

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038736**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.10.12**

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

**(21)** Номер заявки  
**201892367**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.04.18**

---

**(54) ВВЕДЕНИЕ БИСПЕЦИФИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ, СВЯЗЫВАЮЩЕЙСЯ С CD33 И CD3, ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В СПОСОБЕ ЛЕЧЕНИЯ МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА**

---

**(31)** **62/324,451**

**(32)** **2016.04.19**

**(33)** **US**

**(43)** **2019.04.30**

**(86)** **PCT/EP2017/059108**

**(87)** **WO 2017/182427 2017.10.26**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЮНИК) ГМБХ**  
**(DE)**

**(72)** Изобретатель:  
**Цугмайер Герхард, Куфер Петер,**  
**Кишель Роман, Субклеве Марион,**  
**Крупка Кристина (DE)**

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

**(56)** WO-A2-2016004108  
Amgen: "A Phase 1 Study of AMG 330 in Subjects With Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia", ClinicalTrials.gov, 17 June 2015 (2015-06-17), XP55382070, etrieved from the Internet: URL:https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02520427?term=amg+330&rank=1#wrapper [retrieved on 2017-06-15], the whole document  
WO-A2-2015036583  
WO-A1-2016196230  
KIMBERLY H. HARRINGTON ET AL.: "The Broad Anti-AML Activity of the CD33/CD3 BiTE Antibody Construct, AMG 330, Is Impacted by Disease Stage and Risk", PLOS ONE, vol. 10, no. 8, 25 August 2015 (2015-08-25), page e0135945, XP55370197, DOI: 10.1371/journal.pone.0135945, the whole document

---

**(57)** Изобретение представляет биспецифическую конструкцию, содержащую первый связывающий домен, специфически связывающийся с CD33, и второй связывающий домен, специфически связывающийся с CD3, для применения в способе лечения миелоидного лейкоза, причем конструкцию вводят в течение максимального периода в 14 дней, за которым следует период по меньшей мере 14 дней без введения конструкции. Кроме того, изобретение представляет способ лечения миелоидного лейкоза, включающий введение терапевтически эффективного количества такой биспецифической конструкции и применение такой биспецифической конструкции для изготовления фармацевтической композиции для лечения миелоидного лейкоза.

---

**B1**

**038736**

**038736 B1**

### Область изобретения

Настоящее изобретение относится к биспецифической конструкции, содержащей первый связывающий домен, специфически связывающийся с CD33, и второй связывающий домен, специфически связывающийся с CD3, для применения в способе лечения миелоидного лейкоза, в котором конструкцию вводят в течение максимального периода в 14 дней, за которым следует период по меньшей мере 14 дней без введения конструкции. Кроме того, изобретение относится к способу лечения миелоидного лейкоза, включающему введение терапевтически эффективного количества такой биспецифической конструкции и применение такой биспецифической конструкции для изготовления фармацевтической композиции для лечения миелоидного лейкоза.

### Предпосылки создания изобретения

Биспецифические молекулы, такие как конструкции на основе антитела ViTE® (привлекающий T-клетки биспецифический активатор), представляют собой рекомбинантные белковые конструкции, изготовленные из двух связанных посредством гибкой связи связывающих доменов, полученных из антител. Один связывающий домен конструкций на основе антитела ViTE® специфичен для выбранного ассоциированного с опухолью поверхностного антигена на клетках-мишенях; второй связывающий домен специфичен для CD3, субъединицы T-клеточного рецепторного комплекса на T-клетках. Благодаря своей специфической структуре конструкции на основе антитела ViTE® уникальным образом подходят для временного связывания T-клеток с клетками-мишенями и в то же время эффективно активируют собственный цитолитический потенциал T-клеток против клеток-мишеней. Первое поколение конструкций на основе антитела ViTE® (см. WO 99/54440 и WO 2005/040220) получило развитие в виде препаратов для клинического применения AMG 103 (блинатумаб) и AMG 110 (солитомаб). Данные конструкции на основе антитела ViTE® вводят путем непрерывной внутривенной инфузии. Например, блинатумаб вводят при остром B-клеточном лимфобластном лейкозе в виде 4-недельного инфузионного введения с низкой начальной дозой на 1-й неделе и высокой дозой во время остальной терапии 1-го цикла и с самого начала дальнейших циклов. Перед началом второго цикла следует двухнедельный период без проведения лечения. Аналогичная схема введения была использована для солитомаба, который вводили в виде непрерывной внутривенной инфузии в течение по меньшей мере 28 дней с увеличением доз, также с двухнедельным перерывом между двумя циклами, во время которого лечение не проводится.

Важным дальнейшим развитием конструкций на основе антитела ViTE® первого поколения была разработка и предоставление биспецифических конструкций на основе антитела, связывающихся с не зависящим от окружения эпитопом на N-конце CD3s цепи человека, а также Callithrix jacchus, Saguinus oedipus или Saimiri sciureus (WO 2008/119567). Также в данной заявке раскрыты биспецифические антитела, дополнительно связывающиеся с CD33. CD33 представляет собой молекулу цитоадгезии, зависящую от сиаловой кислоты, известную как антиген миелоидного дифференцирования, обнаруженный, среди прочего, у большинства пациентов с ОМЛ на бластах и, возможно, у некоторых пациентов -на лейкоэмических стволовых клетках. Поэтому CD33 был определен перспективным маркером для миелоидного лейкоза и молекулой-мишенью при лечении таких заболеваний.

Милотарг® (гемтузумаб озогамцин), цитотоксический антибиотик, связанный с рекомбинантным моноклональным антителом, направленным против антигена CD33, присутствующего на лейкозных миелобластах, был одобрен и зарегистрирован по упрощенной схеме в Соединенных Штатах для использования у пациентов с ОМЛ. Однако, после того как во время подтверждающего исследования не было выявлено клинической пользы препарата, а также из-за наблюдаемого в условиях постмаркетинговых исследований повышенного риска веноокклюзионной болезни, препарат был добровольно отозван производителем с рынка Соединенных Штатов.

Часто встречающиеся токсические явления, наблюдаемые при приеме гемтузумаба озогамцина, включали нейтропению и тромбоцитопению, а более редко встречающиеся токсические явления включали события, связанные с острыми инфузионными реакциями (анафилаксия), гепатотоксичность и веноокклюзионную болезнь.

### Определения

Следует отметить, что использование в данном документе форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Так, например, ссылка на "реагент" включает один или несколько подобных различных реагентов, а ссылка на "способ" включает ссылку на эквивалентные этапы и способы, известные специалистам в данной области техники, которыми могут быть модифицированы или замещены способы, описанные в данном документе.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу серии. Специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Такие эквиваленты считаются охваченными в объеме данного изобретения.

Термин "и/или" везде, где он используется, включает в себя значение "и", "или" и "все или любую другую комбинацию элементов, связанных указанным термином".

Используемый в данном документе термин "около" или "приблизительно" означает в пределах  $\pm 20\%$ , предпочтительно в пределах  $\pm 15\%$ , более предпочтительно в пределах  $\pm 10\%$  и наиболее предпочтительно в пределах  $\pm 5\%$  от заданного значения или диапазона.

Всюду в данной спецификации и следующих за ней пунктах формулы изобретения, если контекст не требует иного, слово "содержать", а также его вариации, такие как "содержит" и "содержащий", будут подразумевать включение указанного целого числа или последовательности либо группы целых чисел или последовательностей, но не исключение какого-либо другого целого числа или последовательности либо группы целых чисел или последовательностей. При использовании в данном документе термин "содержащий" может быть заменен термином "который содержит" или "включающий" или иногда при использовании в данном документе термином "имеющий".

При использовании в данном документе термин "состоящий из" исключает любой элемент, последовательность или ингредиент, не указанные в элементе пункта формулы изобретения. При использовании в данном документе термин "состоящий в основном из" не исключает материалов или последовательностей, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики пункта формулы изобретения.

В каждом случае в данном документе любой из терминов "содержащий", "состоящий в основном из" и "состоящий из" может быть заменен любым из двух других терминов.

#### **Подробное описание изобретения**

При лечении острого лимфобластного лейкоза блинатумомаб вводится путем непрерывной внутривенной инфузии в течение 4 недель ( $5 \text{ мкг/м}^2/\text{сутки}$  в течение первой недели и  $15 \text{ мкг/м}^2/\text{сутки}$  в дальнейшем), после чего следуют две недели без лечения (один цикл), лечение длится до пяти циклов. Таким образом, при лечении уничтожается компартмент клеток  $\text{CD19}^+$ , который относится исключительно к линии В-клеток.

В исследованиях на животных при тестировании  $\text{CD33}$ -специфического  $\text{BiTE}^{\text{®}}$ , в соответствии с предлагаемым принципом действия для такой молекулы, наблюдалась временная миелосуппрессия, включая снижение циркулирующих нейтрофилов, тромбоцитов и массы эритроцитов. Снижение количества лейкоцитов, а также ожидаемое их увеличение при исследовании активированных животных, в соответствии с предлагаемым механизмом действия, привели к временной миелосуппрессии, включая снижение циркулирующих нейтрофилов, тромбоцитов и массы эритроцитов. Снижение количества лейкоцитов, а также ожидаемое увеличение количества активированных Т-лимфоцитов и увеличение уровней цитокинов наблюдались во всех группах доз. Фебрильная нейтропения и нейтропения были обычными явлениями, наблюдаемыми у пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями и предварительно получавшими комбинированные химиотерапии.

Кровотечение является распространенным и потенциально серьезным осложнением лечения ОМЛ, чаще всего оно вызвано тромбоцитопенией. Среди осложнений кровотечения особое значение имеет синдром диссеминированной внутрисосудистой коагуляции (DIC) из-за массивной внутрисосудистой активации свертывания крови с участием факторов свертывания крови и тромбоцитов, что приводит к тяжелым кровоизлияниям. У взрослых пациентов с ОМЛ наблюдалось 1% летальных кровотечений в день приема, все на фоне гиперлейкоцитоза или острого промиелоцитарного лейкоза (ОПЛ). Недавние данные у пациентов с ОМЛ показывают, что процент летальных исходов, связанных с кровоизлиянием, составляет 9,9%. Кроме того, в данной популяции пациентов с ОМЛ может наблюдаться сильная корреляция между невылеченной инфекцией у пациентов с панцитопенией и кровоизлиянием с летальным исходом.

Также хорошо известно, что пациенты с ослабленным иммунитетом восприимчивы к широко распространенным внебольничным инфекциям и к оппортунистическим инфекциям. Инфекции являются основной причиной заболеваемости и смертности у больных злокачественным новообразованием, и хотя некоторые виды злокачественных новообразований по сути связаны с пониженным иммунитетом, риск заражения в основном связан с интенсивностью и продолжительностью цитотоксической и иммуносупрессивной терапии.

