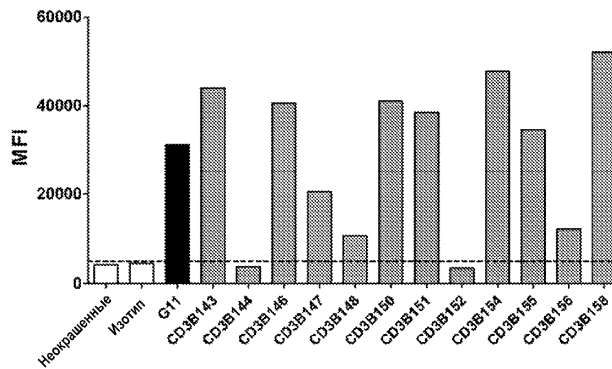


Фиг. 11

VH	10	20	30	40	50	60
sp34	EVKLL ESGGGLVQPKGSLKLS CAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATY					
CD3H141	EV QLVESGGGLVQPGGSLRL S CAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVA IRIRSKYNNYATY					
CD3H142	EV QLLESGGGLVQPGGSLRL S CAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVA IRIRSKYNNYATY					
CD3H143	EV QLLESGGGLVQPGGSLRL S CAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKLEWVA IRIRSKYNNYATY					
CD3H144	EV QLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYAMNWVRQ ASGKLEWVGR IRIRSKYNGYATY					
	70	80	90	100	110	120
sp34	YADSVKDRFTISRDDSQ SILYLQMN NLKTEDTAMYYCVRHGN FGNSYVSWFAYWGQ GLT LVTVSA					
CD3H141	YAASV KGRFTISRDDS KNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARHGN FGNSYVSWFAYWGQ GLT LVTVSS					
CD3H142	YADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC AKHGN FGNSYVSWFAYWGQGLT LVTVSS					
CD3H143	YADSV KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC VKHGN FGNSYVSWFAYWGQGLT LVTVSS					
CD3H144	YAASV KGRFTISRDDS KNTAYLQMN SLKTEDTAVYYC TRHGN FGNSYVSWFAYWGQGLT LVTVSS					
VL	10	20	30	40	50	60
sp34	QAVVTQES-ALTTSPGETVTLT CRSSTGAVTTSNYANWVQ EPDHLFTGLIG GTNKRAPGV					
CD3L63	QAVVTQEP-SLTVSPGGT VTLT CRSSTGAVTTSNYANW VQ Q PGAPRGLI GGTNKR APGT					
CD3L64	Q SVLTQPP-SVSA AP QKVTIS CRSSTGAVTTSNYANW VQ Q LPGTAPKGLI GGTNKR APGI					
CD3L66	Q TVVTQEP-SLTV SPGGT VTLT CRSSTGAVTTSNYANW VQ Q PGAPRGLI GGTNKR APGT					
	70	80	90	100	110	
sp34	PARFSGSLIGDKAAL TITGAQTE DAIYFCALWYSNLWV F GGG T KL TVL					
CD3L63	PARFSGSL LGGKAAL LSGA QPEDEA EY Y CALWYSNLWV F GGG T KL TVL ...					
CD3L64	PDRFSG SKGTSATLGI TGL QTG DEADY Y CALWYSNLWV F GGG T KL TVL ...					
CD3L66	PARFSGSL LGGKAAL LS GVQPEDEA EY Y CALWYSNLWV F GGG T KL TVL ...					