Ввиду вышеизложенного лежащая в основе настоящего изобретения задача заключается в том, что при остром миелоидном лейкозе ситуация отличается от ситуации при остром лимфобластном лейкозе. Миелоидный компартмент содержит более широкий спектр клеточных линий, которые необходимы для выживания. Таким образом, невозможно просто перенести схему введения блинатумомаба при ОЛЛ на лечение ОМЛ с использованием специфичной к ОМЛ биспецифической конструкции на основе антитела. Для эффективного лечения ОМЛ с использованием подхода, направленного на уничтожение клеток  $\text{CD33}^+$ , лечение должно быть достаточно продолжительным, чтобы быть эффективным, но при этом достаточно коротким, чтобы минимизировать токсичность для таких типов клеток в миелоидном компартменте, которые необходимы для выживания. Кроме того, доза должна быть к тому же достаточной для обеспечения эффективности. Было показано, что длительность лечения и более высокая доза могут повышать эффективность в исследованиях *ex vivo*.

Данная проблема была решена, например, путем предоставления биспецифической конструкции,

содержащей первый связывающий домен, специфически связывающийся с CD33, и второй связывающий домен, специфически связывающийся с CD3 (CD33/CD3), для применения в способе лечения миелоидного лейкоза, при котором конструкцию вводят в течение максимального периода 14 дней с последующим периодом по меньшей мере 14 дней без введения конструкции.

Используя схему введения в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно с применением ступенчатого дозирования с увеличением уровней дозы можно эффективно уничтожать лейкозные миелоидные клетки в течение до 14 дней периода введения биспецифической конструкции CD33/CD3, при этом предоставляя пациенту период по меньшей мере 14 дней без введения конструкции для восстановления миелоидного компартмента. В то же время ступенчатое дозирование предпочтительно исключает риск серьезных иммунологических побочных эффектов, таких как синдром высвобождения цитокинов.

Как видно из фиг. 1, в специальной литературе описана проведенная посредством проточной цитометрии оценка экспрессии CD33 на поверхности миелоидных клеток, включая общие миелоидные клетки-предшественники, миелобласты и моноциты. Более того, оценка экспрессии CD33 на поверхности макрофагов была продемонстрирована с помощью иммуногистохимии. Данные популяции клеток CD33<sup>+</sup> в миелоидном компартменте уничтожаются при лечении пациента с использованием описанных в данном документе биспецифических конструкций. В связи с тем, что некоторые из этих популяций клеток сами по себе являются клетками-предшественниками других популяций клеток в миелоидном компартменте, такая процедура влияет на гематопоз всех типов клеток, образующихся из обычных миелоидных клеток-предшественников, что приводит к панцитопении.

Для успешного лечения миелоидного лейкоза требуется значительное воздействие описанных в данном документе биспецифических конструкций на пациента (т.е. определенная продолжительность воздействия) с целью индуцировать активацию/пролиферацию Т-клеток и цитотоксическую активность данных Т-клеток. Однако, исходя из вышеприведенных наблюдений, чем дольше длится период введения биспецифических конструкций, тем более длительной панцитопении следует ожидать. Это означает, что решение задачи, лежащей в основе этого изобретения, состоит в том, чтобы сбалансировать продолжительность воздействия и дозу биспецифических конструкций, которые позволяют эффективно уничтожать лейкозные клетки, и период без лечения, в течение которого миелоидный компартмент пациента получает возможность восстановиться. Это отражено в вышеописанной схеме введения препарата.

Подразумевается, что конец периода введения наступает тогда, когда уровень активного соединения в сыворотке, например биспецифического соединения, падает до определенного порогового значения. Примером такого порогового значения является уровень в сыворотке ниже значения EC<sub>90</sub>, предпочтительно ниже значения EC<sub>50</sub>, более предпочтительно ниже значения EC<sub>50</sub>. Подобные значения EC могут быть определены при поведении цитотоксического анализа с использованием в качестве эффекторных клеток в соответствии с данными анализами клеток-мишеней CD33<sup>+</sup> и лейкоцитов периферической крови (PBL) человека.

В случае биспецифической одноцепочечной конструкции на основе антитела, такой как AMG 330 (см. SEQ ID NO: 104), которая, как известно, имеет короткий период полувыведения из сыворотки крови (на основе параметров ФК, показанных в приложенном примере 2, период полувыведения AMG 330 у мышей составляет от 6,5 до 8,7 ч, тогда как предсказанный период полувыведения AMG 330 у человека составляет около 2 ч), уровень в сыворотке будет ниже вышеупомянутого порогового значения в течение короткого времени после прекращения непрерывного внутривенного введения, т.е. почти сразу же после окончания фазы введения. В случае продленного периода полувыведения биспецифической одноцепочечной конструкции на основе антитела, следует тщательно планировать окончание фазы введения для обеспечения снижения дозы ниже порогового значения в соответствии со схемами лечения по данному изобретению.

Анализ для определения конкретного значения EC<sub>x</sub> биспецифической конструкции, подходящего для настоящего изобретения, описан в приведенных ниже примерах.

Термин "биспецифическая конструкция" относится к молекуле, имеющей структуру, подходящую для специфического связывания двух отдельных целевых структур. В контексте настоящего изобретения такие биспецифические конструкции специфически связываются с CD33 на клеточной поверхности клеток-мишеней и CD3 на клеточной поверхности Т-клеток. В предпочтительном варианте осуществления биспецифической конструкции по меньшей мере один, а более предпочтительно оба связывающих домена биспецифической конструкции, основан(ы) на структуре и/или функции антитела. Такие конструкции могут быть обозначены как "биспецифические конструкции на основе антитела" в соответствии с настоящим изобретением.

Термин "конструкция на основе антитела" относится к молекуле, в которой структура и/или функция основаны на структуре и/или функции антитела, например полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина. Таким образом, конструкция на основе антитела способна связываться со своей специфической мишенью или антигеном. Кроме того, конструкция на основе антитела в соответствии с изобретением содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют связывать мишень. Такое минимальное требование может, например, быть определено как наличие по меньшей

мере трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). Антитела, на которых основаны конструкции в соответствии с данным изобретением, включают, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела.

В определении "конструкции на основе антитела" в соответствии с данным изобретением представлены полноразмерные или целые антитела, включая также верблюжьи антитела и другие иммуноглобулиновые антитела, полученные биотехнологическими способами или процессами или способами и процессами белковой инженерии. Такие полноразмерные антитела могут представлять собой, например, моноклональные, рекомбинантные, химерные, деиммунизированные, гуманизированные и человеческие антитела. Также в определении "конструкции на основе антитела" представлены фрагменты полноразмерных антител, таких как VH, VHH, VL, (s)dAb, Fv, Fd, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или r IgG (полу-антитело). Антитела в соответствии с изобретением также могут являться модифицированными фрагментами антител, которые также называют вариантами антител, такими как scFv, di-scFv или bi(s)-scFv, scFv-Fc, scFv-zipper, scFab, Fab<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, диатела, одноцепочечные диатела, тандемные диатела (Tandab), тандемные di-scFv, тандемные tr-scFv, мини-антитела, примером которых является структура, которая выглядит следующим образом: (VH-VL-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (scFv-CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ((scFv)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>+CH<sub>3</sub>), ((scFv)<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>) или (scFv-CH<sub>3</sub>-scFv)<sub>2</sub>, мультитела, такие как триатела или тетратела, и однодоменные антитела, такие как нанотела или антитела с одним варибельным доменом, содержащие только один варибельный домен, который может представлять собой VHH, VH или VL, специфически связывающие антиген или эпитоп независимо от других V-областей или доменов.

Связывающий домен, как правило, может содержать варибельный участок легкой цепи антитела (VL) и варибельный участок тяжелой цепи антитела (VH); однако он не должен содержать оба. Fd-фрагменты, например, имеют две области VH и часто сохраняют некоторую антигенсвязывающую функцию интактного антигенсвязывающего домена. Дополнительные примеры формата фрагментов антител, вариантов антител или связывающих доменов включают (1) фрагмент Fab - моновалентный фрагмент, имеющий домены VL, VH, CL и CH1; (2) фрагмент F(ab')<sub>2</sub> - двухвалентный фрагмент, имеющий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (3) фрагмент Fd, имеющий два домена VH и CH1; (4) фрагмент Fv, имеющий домены VL и VH одного плеча антитела, (5) фрагмент dAb (Ward et al., (1989), Nature, 341:544-546), который имеет домен VH; (6) изолированную определяющую комплементарность область (CDR) и (7) одноцепочечную Fv (scFv), причем последняя является предпочтительной (например, полученная из scFV-библиотеки). Примерами вариантов осуществления конструкций антител в соответствии с данным изобретением являются, например, описанные в патентах и заявках на изобретения WO 00/006605, WO 2005/040220, WO 2008/119567, WO 2010/037838, WO 2013/026837, WO 2013/026833, US 2014/0308285, US 2014/0302037, WO 2014/144722, WO 2014/151910 и WO 2015/048272.

Кроме того, определение термина "конструкции на основе антитела" включает моновалентные, двухвалентные и поливалентные/мультивалентные конструкции и, таким образом, моноспецифические конструкции, специфические связывающиеся только с одной антигенной структурой, а также биспецифические и полиспецифические/мультиспецифические конструкции, которые специфически связываются с более чем одной антигенной структурой, например двумя, тремя или более, посредством различных связывающих доменов. Более того, определение термина "конструкции на основе антитела" включает молекулы, состоящие только из одной полипептидной цепи, а также молекулы, состоящие более чем из одной полипептидной цепи, причем цепи могут быть либо идентичными (гомодимеры, гомотримеры или гомогенные олигомеры), либо различными (гетеродимер, гетеротример или гетероолигомер). Примеры вышеупомянутых идентифицированных антител и их вариантов или производных описаны, в частности, в лабораторных руководствах Harlow and Lane, *Antibodies a laboratory manual*, CSHL Press (1988) и *Using Antibodies: a laboratory manual*, CSHL Press (1999), а также в Kontermann and Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2-е изд., 2010 и Little, *Recombinant Antibodies for Immunotherapy*, Cambridge University Press (2009).

Конструкции антител по настоящему изобретению предпочтительно представляют собой "конструкции на основе антитела, созданные *in vitro*". Данный термин относится к конструкции на основе антитела в соответствии с вышеприведенным определением, у которой вся варибельная область или ее часть (например, по меньшей мере одна CDR) генерируется в процессе селекции неиммунных клеток, например в методе фагового дисплея *in vitro*, на протеиновом чипе или любым другим способом, в котором потенциальные последовательности могут быть испытаны на их способность связываться с антигеном. Таким образом, этот термин предпочтительно исключает последовательности, генерируемые исключительно геномной перегруппировкой в иммунной клетке у животного. "Рекомбинантное антитело" представляет собой антитело, полученное с использованием технологии рекомбинантной ДНК или геной инженерии.

Вариант осуществления биспецифической конструкции на основе антитела по настоящему изобретению представляет собой "одноцепочечные конструкции на основе антитела". Такие одноцепочечные конструкции на основе антитела включают только вышеописанные варианты осуществления конструк-

ций антител, которые состоят из единственной пептидной цепи.