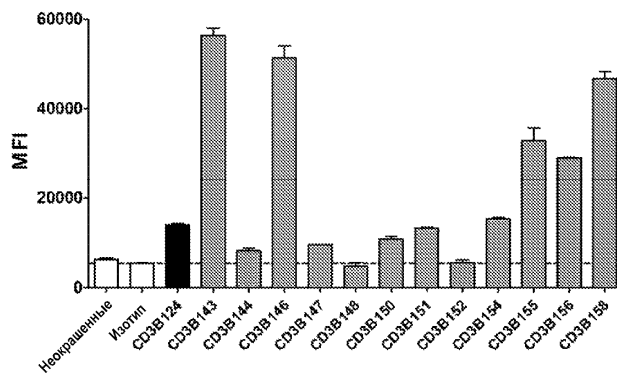
Фиг. 12

Связывание



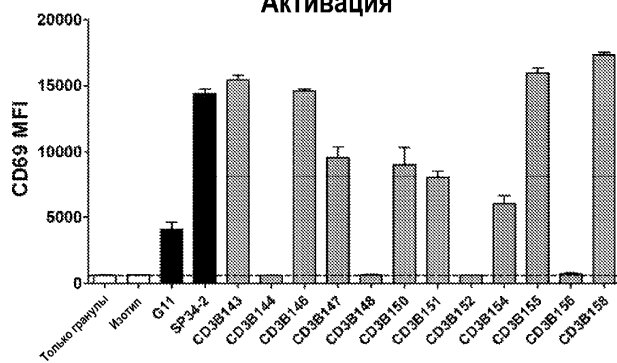
Фиг. 13

Связывание



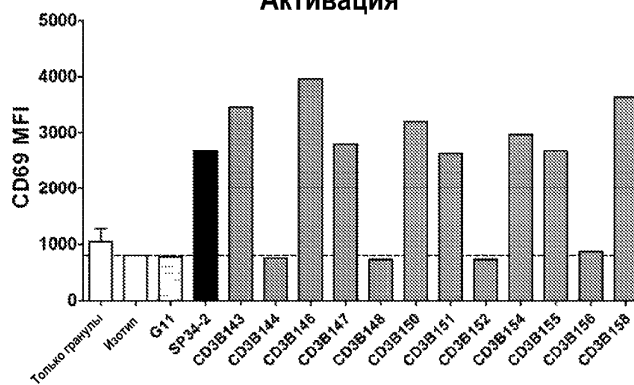
Фиг. 14

Активация



Фиг. 15

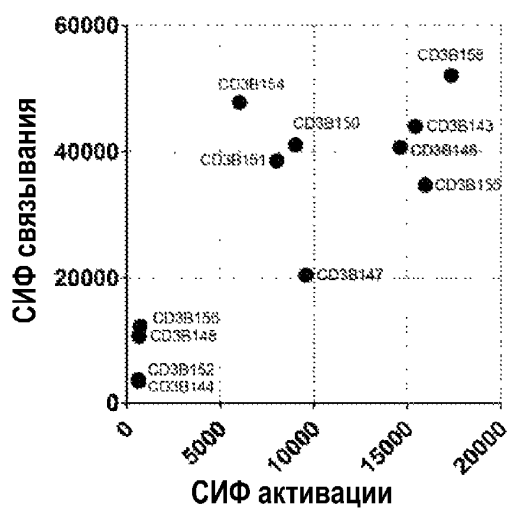
Активация



Фиг. 16

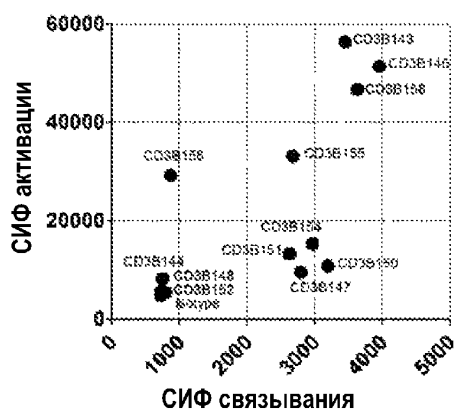
А) Человек

Связывание в зависимости от активации – человек



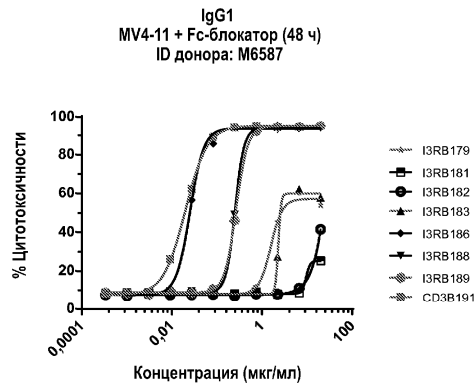
В) Яванский макак

Связывание в зависимости от активации – яванский макак

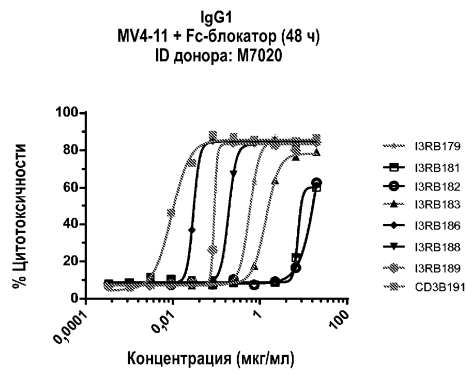


Фиг. 17

а) MV4-11, донор M6587

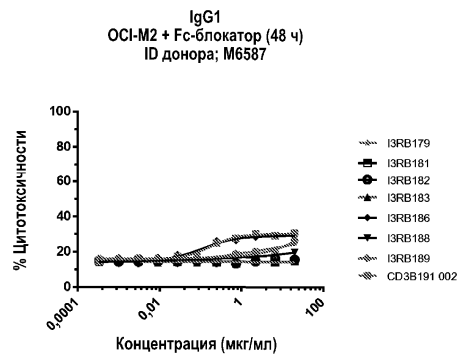


в) MV4-11, донор M7020

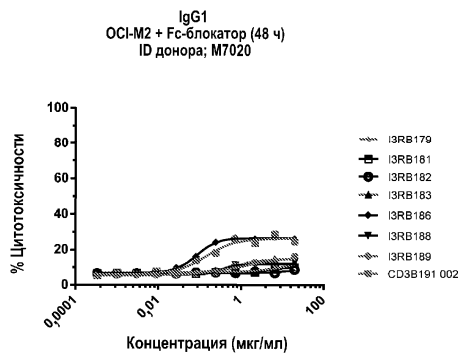


Фиг. 18

а) OCl-M2, донор M6587

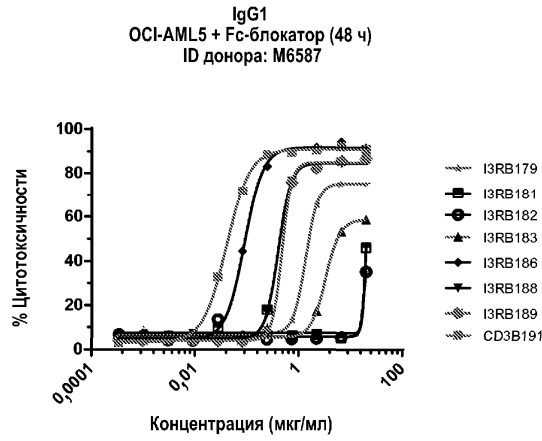


в) OCl-M2, донор M7020

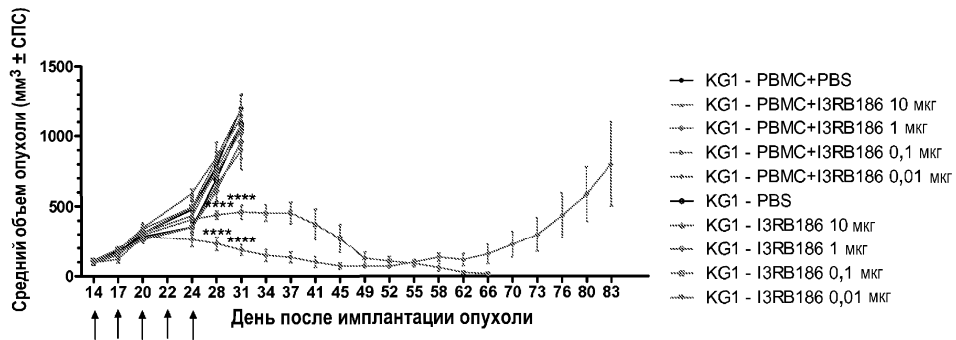
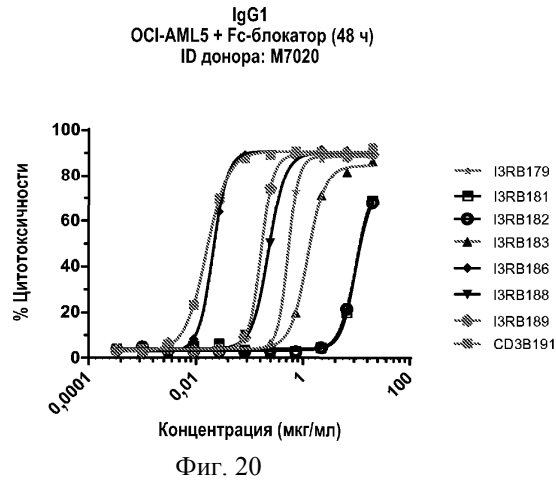