Использующийся в данном документе термин "моноклональное антитело" (mAb) или конструкция на основе моноклонального антитела относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, содержащиеся в популяции, идентичны, за исключением возможных естественных мутаций (например, изомеризации, амидирований), которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, и они направлены на единственный антигенный сайт или детерминанту на антигене в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают различные антитела, направленные на различные области детерминант (или эпитопы). В дополнение к своей специфичности моноклональные антитела обладают преимуществом в том, что они синтезируются гибридной культурой, поэтому не загрязнены другими иммуноглобулинами. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, полученного по существу из гомогенной популяции антител, и не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом.

Для получения моноклональных антител можно использовать любую методику, обеспечивающую антитела, полученные из культур стабильных клеточных линий. Например, моноклональные антитела, которые могут быть использованы, могут быть получены с помощью гибридного метода, впервые описанного Koehler et al., *Nature*, 256:495 (1975), или могут быть получены способами с применением рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Примеры дополнительных способов получения человеческих моноклональных антител включают в себя технологию триом, технологию гибридом В-клеток человека (Kozbor, *Immunology Today*, 4 (1983), 72) и технологию EBV-гибридом (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96).

Затем гибридомы подвергают скринингу с использованием стандартных методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА) и поверхностный плазмонный резонанс (BIAcore™), для идентификации одной или нескольких гибридом, продуцирующих антитело, которое специфически связывается с указанным антигеном. В качестве иммуногена можно использовать любую форму соответствующего антигена, например рекомбинантный антиген, природные формы, любые его варианты или их фрагменты, а также их антигенный пептид. Поверхностный плазмонный резонанс, применяемый в системе BIAcore, может быть использован для повышения эффективности фаговых антител, которые связываются с эпитопом целевого антигена, такого как антиген CD33 или CD3-эпсилон на поверхности клетки-мишени (Schier, *Human Antibodies Hybridomas*, 7 (1996), 97-105, Malmborg, J. *Immunol. Methods*, 183 (1995), 7-13).

Другой пример способа получения моноклональных антител включает в себя скрининговые библиотеки экспрессии белков, например библиотеки фаговых дисплеев или рибосомных дисплеев.

Фаговый дисплей описан, например, в Ladner и соавт., патент США № 5223409; Smith (1985), *Science*, 228:1315-1317, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991).

В дополнение к использованию библиотек дисплеев, соответствующий антиген может быть использован для иммунизации животного, не являющегося человеком, например грызуна (такого как мышь, хомяк, кролик или крыса). В одном варианте осуществления не являющееся человеком животное содержит по меньшей мере часть гена человеческого иммуноглобулина. Например, можно сконструировать мышиные линии, дефектные по продуцированию мышиных антител, с большими фрагментами локусов Ig (иммуноглобулина) человека. Используя гибридную технологию, можно продуцировать и отбирать антигенспецифические моноклональные антитела, полученные из генов с желаемой специфичностью. См., например, XENOMOUSE™, Green et al., (1994), *Nature Genetics*, 7:13-21, US 2003-0070185, WO 96/34096 и WO 96/33735.

Моноклональное антитело также может быть получено из организма животного, не являющегося человеком, а затем модифицировано, например гуманизировано, деиммунизировано, превращено в химерное и т.д., с использованием методов рекомбинантных ДНК, известных в данной области. Примеры модифицированных конструкций на основе антитела включают гуманизированные варианты нечеловеческих антител, антитела с "созревшей аффинностью" (см., например, Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) и Lowman et al., *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) и мутантные антитела с измененными эффекторными функциями (см., например, патент США 5648260, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.).

В иммунологии созревание аффинности представляет собой процесс, посредством которого В-клетки продуцируют антитела с повышенной аффинностью к антигену во время иммунного ответа. При повторном воздействии того же антигена хозяин будет продуцировать антитела с последовательно большей аффинностью. Как и у естественного прототипа, созревание аффинности *in vitro* основано на принципах мутации и селекции. Созревание аффинности *in vitro* успешно использовалось для оптимизации антител, конструкций на основе антитела и фрагментов антител. Случайные мутации внутри CDR вводятся с использованием радиационного излучения, химических мутагенов или ПЦР с внесением ошибок. Кроме того, генетическое разнообразие может быть увеличено путем перестановки цепей. Два или три раунда мутации и отбора с использованием методов дисплея, таких как фаговый дисплей, обычно

приводят к получению фрагментов антител с аффинностью в нижнем наномолярном диапазоне.

Предпочтительный тип вариантов замещения в аминокислотных конструкциях на основе антитела включает замещение одного или нескольких остатков гипервариабельной области исходного антитела (например, гуманизированного или человеческого антитела). Как правило, полученные варианты, выбранные для дальнейшей разработки, будут иметь улучшенные биологические свойства относительно исходного антитела, из которого они образуются. Удобный способ генерации таких вариантов замещения включает созревание аффинности с использованием фагового дисплея. Вкратце, несколько сайтов гипервариабельной области (например, 6-7 сайтов) подвергаются мутации для генерации всех возможных аминокислотных замещений на каждом сайте. Полученные таким образом варианты антител подвергаются дисплею одновалентным способом из филаментных фаговых частиц в виде слияний с продуктом гена  $\Phi$  M13, упакованным в каждую частицу. Подвергнутые фаговому дисплею варианты затем подвергаются скринингу для оценки биологической активности (например, аффинности связывания) в соответствии с приведенным в данном документе описанием. Чтобы идентифицировать потенциальные сайты гипервариабельных регионов, для модификации может быть выполнен аланиновый сканирующий мутагенез для идентификации остатков гипервариабельной области, значительно способствующих связыванию антигена. Альтернативно или дополнительно, может быть полезно проанализировать кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации контактных точек между связывающим доменом и, например, человеческим клеточным антигеном CD33. Такие контактные остатки и соседние остатки являются кандидатами на замещение в соответствии со способами, разработанными в настоящем документе. Когда такие варианты сгенерированы, панель вариантов подвергается скринингу, в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе, и антитела с превышающими прочими свойствами в одном или нескольких соответствующих анализах могут быть выбраны для дальнейшей разработки.

Моноклональные антитела и конструкции на основе антитела по настоящему изобретению конкретно включают "химерные" антитела (иммуноглобулины), в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная цепь/цепи идентичны или гомологичны соответствующим последовательностям в антителах, полученных из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антитела, а также фрагментам таких антител, в случае, когда они проявляют желаемую биологическую активность (патент США № 4816567: Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. США, 81:6851-6855 (1984)). Предложенные в данном документе химерные антитела включают "примитивизированные" антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности с вариабельной областью, полученные от приматов, отличных от человека (например, мартышковые, человекообразные обезьяны и т.д.) и человеческие последовательности константной области. Описаны различные подходы к созданию химерных антител. См., например, Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, 1985; Takeda et al., Nature, 314:452, 1985 г., Cabilly et al., патент США № 4816567; Boss et al., патент США № 4816397; Tanaguchi et al., EP 0171496; EP 0173494 и GB 2177096.

Антитело, конструкция на основе антитела или фрагмент антитела также могут быть модифицированы путем специфической делеции эпитопов Т-клеток человека (метод, называемый "деиммунизация") способами, описанными в заявках на патент WO 98/52976 и WO 00/34317. Вкратце, вариабельные домены тяжелой и легкой цепей антитела могут быть проанализированы для определения пептидов, которые связываются с молекулами ГКГС класса II; такие пептиды представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы (как определено в заявках на патент WO 98/52976 и WO 00/34317). Для обнаружения потенциальных Т-клеточных эпитопов может быть применен способ компьютерного моделирования, называемый peptide threading (нанизывание пептидов), и, кроме того, в базе данных связывающих пептидов человеческого ГКГС класса II можно найти мотивы, присутствующие в последовательностях VH и VL, как описано в заявках на патент WO 98/52976 и WO 00/34317. Такие мотивы связываются с любым из 18 основных аллотипов DR ГКГК класса II и, таким образом, представляют собой потенциальные Т-клеточные эпитопы. Найденные потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть удалены путем замещения небольшого количества аминокислотных остатков в вариабельных доменах или предпочтительно замещениями одной аминокислоты. Как правило, производятся консервативные замещения. Часто, но не исключительно, можно использовать аминокислоту с характерным положением в последовательностях антител зародышевой линии человека. Последовательности зародышевой линии человека раскрыты, например, в Tomlinson et al., (1992), J. Mol. Biol. 227:776-798; Cook, G.P. et al., (1995). Immunol. Today, том 16(5):237-242; и Tomlinson et al., (1995), EMBO J. 14:14:4628-4638. Каталог V BASE предоставляет полный каталог последовательностей вариабельной области иммуноглобулина человека (составлен Tomlinson, L.A. et al., Центр исследований белков MRC, Кембридж, Великобритания). Такие последовательности могут быть использованы в качестве источника последовательности человека, например, для каркасных областей и CDR. Также могут быть использованы консенсусные каркасные области человека, например, как описано в патенте США № 6300064.

"Гуманизированные" антитела, конструкции на основе антитела или их фрагменты (такие как Fv,

Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> или другие антигенсвязывающие подпоследовательности антител) представляют собой антитела или иммуноглобулины, в основном последовательности человека, которые содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело реципиента), в которых остатки из гипервариабельной области (также CDR) реципиента заменены остатками из гипервариабельной области, не относящихся к человеку видов (например, грызунов) (антитело донора), таких как мышь, крыса, хомяк или кролик, имеющих желаемую специфичность, аффинность и способность. В некоторых примерах остатки Fv каркасного участка (FR) человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, "гуманизированные антитела", в соответствии с использованием в данном документе, могут также содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в донорском антителе. Данные модификации сделаны для дальнейшего улучшения и оптимизации эффективности антител. Гуманизированное антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Для получения дополнительной информации см. Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988); и Presta, *Curr. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Гуманизированные антитела или их фрагменты могут быть получены путем замены последовательностей вариабельного домена Fv, которые непосредственно не связаны с связыванием антигена, на эквивалентные последовательности из вариабельных доменов Fv человека. Типичные способы получения гуманизированных антител или их фрагментов представлены Morrison (1985), *Science*, 229:1202-1207; Oi et al., (1986), *BioTechniques*, 4:214; и в патентах США US 5585,089; US 5693761; US 5693762; US 5859205 и US 6407,213. Данные способы включают выделение, манипулирование и экспрессию последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют все или часть вариабельных доменов Fv иммуноглобулина по меньшей мере из одной тяжелой или легкой цепи. Такие нуклеиновые кислоты могут быть получены из гибридомы, продуцирующей антитело к заданной мишени, в соответствии с вышеописанным, а также данными из других источников. Рекомбинантную ДНК, кодирующую молекулу гуманизированного антитела, можно затем клонировать в соответствующий вектор экспрессии.

Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием трансгенных животных, таких как мыши, которые экспрессируют гены тяжелой и легкой цепей человека, но не способны экспрессировать эндогенные гены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина мыши. Winter описывает примерный метод трансплантации CDR, который может быть использован для получения гуманизированных антител, описанных в данном документе (патент США № 5225539). Все CDR конкретного антитела человека могут быть заменены по меньшей мере частью CDR нечеловеческого происхождения или только некоторые из CDR могут быть заменены CDR нечеловеческого происхождения. Необходимо только заменить количество CDR, необходимых для связывания гуманизированного антитела с предварительно заданным антигеном.