Фиг. 19

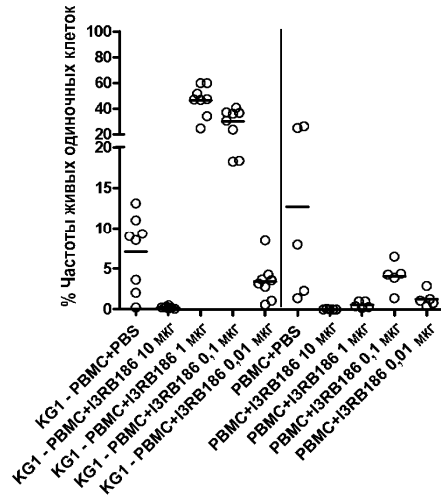
А) клеточная линия OCI-AML, донор M6587



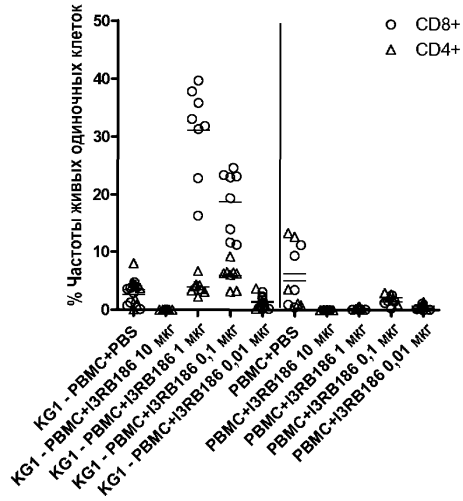
В) клеточная линия OCI-AML, донор 7020



A) CD45+

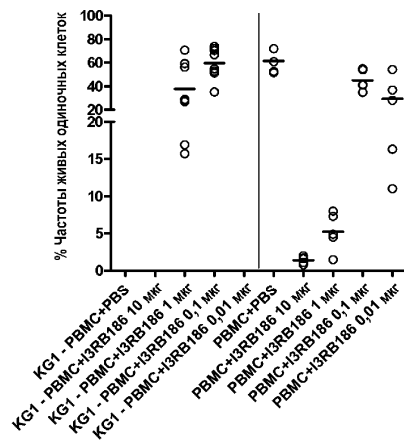


B) CD8+/CD4+

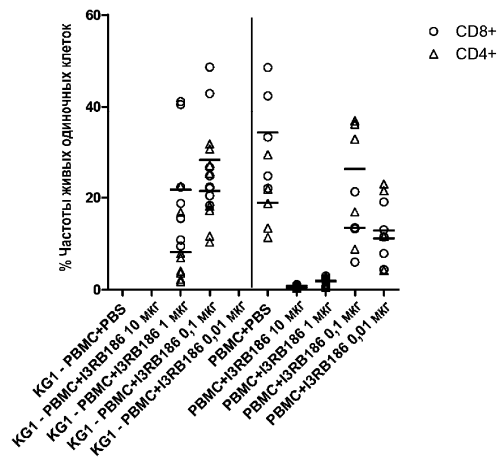


Фиг. 22

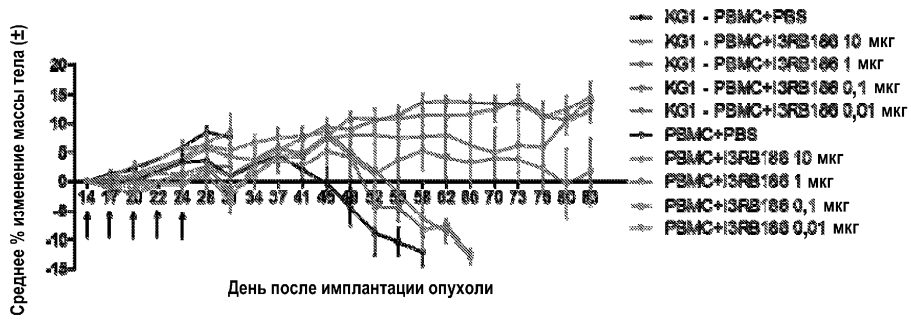
A) CD45+



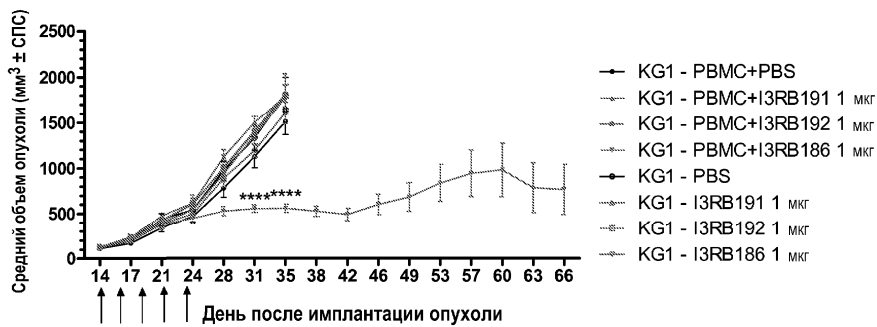
B) CD8+/CD4+



Фиг. 23

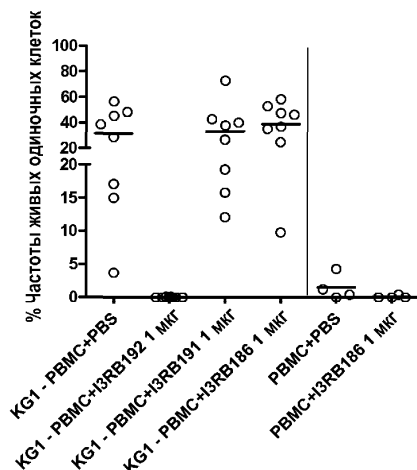


Фиг. 24

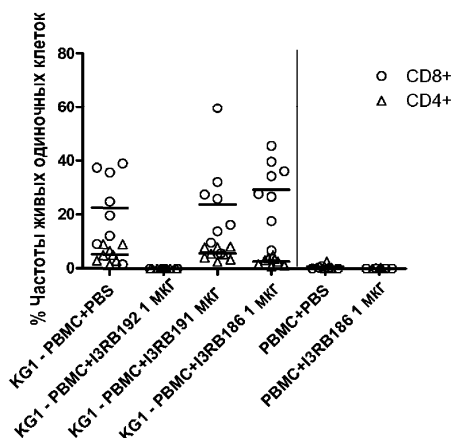


Фиг. 25

A. CD45 +

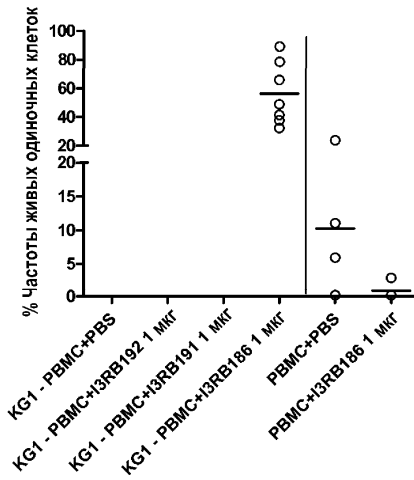


B. CD8+/CD4+

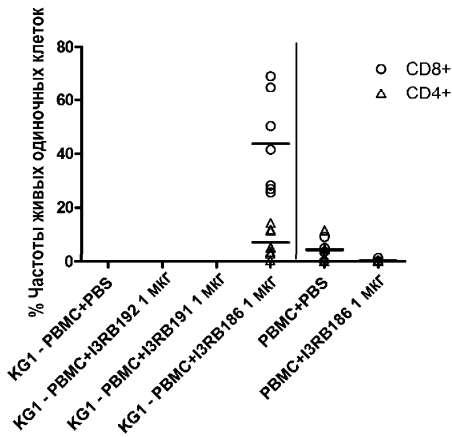


Фиг. 26

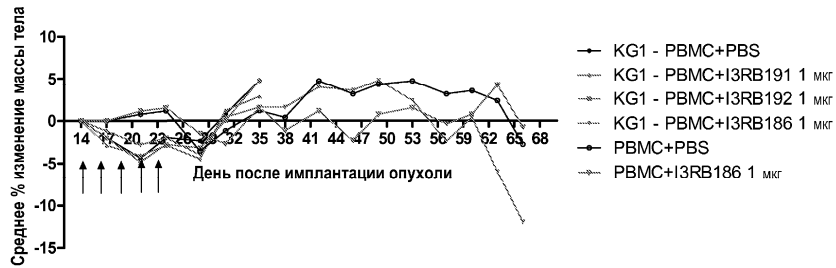
A) CD45 +



B) CD8+/CD4+

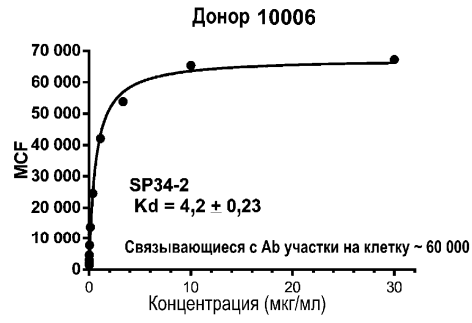


Фиг. 27

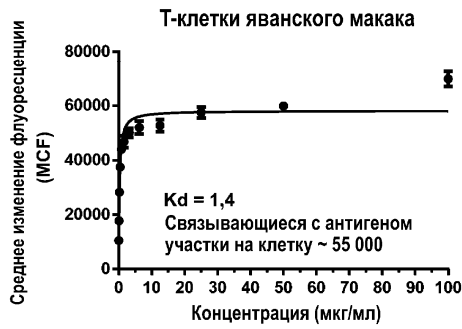


Фиг. 28

A)

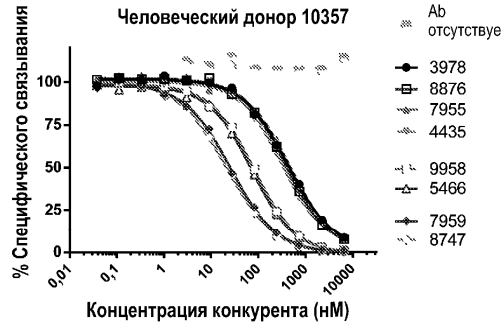


B)