Гуманизированное антитело может быть оптимизировано путем введения консервативных замещений, замещений консенсусной последовательности, замещений зародышевой линии и/или обратных мутаций. Такие измененные молекулы иммуноглобулина могут быть получены любым из нескольких способов, известных в данной области (например, Teng et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:7308-7312, 1983; Kozbor et al., *Immunology Today*, 4:7279, 1983; Olsson et al., *Meth. Enzymol.*, 92:3-16, 1982 и EP 239400).

Термины "человеческое антитело", "конструкция человеческого антитела" и "домен связывания человека" включают антитела, конструкции на основе антитела и связывающие домены, имеющие области антител, такие как вариабельные и константные области или домены, которые по существу соответствуют последовательностям иммуноглобулина зародышевой линии человека, известным в данной области, включая, например, те, которые описаны Kabat et al., (1991) (*loc. cit.*). Антитела человека, конструкции на основе антитела или связывающие домены по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, вводимые случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Человеческие антитела, конструкции на основе антитела или связывающие домены могут иметь по меньшей мере одно, два, три, четыре, пять или более положений, замещенных аминокислотным остатком, который не кодируется последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека. Определение человеческих антител, конструкций на основе антитела и связывающих доменов, в соответствии с использованием в данном документе, также рассматривает полностью человеческие антитела, которые включают исключительно не искусственные и/или генетически измененные последовательности человеческих антител, поскольку они могут быть получены с использованием технологий или систем, таких как Xenomouse.

В некоторых вариантах осуществления конструкции на основе антитела по изобретению представляют собой "изолированные" или "по существу чистые" конструкции на основе антитела. "Изолированный" или "по существу чистый" при использовании для описания раскрытой в данном документе конструкции на основе антитела означает конструкцию на основе антитела, которая была идентифицирована,

разделена и/или выделена из компонента среды ее выработки. Предпочтительно конструкция на основе антитела является свободной или практически не связана со всеми остальными компонентами из среды ее выработки. Загрязняющими компоненты среды выработки, такие как рекомбинантные трансфицированные клетки, являются материалы, которые обычно препятствуют диагностическому или терапевтическому применению полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Конструкции антител могут составлять, например, по меньшей мере около 5% или по меньшей мере примерно 50% от общего веса белка в данном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9 мас.% От общего содержания белка в зависимости от обстоятельств.

Полипептид может быть получен в значительно более высокой концентрации за счет использования индуцируемого промотора или высоко экспрессирующего промотора, так что он производится при повышенных концентрациях. Определение включает в себя получение конструкции на основе антитела в самых разных организмах и/или клетках-хозяевах, которые известны в данной области. В предпочтительных вариантах осуществления конструкция на основе антитела будет очищена (1) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с использованием секвенатора с вращающимся стаканом или (2) до гомогенности с помощью ДНС-ПААГ в невосстанавливающих или восстанавливающих условиях с применением Кумасси синего или предпочтительно серебряного пятна. Обычно, однако, выделенная конструкция на основе антитела будет получена с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Термин "связывающий домен" характеризует в связи с настоящим изобретением домен, который (в частности) связывается/взаимодействует с/распознает данный целевой эпитоп или данный целевой сайт на молекулах-мишенях (антигенах) и CD3 соответственно. Структура и функция первого связывающего домена (распознающего клеточный поверхностный антиген CD33) и предпочтительно также структура и/или функция второго связывающего домена (CD3) основаны на структуре и/или функции антитела, например, полноразмерной или цельной молекулы иммуноглобулина. В соответствии с изобретением первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и трех CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). Второй связывающий домен предпочтительно также содержит минимальные структурные требования к антителу, которые позволяют связывать мишень. Более предпочтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т.е., CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или три CDR тяжелой цепи (т.е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). Предполагается, что первый и/или второй связывающий домен производятся или получают посредством фагового дисплея или методов скрининга библиотеки, а не путем трансплантации CDR-последовательностей из ранее существовавшего (моноклонального) антитела на каркас.

В соответствии с настоящим изобретением связывающие домены предпочтительно находятся в форме полипептидов. Такие полипептиды могут включать белковые части и небелковые части (например, химические линкеры или химические сшивающие агенты, такие как глутаровый альдегид). Белки (включая их фрагменты, предпочтительно биологически активные фрагменты и пептиды, обычно имеющие менее 30 аминокислот) содержат две или более аминокислоты, связанные друг с другом посредством ковалентной пептидной связи (что приводит к получению цепи аминокислот). Используемый в данном документе термин "полипептид" описывает группу молекул, которые обычно состоят более чем из 30 аминокислот. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и высшие олигомеры, т.е. состоящие более чем из одной молекулы полипептида. Молекулы полипептидов, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры более высокого порядка таких мультимеров, следовательно, называются гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером для гетеромультимера является молекула антитела, которая в своей естественной форме состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "пептид", "полипептид" и "белок" также относятся к естественно модифицированным пептидам/полипептидам/белкам, где модификация осуществляется, например, посттрансляционными модификациями, такими как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т.п. "Пептид", "полипептид" или "белок", упоминаемые в данном документе, также могут быть химически модифицированы, например пэгиллированы. Такие модификации хорошо известны в данной области и описаны ниже.

Антитела и конструкции на основе антитела, содержащие по меньшей мере один человеческий связывающий домен, позволяют избежать некоторых проблем, связанных с антителами или конструкциями антител, которые содержат нечеловеческие переменные и/или константные области, например переменные и/или константные области грызунов (например, мышей, крыс, хомяков или кроликов). Наличие таких белков, полученных из грызунов, может приводить к быстрой очистке антител или конструкций на основе антитела или может приводить к генерации у пациента иммунного ответа на антитела или конструкции на основе антитела. При необходимости избежать использования антител или конструкций на основе антитела, полученных из грызунов, могут быть получены человеческие или полностью человеческие антитела или конструкции на основе антитела. Они могут быть получены путем введения функции

человеческого антитела в грызуна для того, чтобы грызун вырабатывает полностью человеческие антитела.

Способность клонировать и восстанавливать человеческие локусы размером с мегабазу в YAC и вводить их в зародышевую линию мыши предоставляет эффективный подход к выявлению функциональных компонентов очень больших или грубо отображаемых локусов, а также к созданию полезных моделей заболеваний человека. Кроме того, использование такой технологии для замещения локусов мыши их человеческими эквивалентами может обеспечить уникальное понимание экспрессии и регуляции генных продуктов человека во время развития, их связь с другими системами и их участие в индукции и прогрессировании болезни.

Важным практическим применением такой стратегии является "гуманизация" гуморальной иммунной системы мыши. Введение локусов иммуноглобулина человека (Ig) в мышей с инактивированными генами эндогенных Ig дает возможность изучить механизмы, лежащие в основе запрограммированной экспрессии и сборки антител, а также их роль в развитии В-клеток. Более того, такая стратегия могла бы стать идеальным источником для производства полностью человеческих моноклональных антител (mAbs), что является важным шагом в сложном процессе разработки терапии антителами при заболеваниях человека. Ожидается, что полностью человеческие антитела или конструкции на основе антитела минимизируют иммуногенные и аллергические реакции, присущие моноклональным антителам (mAb) мыши или полученными из организма мыши и, таким образом, смогут повысить эффективность и безопасность вводимых антител/конструкций на основе антител. Можно ожидать, что использование полностью человеческих антител или конструкций на основе антитела станет существенным преимуществом при лечении хронических и рецидивирующих заболеваний человека, таких как воспаления, аутоиммунные заболевания и онкологические заболевания, которые требуют повторных введений соединений.

Один из подходов к данной цели заключался в том, чтобы сконструировать мышинные штаммы с дефицитом производства антител мыши, с большими фрагментами локусов Ig человека в расчете на то, что такие мыши будут продуцировать большой репертуар антител человека в отсутствие мышинных антител. Большие фрагменты Ig человека сохраняют большое разнообразие варибельных генов, а также надлежащую регуляцию продукции и экспрессии антител. С учетом использованного мышинного механизма для диверсификации и селекции антител и отсутствия иммунологической толерантности к человеческим белкам репертуар воспроизведенных человеческих антител в таких мышинных линиях должен содержать антитела с высокой аффинностью к любому интересующему антигену, включая человеческие антигены. Используя гибридную технологию, можно легко получать и отбирать антигенспецифичные человеческие mAb с желаемой специфичностью. Данная общая стратегия была продемонстрирована в связи с поколением первых мышинных линий XenoMouse (см. Green et al., *Nature Genetics*, 7:13-21 (1994)). Линии XenoMouse были разработаны и созданы с помощью искусственных хромосом дрожжей (YAC), содержащих фрагменты конфигурации зародышевой линии локуса тяжелой цепи человека и локуса легкой цепи каппа размером 245 и 190 кб соответственно, которые содержали последовательности варибельной и постоянной областей. Человеческий Ig, содержащий YAC, оказался совместимым с системой мыши как для перегруппировки, так и для экспрессии антител, и был способен замещать инактивированные мышинные Ig-гены. Это было продемонстрировано их способностью индуцировать развитие В-клеток, продуцировать репертуар полностью человеческих антител, подобный репертуару взрослого человека, и генерировать антиген-специфические человеческие mAb. Данные результаты также предполагали, что введение больших порций локусов Ig человека, содержащих большее количество V-генов, дополнительных регуляторных элементов и константных областей Ig человека, может в значительной степени воспроизвести полный репертуар, характерный для гуморального ответа человека на инфекцию и иммунизацию. Работа Green et al., в последнее время стала охватывать также введение более чем примерно 80% репертуара человеческих антител за счет введения фрагментов YAC конфигурации зародышевой линии локусов тяжелой цепи человека и локусов легкой цепи каппа соответственно. См. Mendez et al., *Nature Genetics* 15: 146-156 (1997), заявку на патент США № 08/759,620.

Производство мышей XenoMouse обсуждается далее и охарактеризовано в патентных заявках США № 07/466008, № 07/610515, № 07/919297, № 07/922649, № 08/031801, № 08/112848, № 08/234145, № 08/376279, № 08/430938, № 08/464584, № 08/464582, № 08/463191, № 08/462837, № 08/486853, № 08/486857, № 08/486859, № 08/462513, № 08/724752 и № 08/759620; а также патентах США № 6162963, 6150584, 6114598, 6075181 и 5939598 и патентах Японии № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al., *Nature Genetics*, 15:146-156 (1997) и Green и Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998), EP 0463151 B1, WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и WO 03/47336.

В альтернативном подходе другие специалисты, включая GenPharm International, Inc., использовали подход "мини-локус". В мини-локусном подходе экзогенный локус Ig имитируется путем включения кусочков (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или несколько генов VH, один или несколько генов DH, один или несколько генов JH, константная область mu и вторая константная область (предпочтительно константная область гамма) формируются в конструкцию для введения в животное. Такой подход описан в патенте США № 5545807 за авторством Surani et al., и в патентах США

№ 5545806, 5625825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5877397, 5874299 и 6255458, каждый за авторством Lonberg and Kay, патенты США № 5591669 и 6023010 за авторством Krimpenfort and Berns, патенты США № 5612205, 5721367 и 5789215 за авторством Berns, et al., и патент США № 5643763 за авторством Choi и Dunn, и заявка на патент США от GenPharm International № 07/574748, № 07/575962, № 07/810279, № 07/853408, № 07/904068, № 07/990860, № 08/053 131, № 08/096762, № 08/155301, № 08/161739, № 08/165699, № 08/209741. См. также EP 0546073 B1, WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884, а также патент США № 5981175. См. далее Taylor et al., (1992), Chen et al., (1993), Tuailon et al., (1993), Choi et al., (1993), Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994), and Tuailon et al., (1995), Fishwild et al., (1996).