Фиг. 29

A)



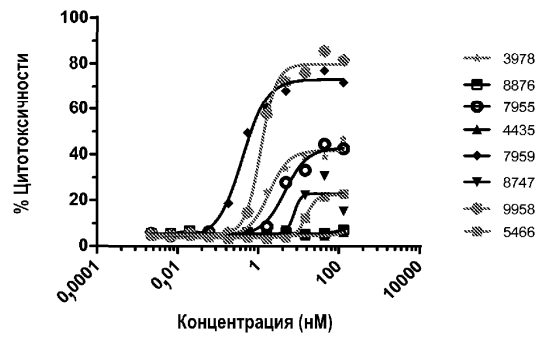
B)



Фиг. 30

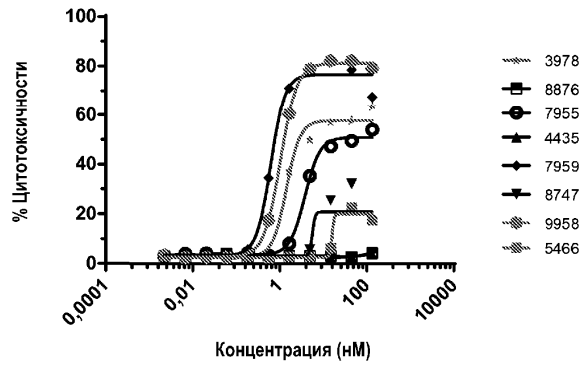
A)

IgG4-РАА
 ОСI-AML5 + Fc-блокатор (48 ч)
 ID донора: M6948



B)

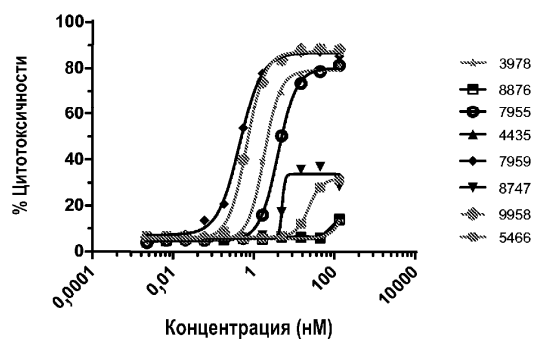
IgG4-РАА
 ОСI-AML5 + Fc-блокатор (48 ч)
 ID донора: M6521



Фиг. 31

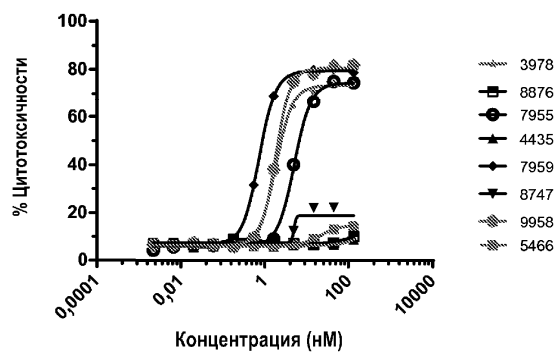
A)

IgG4-РАА
KG-1 + Fc-блокатор (48 ч)
ID донора: М6948



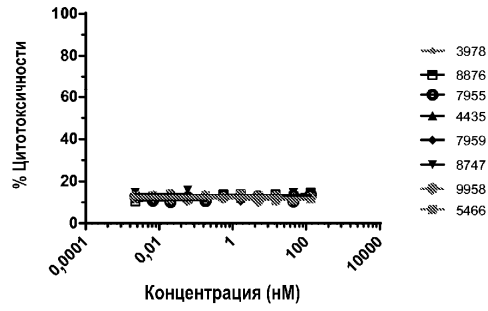
B)