Kigin также продемонстрировал генерацию человеческих антител у мышей, в которых посредством микроклеточного слияния были введены большие фрагменты хромосом или целые хромосомы. См. европейские патентные заявки № 773288 и 843961. Компания Xenetex Biosciences разрабатывает технологию для потенциальной генерации человеческих антител. В этой технологии клетки мышей линии SCID реконструируют человеческими лимфатическими клетками, например В- и/или Т-клетками. Затем мышей прививают антигеном, и они могут генерировать иммунный ответ на антиген. См., например, патенты США № 4399216, 5476996, 5698767 и 5958765.

Ответы человеческого антимышиного антитела (НАМА) привели к тому, что промышленность приступила к получению химерных или иначе называемых гуманизированных антител. Тем не менее, ожидается, что будут наблюдаться определенные ответы антитела человека на химерное антитело (НАСА), особенно при постоянном или многодозовом использовании антитела. Таким образом, было бы желательно предоставить конструкции на основе антитела, содержащие полностью человеческий связывающий домен против поверхностного антигена клетки-мишени и полностью человеческий связывающий домен против CD3, чтобы устранить проблемы и/или эффекты ответа НАМА или НАСА.

Термины "(специфически) связывается с", "(специфически) распознает", "(специфически) нацелен на" и "(специфически) реагирует с" в контексте настоящего изобретения означают, что связывающий домен взаимодействует или специфически взаимодействует с одной или более, предпочтительно по меньшей мере двумя, более предпочтительно по меньшей мере с тремя и наиболее предпочтительно по меньшей мере с четырьмя аминокислотами эпитопа, расположенного на целевом белке или антигене (поверхностный антиген CD33/CD3 клетки-мишени).

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связывается связывающий домен, такой как антитело, иммуноглобулин или производное или фрагмент антитела или иммуноглобулина. "Эпитоп" является антигенным, поэтому термин "эпитоп" иногда также упоминается в данном документе как "антигенная структура" или "антигенная детерминанта". Таким образом, связывающий домен является "сайтом взаимодействия с антигеном". Указанное связывание/взаимодействие также понимается как "специфическое распознавание". Термин "эпитоп" в контексте данной заявки понимается как описание полной антигенной структуры, тогда как термин "часть эпитопа" может быть использован для описания одной или нескольких подгрупп специфического эпитопа данного связывающего домена.

"Эпитопы" могут образовываться как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, размещенными рядом благодаря третичному сворачиванию белка. "Линейный эпитоп" представляет собой эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот содержит распознанный эпитоп. Линейный эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 или по меньшей мере 4 и более, обычно по меньшей мере 5, или по меньшей мере 6, или по меньшей мере 7, например, от 8 до 10 аминокислот в уникальной последовательности.

"Конформационный эпитоп" в отличие от линейного эпитопа является эпитопом, в котором первичная последовательность аминокислот, включающих эпитоп, не является единственным определяющим компонентом распознанного эпитопа (например, эпитоп, в котором первичная последовательность аминокислот не обязательно распознана связывающим доменом). Обычно конформационный эпитоп содержит большее количество аминокислот по сравнению с линейным эпитопом. Что касается распознавания конформационных эпитопов, то связывающий домен распознает трехмерную структуру антигена, предпочтительно пептида или белка или их фрагмента (в контексте настоящего изобретения антиген для одного из связывающих доменов содержится в поверхностном антигене CD33 клетки-мишени). Например, когда молекула белка сворачивается для образования трехмерной структуры, некоторые аминокислоты и/или полипептидный остов, образующие конформационный эпитоп, размещаются рядом, позволяя антителу распознавать эпитоп. Методы определения конформации эпитопов включают, но не ограничиваются ими, рентгеновскую кристаллографию, спектроскопию двумерного ядерного магнитного резонанса (2D-ЯМР), сайт-направленную спиновую маркировку и спектроскопию электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР).

Взаимодействие между связывающим доменом и эпитопом или эпитопным кластером подразумевает, что связывающий домен проявляет заметную аффинность к эпитопу или эпитопному кластеру на конкретном белке или антигене (в данном документе: поверхностные антигены CD33 и CD3 клетки-мишени соответственно) и, как правило, не проявляет значительной реакционной способности с белками

или антигенами, отличными от поверхностного антигена CD33 или CD3 клетки-мишени. "Заметная аффинность" включает связывание с аффинностью около  $10^{-6}$  М (KD) или более сильной. Предпочтительно связывание считается специфическим, когда аффинность связывания составляет от около  $10^{-12}$  до  $10^{-8}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-9}$  М, от  $10^{-12}$  до  $10^{-10}$  М, от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$  М, предпочтительно от около  $10^{-11}$  до  $10^{-9}$  М. Для определения того, реагирует связывающий домен с мишенью специфически или связывается с ней, можно, в частности, сравнить реакционное взаимодействие указанного связывающего домена с белком-мишенью или антигеном с реакционным взаимодействием указанного связывающего домена с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена CD33 или CD3 клетки-мишени.

Предпочтительно связывающий домен по данному изобретению не связывается в общем или по сути с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена CD33 или CD3 клетки-мишени (т.е. первый связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от поверхностного антигена CD33 клетки-мишени, а второй связывающий домен не способен связываться с белками, отличными от CD3).

Термин "в общем/по сути не связывается" или "не способен связываться" означает, что связывающий домен настоящего изобретения не связывает белок или антиген, отличный от поверхностного антигена CD33 или CD3 клетки-мишени, т.е. не показывает реакционную способность более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% с белками или антигенами, отличными от поверхностного антигена CD33 или CD3 клетки-мишени, при этом связывание с поверхностным антигеном CD33 или CD3 клетки-мишени соответственно принято за 100%.

Считается, что специфическое связывание осуществляется специфическими мотивами в аминокислотной последовательности связывающего домена и антигена. Таким образом, связывание достигается в результате их первичной, вторичной и/или третичной структуры, а также в результате вторичных модификаций указанных структур. Специфическое взаимодействие сайта взаимодействия с антигеном со своим специфическим антигеном может приводить к простому связыванию указанного сайта с антигеном. Более того, специфическое взаимодействие сайта взаимодействия с антигеном со своим специфическим антигеном может альтернативно или дополнительно приводить к иницированию сигнала, например из-за индукции изменения конформации антигена, олигомеризации антигена и т.д.

Термин "вариабельный" относится к частям доменов антитела или иммуноглобулина, которые проявляют изменчивость в своей последовательности и которые участвуют в определении специфичности и аффинности связывания конкретного антитела (т.е. "вариабельного домена"). Объединение вариабельной тяжелой цепи (VH) и вариабельной легкой цепи (VL) образует один антигенсвязывающий сайт.

Вариабельность не распределяется равномерно по всем вариабельным доменам антител; она сосредоточена в поддоменах каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. Такие поддомены называются "гипервариабельными областями" или "определяющими комплементарность областями" (CDR). Более консервативные (т.е. негипервариабельные) части вариабельных доменов называются "каркасными" областями (FRM) и обеспечивают каркас для образования антигенсвязывающей поверхности из шести CDR в трехмерном пространстве. Вариабельные домены встречающихся в природе тяжелых и легких цепей содержат четыре FRM-области (FR1, FR2, FR3 и FR4), в основном используя конфигурацию  $\beta$ -листа, соединенную тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру  $\beta$ -листа, а в некоторых случаях образующие часть его структуры. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости от FRM и вместе с гипервариабельными областями другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего сайта (см. Kabat et al., loc. cit.).

Термин "CDR" в единственном и множественном числе относится к определяющей комплементарности области. Три такие области придают связывающий характер вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3), а еще три придают связывающий характер вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3). CDR содержат большую часть остатков, ответственных за специфические взаимодействия антитела с антигеном и, следовательно, способствуют функциональной активности молекулы антитела: они являются основными детерминантами антигенной специфичности.

Конкретные определения границ и длин CDR привязаны к различным системам классификации и нумерации. Поэтому CDR могут определяться по Kabat, Chothia, определениям контактных или любых других границ, включая описанную в данном документе систему нумерации. Несмотря на разные границы, каждая из таких систем имеет некоторую степень перекрытия в том, что составляет так называемые "гипервариабельные области" в вариабельных последовательностях. Таким образом, определения CDR в соответствии с этими системами могут различаться по длине и границам областей относительно смежной каркасной области. См., например, Kabat (подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей), Chothia (подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело) и/или MacCallum (Kabat et al., loc. cit.; Chothia et al., J. Mol. Biol, 1987, 196:901-917; и MacCallum et al., J. Mol. Biol, 1996, 262:732). Еще одним стандартом для определения характеристик сайта связывания антигена является определение AbM, используемое программным обеспечением для

моделирования антител AbM Oxford Molecular. См., например, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. В: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Rontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). В той мере, в которой два метода идентификации остатков определяют области перекрывающихся, но не идентичных областей, их можно объединить для определения гибридного CDR. Однако нумерация в соответствии с так называемой системой Kabat является предпочтительной.

Как правило, CDR образуют петлевую структуру, которая может быть классифицирована как каноническая структура. Термин "каноническая структура" относится к конформации основной цепи, которая определяется петлями связывания антигена (CDR). В результате сравнительных структурных исследований было установлено, что пять из шести антигенсвязывающих петель имеют только ограниченный репертуар доступных конформаций. Каждая каноническая структура может быть охарактеризована углами закручивания полипептидного остова. Таким образом, соответственные петли между антителами могут иметь достаточно схожие трехмерные структуры, несмотря на высокую вариабельность аминокислотной последовательности в большинстве частей петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 1987, 196:901; Chothia et al., Nature, 1989, 342:877; Martin and Thornton, J. Mol. Biol, 1996, 263:800). Кроме того, существует взаимосвязь между принятой структурой петель и окружающими ее аминокислотными последовательностями. Конформация конкретного канонического класса определяется длиной петли и аминокислотными остатками, находящимися в ключевых положениях внутри петли, а также в пределах консервативного каркаса (т.е. вне петли). Таким образом, назначение конкретного канонического класса может быть основано на наличии этих ключевых аминокислотных остатков.

Термин "каноническая структура" может также включать в себя соображения относительно линейной последовательности антитела, например, в соответствии с каталогизацией по Kabat (Kabat et al., loc. cit.). Схема (система) нумерации Kabat является широко принятым стандартом для нумерации аминокислотных остатков вариабельного домена антитела согласованным образом и является предпочтительной схемой, применяемой в настоящем изобретении, как также упоминалось в другой части данного документа. Дополнительные соображения по структуре также могут быть использованы для определения канонической структуры антитела. Например, подобные различия, не полностью отраженные нумерацией Kabat, могут быть описаны системой нумерации Chothia et al., и/или раскрыты другими методиками, например посредством кристаллографии и двух- или трехмерного компьютерного моделирования. Соответственно, данная последовательность антител может быть отнесена к каноническому классу, который позволяет, среди прочего, идентифицировать соответствующие каркасные последовательности (например, исходя из желания включить в библиотеку множество канонических структур). Нумерация аминокислотных последовательностей антител по Kabat и соображения по структуре в соответствии с описанием у Chothia et al., loc. cit., а также их значение для интерпретации канонических аспектов структуры антител описаны в соответствующей литературе. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны в данной области. Для ознакомления с обзором структуры антител см. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow et al., 1988.

CDR3 легкой цепи и, в частности, CDR3 тяжелой цепи могут представлять собой наиболее важные детерминанты связывания антигена в вариабельных областях легкой и тяжелой цепей. В некоторых конструкциях антител CDR3 тяжелой цепи, по-видимому, представляет собой основную область контакта между антигеном и антителом. Схемы отбора *in vitro*, в которых изменяется только CDR3, могут быть использованы для изменения связывающих свойств антитела или определения того, какие остатки вносят вклад в связывание антигена. Следовательно, CDR3, как правило, является наибольшим источником молекулярного разнообразия в сайте, связывающем антитело. H3, например, может составлять в длину всего два аминокислотных остатка или превышать 26 аминокислот.

В классическом полноразмерном антителе или иммуноглобулине каждая легкая (L) цепь связана с тяжелой (H) цепью одной ковалентной дисульфидной связью, тогда как две цепи H связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изотипа цепи H. Область CH, наиболее близкая к VH, обычно обозначается как CH1. Константные (C) домены непосредственно не вовлечены в связывание антигена, но проявляют различные эффекторные функции, такие как антителозависимая, опосредованная клетками цитотоксичность и активация комплемента. Fc-область антитела содержится в константных доменах тяжелой цепи и способна например, взаимодействовать с Fc-рецепторами, расположенными на клеточной поверхности.

Последовательность генов антител после сборки и соматической мутации сильно варьируется, и такие разнообразные гены, по оценкам, кодируют  $10^{10}$  различных молекул антител (Immunoglobulin Genes, 2-е изд., eds. Jonio et al., Academic Press, San Diego, CA, 1995). Соответственно, иммунная система обеспечивает репертуар иммуноглобулинов. Термин "репертуар" относится по меньшей мере к одной нуклеотидной последовательности, полученной полностью или частично из по меньшей мере одной последовательности, кодирующей по меньшей мере один иммуноглобулин. Последовательности могут быть образованы путем перегруппировки *in vivo* сегментов V, D и J тяжелых цепей и сегментов V и J легких цепей. В качестве альтернативы последовательности могут быть получены из клетки, в которой в ответ,

например, на стимуляцию *in vitro* происходит перегруппировка. В качестве альтернативы часть последовательности или вся последовательность могут быть получены путем сплайсинга ДНК, синтеза нуклеотидов, мутагенеза и других способов, см., например, патент США № 5565332. Репертуар может включать только одну последовательность или может включать в себя множество последовательностей, в том числе в генетически разнообразном сочетании.

Используемый в данном документе термин "биспецифический" относится к конструкции, которая является "по меньшей мере биспецифической", т.е. она содержит по меньшей мере первый связывающий домен и второй связывающий домен, причем первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью, а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (в данном документе: CD3). Соответственно, биспецифические конструкции в соответствии с изобретением содержат типы специфичности по меньшей мере к двум разным антигенам или мишеням. Термин "биспецифическая конструкция" по данному изобретению также охватывает мультиспецифические конструкции, такие как триспецифические конструкции, последние включают в себя три связывающих домена, или конструкции, имеющие более трех (например, четыре, пять, ...) типов специфичности. В случае, когда конструкция, используемая в связи с настоящим изобретением, представляет собой конструкцию на основе антитела, такие охватываемые соответствующие конструкции представляют собой конструкции на основе мультиспецифических антител, такие как триспецифические конструкции на основе антитела, последние включают три связывающих домена, или конструкции, имеющие более трех (например, четыре, пять...) типов специфичности.

Учитывая, что конструкции на основе антитела в соответствии с изобретением являются (по меньшей мере) биспецифическими, они не встречаются в природе и значительно отличаются от продуктов природного происхождения. Таким образом, "биспецифическая" конструкция на основе антитела или иммуноглобулин является искусственным гибридным антителом или иммуноглобулином, имеющим по меньшей мере два различных сайта связывания с различной специфичностью. Биспецифические антитела могут быть получены различными способами, включая слияние гибридом или связывание Fab'-фрагментов. См., например, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990).

По меньшей мере два связывающих домена и переменные домены конструкции на основе антитела по настоящему изобретению могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Термин "пептидный линкер" в соответствии с настоящим изобретением определяется как аминокислотная последовательность, посредством которой связаны друг с другом аминокислотные последовательности одного (переменного и/или связывающего) домена и другого (переменного и/или связывающего) домена конструкции на основе антитела по данному изобретению. Существенной технической особенностью такого пептидного линкера является то, что указанный пептидный линкер не показывает никакой полимеризационной активности. В число подходящих пептидных линкеров входят описанные в патентах США № 4751180 и 4935233 или патентной заявке WO 88/09344. Пептидные линкеры также могут быть использованы для присоединения других доменов, модулей или областей (например, доменов, продлевающих период полувыведения) к конструкции на основе антитела по данному изобретению.

В случае использования линкера такой линкер предпочтительно имеет длину и последовательность, достаточные для обеспечения того, чтобы и первый и второй домены могли независимо друг от друга сохранять свои различающиеся специфичности связывания. Для пептидных линкеров, которые соединяют по меньшей мере два связывающих домена в конструкции на основе антитела по данному изобретению (или два переменных домена), предпочтительными являются пептидные линкеры, которые содержат только несколько аминокислотных остатков, например 12 аминокислотных остатков или менее. Таким образом, предпочтительным является пептидный линкер из 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 аминокислотных остатков. Предполагаемый пептидный линкер менее чем с 5 аминокислотами содержит 4, 3, 2 аминокислоты или одну аминокислоту, при этом линкеры с большим количеством глицинов (Gly) являются предпочтительными. Особенно предпочтительна ситуация, в которой "единственной" аминокислотой в контексте указанного "пептидного линкера" является Gly.

Соответственно, указанный пептидный линкер может состоять только из аминокислоты Gly. Другой предпочтительный вариант осуществления пептидного линкера характеризуется аминокислотной последовательностью Gly-Gly-Gly-Gly-Ser, т.е. Gly<sub>4</sub>Ser, или ее полимером, т.е. (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>x</sub>, где x представляет собой целое число от 1 или более. Характеристики указанного пептидного линкера, которые включают отсутствие промотирования образования вторичных структур, известны в данной области и описаны, например, в Dall'Acqua et al., Biochem. (1998), 37, 9266-9273), Cheadle et al., (Mol. Immunol. (1992), 29, 21-30) и Raag и Whitlow (FASEB (1995), 9(1), 73-80). Предпочтительными являются пептидные линкеры, которые также не способствуют образованию каких-либо вторичных структур. Связывание указанных доменов друг с другом может быть обеспечено, например, посредством генной инженерии, как описано в примерах. Способы получения слитых и функционально связанных биспецифических одноцепочечных конструкций и их экспрессия в клетках млекопитающих или бактериях хорошо известны в данной области (например, заявка на патент WO 99/54440 или Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001).

Биспецифические одноцепочечные молекулы известны в данной области и описаны в WO 99/54440,

Mack, J. Immunol. (1997), 158, 3965-3970, Mack, PNAS, (1995), 92, 7021-7025, Kufer, Cancer Immunol. Immunother., (1997), 45, 193-197, Loffler, Blood, (2000), 95, 6, 2098-2103, Brühl, Immunol., (2001 г.), 166, 2420-2426, Kipriyanov, J. Mol. Biol., (1999), 293, 41-56. Методики, описанные для производства одноцепочечных антител (см., в частности, патент США № 4946778, Kontermann and Dübel (2010), loc. cit. и Little (2009), loc. cit.), могут быть адаптированы для получения конструкций на основе одноцепочечного антитела в частности, специфически распознающих выбранные мишени.

Бивалентные (также называемые дивалентными) или биспецифические одноцепочечные переменные фрагменты (bi-scFv или di-scFv, имеющие формат (scFv)<sub>2</sub>), могут быть сконструированы путем связывания двух молекул scFv. В случае, если эти две молекулы scFv имеют одинаковую специфичность связывания, полученную (scFv)<sub>2</sub> молекулу предпочтительно будут называть бивалентной (т.е. она имеет две валентности к одному и тому же целевому эпитопу). В случае, когда две молекулы scFv имеют разную специфичность связывания, полученную молекулу (scFv)<sub>2</sub> предпочтительно будут называть биспецифической. Связывание может быть осуществлено путем получения одной пептидной цепи с двумя областями VH и двумя областями VL с образованием tandemных scFv (см., например, Kufer P. et al., (2004), Trends in Biotechnology 22(5):238-244). Другая возможность заключается в создании молекул scFv с линкерными пептидами, которые слишком коротки (например, около пяти аминокислот), чтобы две переменные области сворачивались, приводя к димеризации scFv. Такой тип известен под названием диатела (см., например, Hollinger, Philipp et al., (июль 1993 г.), Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90 (14):6444-8).

Однодоменные антитела содержат только один (мономерный) переменный домен антитела, который способен избирательно связываться со специфическим антигеном независимо от других V-областей или доменов. Первые однодоменные антитела были сконструированы из антител, состоящих из тяжелых цепей, обнаруженных у верблюдовых, и они называются фрагментами V<sub>H</sub>H. У хрящевых рыб также есть антитела из тяжелых цепей (IgNAR), из которых могут быть получены однодоменные антитела, называемые фрагментами V<sub>NAR</sub>. Альтернативный подход заключается в расщеплении димерных переменных доменов из обычных иммуноглобулинов, например, из организма человека или грызунов, на мономеры, таким образом получая VH или VL в виде однодоменного антитела. Хотя в настоящее время большинство исследований в отношении однодоменных антител основано на переменных доменах тяжелой цепи, было показано, что нанотела, полученные из легких цепей, специфически связываются с целевыми эпитопами. Примеры однодоменных антител называются sdAb, нанотелами или антителами с одним переменным доменом.

Таким образом, (однодоменное mAb)<sub>2</sub> представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую из (по меньшей мере) двух однодоменных моноклональных антител, которые индивидуально выбирают из группы, включающей VH, VL, V<sub>H</sub>H и V<sub>NAR</sub>. Линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера. Аналогично, "scFv-однодоменное mAb" представляет собой конструкцию на основе моноклонального антитела, состоящую по меньшей мере из одного однодоменного антитела, как описано выше, и одной scFv-молекулы, как описано выше. Опять же, линкер предпочтительно находится в форме пептидного линкера.