IgG4-РАА
KG-1 + Fc-блокатор (48 ч)
ID донора: М6521

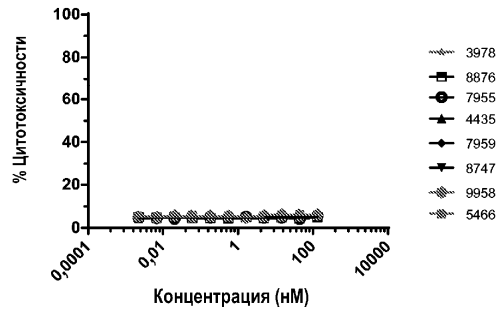


Фиг. 32

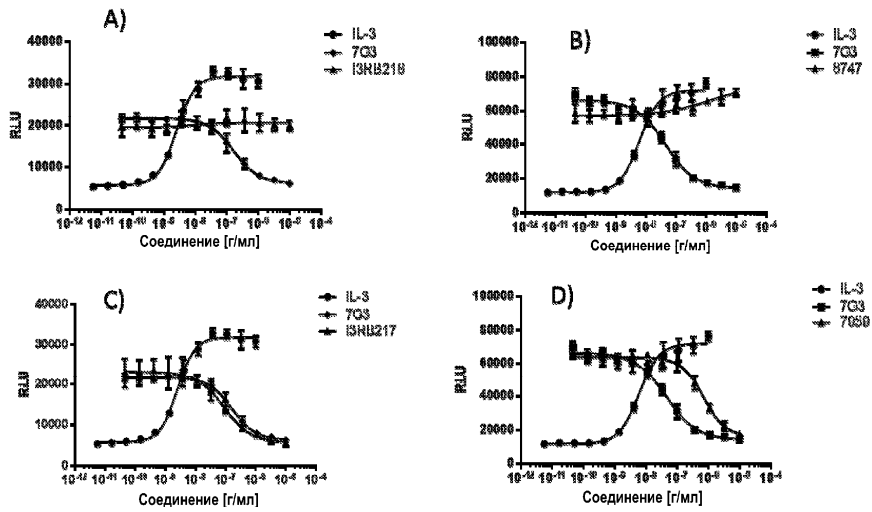
A)
IgG4-PAA
JIM3 + Fc-блокатор (48 ч)
ID донора: M6948



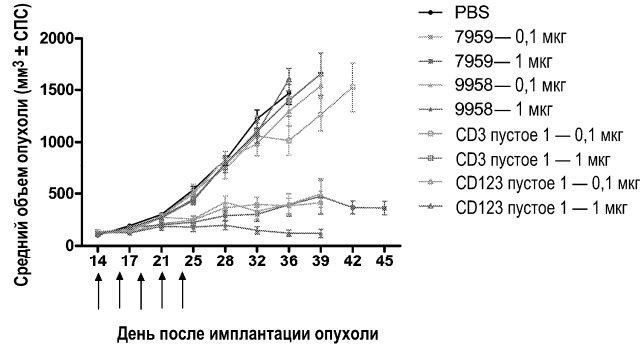
B)
IgG4-PAA
JIM3 + Fc-блокатор (48 ч)
ID донора: M6521