Также предполагается, что конструкция на основе антитела по данному изобретению имеет помимо своей функции связывания с целевым антигеном CD33 и CD3 еще одну функцию. В таком формате конструкция на основе антитела представляет собой трифункциональную или мультифункциональную конструкцию на основе антитела, поскольку она способна нацеливаться на клетки-мишени посредством связывания с целевым антигеном, опосредовать цитотоксическую активность Т-клеток посредством связывания CD3 и обеспечивать дополнительную функцию, такую как введение метки (флуоресцентной и т.д.), перенос терапевтического средства, такого как токсин или радионуклид и т. д.

Ковалентные модификации конструкций на основе антитела также включены в объем настоящего изобретения и обычно, но не всегда, выполняются посттрансляционно. Например, несколько типов ковалентных модификаций конструкции на основе антитела вводятся в молекулу путем взаимодействия специфичных аминокислотных остатков конструкции на основе антитела с органическим дериватирующим агентом, который способен вступать в реакцию с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками.

Остатки цистеинила чаще всего реагируют с α-галогенацетатами (и соответствующими аминами), такими как хлоруксусная кислота или хлорацетамид, с получением карбоксиметильных или карбоксимидометильных производных. Остатки цистеинила также дериватируют реакцией с бромтрифторацетоном, α-бром-β-(5-имидозоил) пропионовой кислотой, хлорацетилфосфатом, N-алкилмалеимидами, 3-нитро-2-пиридилдисульфидом, метил-2-пиридилдисульфидом, p-хлормеркурибензоатом, 2-хлормеркури-4-нитрофенолом или хлор-7-нитробензо-2-окса-1,3-диазолом.

Гистидильные остатки дериватируют реакцией с диэтилпирокарбонатом при pH 5,5-7,0, поскольку этот агент относительно специфичен к гистидильной боковой цепи. Также применяется парабромфенацилбромид; реакцию предпочтительно проводят в 0,1 М какодилате натрия при pH 6,0. Лизинил и аминоконцевые остатки реагируют с ангидридами янтарными кислоты и других карбоновых ки-

слот. Дериватизация с этими агентами приводит к изменению заряда лизиновых остатков на противоположный. Другие подходящие реагенты для дериватизации альфа-аминосодержащих остатков включают сложные имидоэфиры, такие как метилпиколинимидат; пиридоксальфосфат; пиридоксаль; хлорборгидрид; тринитробензолсульфокислоту; O-метилизомочевину; 2,4-пентандион; и катализируемую трансаминазой реакцию с глиоксилом.

Остатки аргинила модифицируют реакцией с одним или несколькими обычными реагентами, среди которых фенолглиоксаль, 2,3-бутандион, 1,2-циклогександион и нингидрин. Дериватизация остатков аргинина требует проведения реакции в щелочных условиях из-за высокого рКа гуанидиновой функциональной группы. Кроме того, данные реагенты могут реагировать с группами лизина, а также с аргинин-эпсилон-аминогруппой.

Есть возможность выполнения специфической модификации тирозильных остатков, при этом особый интерес представляет введение спектральных меток в тирозильные остатки путем взаимодействия с ароматическими соединениями диазония или тетранитрометаном. Чаще всего используют N-ацетилмидозол и тетранитрометан для образования O-ацетил-тирозильных соединений и 3-нитропроизводных соответственно. Тирозильные остатки йодируют с использованием  $^{125}\text{I}$  или  $^{131}\text{I}$  для получения меченых белков, используемых в радиоиммунологическом анализе, описанный выше способ с хлорамином T является подходящим.

Карбоксильные боковые группы (аспартил или глутамил) селективно модифицируют реакцией с карбодиимидами ( $\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N-R}'$ ), где R и R' являются необязательно различными алкильными группами, такими как 1-циклогексил-3-(2-морфолинил-4-этил)карбодиимид или 1-этил-3-(4-азоний-4,4-диметилпентил)карбодиимид. Кроме того, остатки аспартила и глутамина превращают в остатки аспарагина и глутамина реакцией с ионами аммония.

Дериватизация посредством бифункциональных агентов пригодна для перекрестного сшивания конструкций на основе антитела по настоящему изобретению с нерастворимой в воде опорной матрицей или поверхностью для использования различными способами. Обычно используемые перекрестно сшивающие агенты включают, например, 1,1-бис-(диазоацетил)-2-фенилэтан, глутаровый альдегид, сложные эфиры N-гидроксисукцинимиды, например сложные эфиры с 4-азидосалициловой кислотой, гомобифункциональные сложные имидоэфиры, включая дисукцинимидиловые сложные эфиры, такие как 3,3'-дитио-бис-(сукцинимидилпропионат), и бифункциональные малеимиды, такие как бис-N-малеимидо-1,8-октан. Дериватирующие агенты, такие как метил-3-[(п-азидофенил)дитио]-пропиоимидат, позволяют получать фотоактивируемые интермедиаты, которые способны образовывать поперечные связи в присутствии света. Альтернативно, реакционноспособные нерастворимые в воде матрицы, такие как активированные цианбромидом углеводы, и реакционноспособные субстраты, описанные в патентах США № 3969287, 3691016; 4195128; 4247642; 4229537 и 4330440, используются для иммобилизации белка.

Глутаминильные и аспарагинильные остатки часто дезамидируют с соответствующими остатками глутамина и аспартила соответственно. Альтернативно, такие остатки дезамидируют в слабощелочных условиях. Каждая форма этих остатков входит в объем настоящего изобретения.

Другие модификации включают гидроксирование пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп сериловых или треониловых остатков, метилирование  $\alpha$ -аминогрупп лизиновых, аргининовых и гистидиновых боковых цепей (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983 г., стр. 79-86), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другой тип ковалентной модификации конструкций на основе антитела, включенных в объем настоящего изобретения, включает изменение профиля гликозилирования белка. Как известно в данной области, профили гликозилирования могут зависеть как от последовательности белка (например, наличия или отсутствия конкретных аминокислотных остатков гликозилирования, обсуждаемых ниже), так и от клетки-хозяина или организма, в котором образуется белок. Конкретные системы экспрессии рассмотрены ниже.

Гликозилирование полипептидов обычно либо является N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксиаминокислоте, чаще всего серину или треонину, хотя также могут быть использованы 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

Добавление сайтов гликозилирования к конструкции на основе антитела обычно осуществляют путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или несколько описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования). Изменение может также быть выполнено путем добавления одного или нескольких остатков серина

или треонина в исходную последовательность или замещения ими (для сайтов О-связанного гликозилирования). Для удобства аминокислотная последовательность конструкции на основе антитела предпочтительно изменяется с помощью изменений на уровне ДНК, в частности, путем мутации кодирующей полипептид ДНК на заранее выбранных основаниях, так что генерируются кодоны, которые будут транслироваться в нужные аминокислоты.

Другим способом увеличения количества углеводных фрагментов в конструкции на основе антитела является химическое или ферментативное связывание гликозидов с белком. Такие процедуры дают преимущества в том, что они не требуют выработки в клетке-хозяине белка, обладающего способностью гликозилирования для N-и О-связанного гликозилирования. В зависимости от используемого режима связывания сахара могут быть присоединены к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (с) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группам, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (е) ароматическим остаткам, таким как группы фенилаланина, тирозина или триптофана, или (f) амидной группе глутамина. Такие способы описаны в заявке на патент WO 87/05330 и в Aplin и Wriston, 1981 г., CRC Crit. Rev. Biochem., стр. 259-306.

Удаление углеводных фрагментов, присутствующих в исходной конструкции на основе антитела, может быть осуществлено химическими или ферментативными методами. Химическое дегликозилирование требует воздействия на белок соединения трифторметансульфоновой кислоты или эквивалентного соединения. Подобная обработка приводит к расщеплению большинства или всех сахаров, за исключением связующего сахара (N-ацетилглюкозамина или N-ацетилгалактозамина), оставляя полипептид неизменным. Химическое дегликозилирование описано Nakimuddin et al., 1987 г., Arch. Biochem. Biophys. 259:52 и Edge et al., 1981 г., Anal. Biochem. 118:131. Ферментативное расщепление углеводных фрагментов на полипептидах может быть достигнуто за счет использования множества эндо- и экзогликозидаз, как описано Thotakura et al., 1987, Meth. Enzymol. 138:350. Гликозилирование на потенциальных сайтах гликозилирования может быть предотвращено с помощью соединения туникамицин, как описано у Duskin et al., 1982, J. Biol. Chem. 257:3105. Туникамицин блокирует образование белково-N-гликозидных связей.

В данном документе рассматриваются другие модификации конструкции на основе антитела. Например, другой тип ковалентной модификации конструкции на основе антитела включает связывание конструкции на основе антитела с различными небелковыми полимерами, включая, но не ограничиваясь ими, различные полиолы, такие как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, способом, описанным в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337. Кроме того, как известно в данной области, могут быть выполнены аминокислотные замещения в различных положениях внутри конструкции на основе антитела, например, для облегчения добавления полимеров, таких как ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления ковалентная модификация конструкций на основе антитела по данному изобретению включает добавление одной или нескольких меток. Маркирующая группа может быть соединена с конструкцией антитела посредством спейсерных групп различной длины для уменьшения потенциального стерического препятствия. Различные способы маркировки белков известны в данной области и могут быть использованы при осуществлении настоящего изобретения. Термин "метка" или "группа маркировки" относится к любой обнаруживаемой метке. В общем, метки делятся на различные классы, в зависимости от анализа, в котором они должны быть обнаружены. Следующие примеры включают, но не ограничиваются, следующие метки:

- a) изотопные метки, которые могут представлять собой радиоактивные или тяжелые изотопы, такие как радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ );
- b) магнитные метки (например, магнитные частицы);
- c) окислительно-восстановительные активные группы;
- d) оптический краситель (включая, но не ограничиваясь ими, хромофоры, люминофоры и флуорофоры), такие как флуоресцентные группы (например, FITC, родамин, лантаноидные люминофоры), хемилюминесцентные группы и флуорофоры, которые могут быть либо "низкомолекулярными" флуорофорами, либо белковыми флуорофорами;
- e) ферментативные группы (например, пероксидаза хрена,  $\beta$ -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза);
- f) биотинилированные группы;
- g) предопределенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей с лейциновыми застежками, сайты связывания для вторичных антител, связывающие металлы домены, эпитопные метки и т.д.).

Под "флуоресцентной меткой" понимается любая молекула, которая может быть обнаружена благодаря присущим ей флуоресцентным свойствам. Подходящие флуоресцентные метки включают, но не ограничиваются ими, флуоресцеин, родамин, тетраметилродамин, эозин, эритрозин, кумарин, метилкумарины, пирен, малахитовый зеленый, стильбен, Lucifer Yellow, Cascade Blue J, Texas Red, IAEDANS, EDANS, BODIPY FL, LC Red 640, Cy5, Cy5.5, LC Red 705, Oregon green, красители Alexa-Fluor (Alexa

Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680), Cascade Blue, Cascade Yellow и R-фикоэритрин (PE) (молекулярные зонды, г. Юджин, штат Орегон, США), FITC, родамин и Texas Red (Pierce, г. Рокфорд, штат Иллинойс, США), Cy5, Cy5.5, Cy7 (Amersham Life Science, г. Питтсбург, штат Пенсильвания, США). Подходящие оптические красители, включая флуорофоры, описаны в справочнике *Molecular Probes Handbook* за авторством Richard P. Haugland.