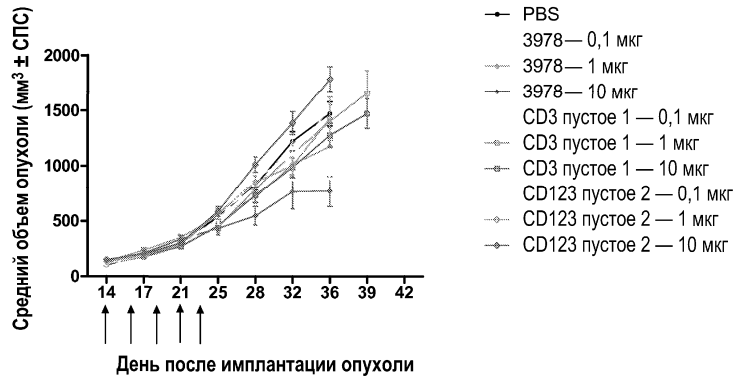
Фиг. 33



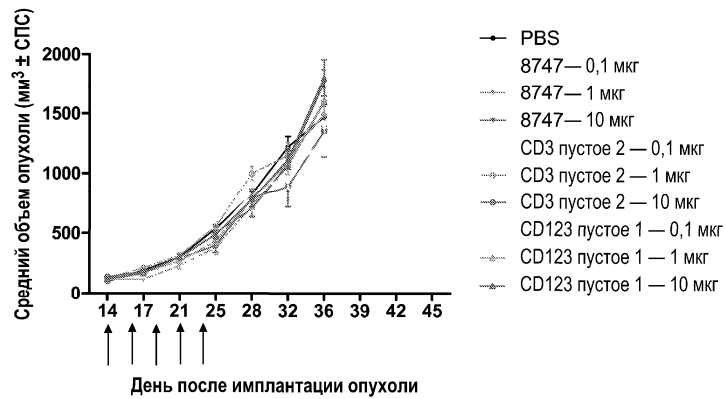
Фиг. 34



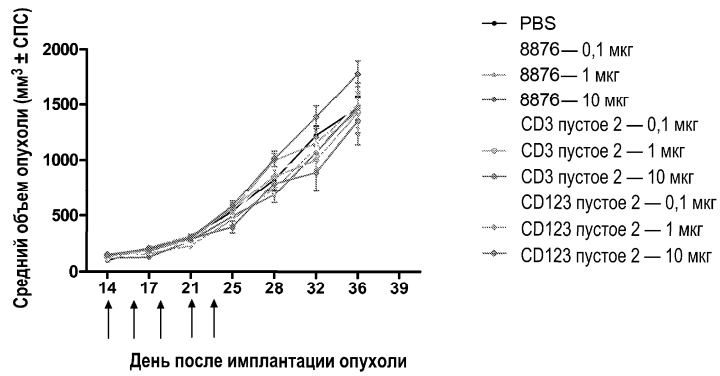
Фиг. 35



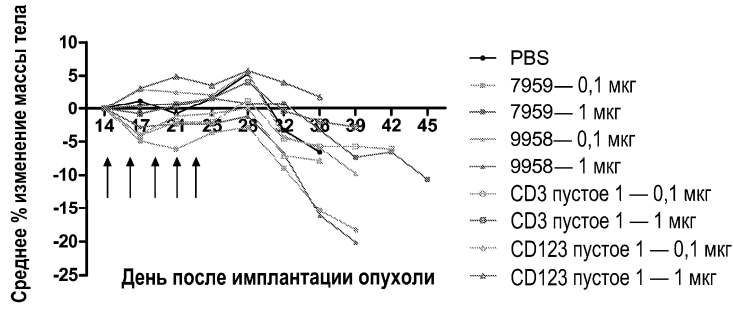
Фиг. 36



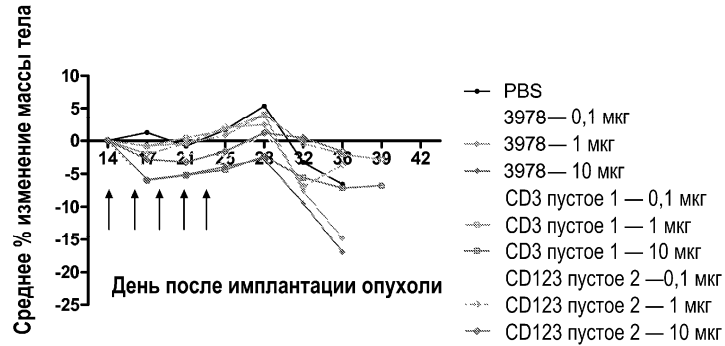
Фиг. 37



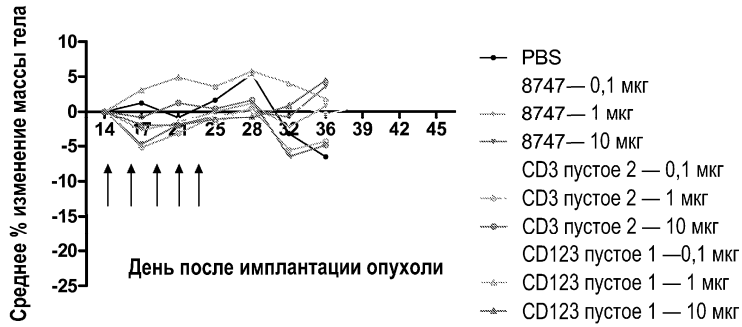
Фиг. 38



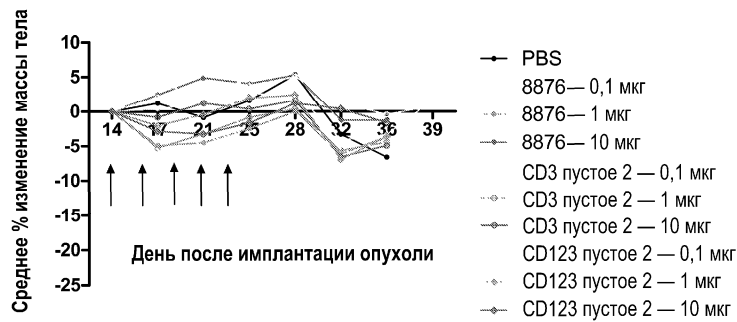
Фиг. 39



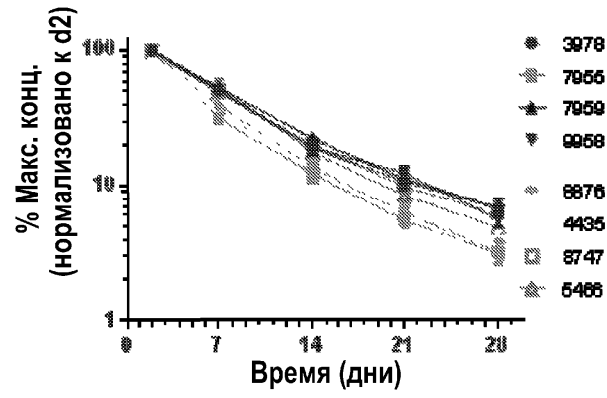
Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42



Фиг. 43