Подходящие белковые флуоресцентные метки также включают, но не ограничиваются ими, зеленый флуоресцентный белок, в том числе виды Renilla, Ptilosarcus или Aequorea GFP (Chalfie et al., 1994, *Science*, 263:802-805), EGFP (Clontech Laboratories, Inc., учетный номер Genbank U55762), синий флуоресцентный белок (BFP, Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8-й этаж, г. Монреаль, Квебек, Канада Н3Н 1J9, Stauber, 1998, *Biotechniques*, 24:462-471; Heim et al., 1996, *Curr. Biol.* 6:178-182), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP, Clontech Laboratories, Inc.), люциферазу (Ichiki et al., 1993, *J. Immunol.* 150:5408-5417),  $\beta$ -галактозидазу (Nolan et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:2603-2607) и Renilla (WO 92/15673, WO 95/07463, WO 98/14605, WO 98/26277, WO 99/49019, патенты США 5292658, 5418155, 5683888, 5741668, 5777079, 5804387, 5874304, 5876995, 5925558).

Домены лейциновых застежек представляют собой пептиды, которые способствуют олигомеризации белков, в которых они обнаружены. Лейциновые застежки были первоначально идентифицированы в нескольких ДНК-связывающих белках (Landschulz et al., 1988, *Science*, 240:1759) и с тех пор были обнаружены во множестве различных белков. Среди известных лейциновых застежек есть встречающиеся в природе пептиды и их производные, способные к димеризации или тримеризации. Примеры доменов лейциновых застежек, подходящих для получения растворимых олигомерных белков, описаны в заявке на патент PCT WO 94/10308, а лейциновая застежка, полученная из белка сурфактанта легких D (SPD), описана у Hoppe et al., 1994, *FEBS Letters* 344:191. Использование модифицированной лейциновой застежки, которая обеспечивает стабильную тримеризацию гетерологичного белка, слитого с ней, описано в Fanlow et al., 1994, *Semin. Immunol.* 6:267-78. В одном подходе рекомбинантные слитые белки, содержащие фрагмент антитела целевого антигена или производное, слитое с пептидом лейциновой застежки, экспрессируются в подходящих клетках-хозяевах, а растворимые олигомерные фрагменты антитела целевого антигена или образующиеся производные выделяют из супернатанта культуры.

Конструкция антитела по данному изобретению может также содержать дополнительные домены, которые, например, полезны при выделении молекулы или относятся к адаптированному фармакокинетическому профилю молекулы. Домены, способствующие выделению конструкции на основе антитела, могут быть выбраны из пептидных мотивов или вторично введенных фрагментов, которые могут быть захвачены посредством способа выделения, например с использованием колонки для выделения. Неограничивающие варианты осуществления таких дополнительных доменов включают пептидные мотивы, известные как Myc-tag, HA-tag, HA-tag, TAP-tag, GST-tag, связывающий хитин домен (CBD-tag), мальтозосвязывающий белок (MBP-tag), Flag-tag, Strep-tag и их варианты (например, StrepII-tag) и His-tag. Все раскрытые в данном документе конструкции на основе антитела, характеризующиеся идентифицированными CDR, предпочтительно должны содержать домен His-tag, который обычно известен как повтор последовательных His-остатков в аминокислотной последовательности молекулы, предпочтительно должно быть шесть His-остатков.

T-клетки или T-лимфоциты представляют собой тип лимфоцитов (сами являющиеся типом лейкоцитов), которые играют центральную роль в клеточно-опосредованном иммунитете. Существует несколько субпопуляций T-клеток, каждая из которых имеет определенную функцию. T-клетки можно отличать от других лимфоцитов, таких как B-клетки и NK-клетки, благодаря наличию на поверхности клетки T-клеточного рецептора (ТКР). ТКР отвечает за распознавание антигенов, связанных с молекулами главного комплекса гистосовместимости (КГС) и состоит из двух различных белковых цепей. В 95% T-клеток ТКР состоит из альфа ( $\alpha$ )- и бета ( $\beta$ )-цепей. При взаимодействии ТКР с антигенным пептидом и КГС (комплекс пептид/КГС), T-лимфоцит активируется посредством ряда биохимических событий, опосредуемых ассоциированными ферментами, корецепторами, специализированными адапторными молекулами и активированными или высвобождаемыми факторами транскрипции.

Рецепторный комплекс CD3 представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех цепей. У млекопитающих комплекс содержит цепь CD3 $\gamma$  (гамма), цепь CD3 $\delta$  (дельта) и две цепи CD3 $\epsilon$  (эпсилон). Данные цепи связываются с T-клеточным рецептором (ТКР) и так называемой  $\zeta$ , (дзета)-цепью с образованием комплекса CD3-рецептора T-клеток и генерацией сигнала активации в T-лимфоцитах. Цепи CD3 $\gamma$  (гамма), CD3 $\delta$  (дельта) и CD3 $\epsilon$  (эпсилон) представляют собой близкородственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM, который необходим для сигнальной способности ТКР. Молекула CD3-эпсилон представляет собой полипептид, который у человека кодируется геном CD3E, находящимся на хромосоме 11. Последовательность предпочтительного внеклеточного до-

мена CD3-эпсилон показана в SEQ ID NO: 1, и наиболее предпочтительный CD3-связывающий эпитоп, соответствующий аминокислотным остаткам 1-27 внеклеточного домена CD3-эпсилон человека, представлен в SEQ ID NO: 2.

Перенаправленный лизис клеток-мишеней посредством рекрутинга Т-клеток мультиспецифической, по меньшей мере биспецифической конструкции на основе антитела включает образование цитолитического синапса и доставку перфорина и гранзимов. Вовлеченные Т-клетки способны к последовательному лизису клеток-мишеней и не подвергаются влиянию механизмов ухода от иммунного ответа, мешающих процессингу и презентации пептидного антигена или клональной дифференциации Т-клеток; см., например, WO 2007/042261.

Цитотоксичность, опосредованная биспецифическими конструктами, может быть измерена различными способами. Эффекторными клетками могут быть, например, стимулированными обогащенными (человеческими) CD8-положительными Т-клетками или нестимулированными (человеческими) мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC). Если клетки-мишени происходят от макаки или экспрессируют антиген клетки-мишени макаки или трансфицированы им, эффекторными клетками также должны происходить от макаки, например от линии Т-клеток макаки, например 4119LnPx. Клетки-мишени должны экспрессировать (по меньшей мере внеклеточный домен) антигена клетки-мишени, например антиген клетки-мишени человека или макаки. Клетки-мишени могут представлять собой клеточную линию (такую как CHO), которая стабильно или временно трансфицирована антигеном клетки-мишени, например антигеном клетки-мишени человека или макаки. В качестве альтернативы, клетки-мишени могут представлять собой антиген-позитивную природную экспрессирующую линию клеток-мишеней, такую как линия злокачественных клеток человека. Как правило, ожидается, что значения EC<sub>50</sub> будут ниже с линиями клеток-мишеней, экспрессирующих на поверхности клетки более высокие уровни антигена клетки-мишени. Соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E:T) обычно составляет около 10:1, но также может изменяться. Цитотоксическую активность биспецифических конструкций можно измерять посредством анализа высвобождения хрома<sup>-51</sup> (время инкубации около 18 ч) или в анализе цитотоксичности на основе FACS (время инкубации около 48 ч). Также возможны модификации времени инкубации анализа (цитотоксическая реакция). Другие методы измерения цитотоксичности хорошо известны специалисту в данной области и включают в себя анализы с МТТ или MTS, анализы на основе АТФ, включая биолюминесцентные анализы, анализ с сульфородаминем В (SRB), анализ с WST, клоногенный анализ и технологию ECIS.

Цитотоксическую активность, опосредованную биспецифическими конструкциями по настоящему изобретению, предпочтительно измеряют в анализе цитотоксичности на основе клеток. Она представлена значением EC<sub>50</sub>, которое соответствует полумаксимальной эффективной концентрации (концентрация конструкции на основе антитела, которая индуцирует цитотоксический ответ, находящийся посередине между исходным уровнем и максимумом). Предпочтительно, значение EC<sub>50</sub> биспецифических конструкций составляет ≤20000 пг/мл, более предпочтительно ≤5000 пг/мл, еще более предпочтительно ≤1000 пг/мл, еще более предпочтительно ≤500 пг/мл, еще более предпочтительно ≤350 пг/мл, еще более предпочтительно ≤250 пг/мл, еще более предпочтительно ≤100 пг/мл, еще более предпочтительно ≤50 пг/мл, еще более предпочтительно ≤10 пг/мл и наиболее предпочтительно ≤5 пг/мл.

Любое из вышеприведенных значений EC<sub>50</sub> может быть объединено с любым из указанных сценариев анализа цитотоксичности на основе клеток, например, в соответствии со способами, описанными в прилагаемом примере. Например, при использовании в качестве эффекторных клеток (человеческих) CD8-позитивных Т-клеток или линии Т-клеток макаки значение EC<sub>50</sub> биспецифической конструкции по изобретению (например, биспецифической конструкции к антигену клетки-мишени/CD3) предпочтительно составляет ≤1000 пг/мл, более предпочтительно ≤500 пг/мл, еще более предпочтительно ≤250 пг/мл, еще более предпочтительно ≤100 пг/мл, еще более предпочтительно ≤50 пг/мл, еще более предпочтительно ≤10 пг/мл и наиболее предпочтительно ≤5 пг/мл. Если в данном анализе клетки-мишени представляют собой клетки (человека или макаки), трансфицированные целевым антигеном (например, антиген CD33 клетки-мишени), такие как клетки CHO, значение EC<sub>50</sub> биспецифической конструкции предпочтительно составляет ≤150 пг/мл, более предпочтительно ≤100 пг/мл, еще более предпочтительно ≤50 пг/мл, еще более предпочтительно ≤30 пг/мл, еще более предпочтительно ≤10 пг/мл и наиболее предпочтительно ≤5 пг/мл. Если клетки-мишени представляют собой позитивную природную экспрессирующую клеточную линию (например, антигена клетки-мишени), то значение EC<sub>50</sub> предпочтительно составляет ≤350 пг/мл, более предпочтительно ≤250 пг/мл, еще более предпочтительно ≤200 пг/мл, еще больше предпочтительно ≤100 пг/мл, еще более предпочтительно ≤150 пг/мл, еще более предпочтительно ≤100 пг/мл и наиболее предпочтительно ≤50 пг/мл или ниже. При использовании в качестве эффекторных клеток (человеческих) PBMC значение EC<sub>50</sub> биспецифической конструкции предпочтительно составляет ≤1000 пг/мл, более предпочтительно ≤750 пг/мл, более предпочтительно ≤500 пг/мл, еще более предпочтительно ≤350 пг/мл, еще более предпочтительно ≤250 пг/мл, еще более предпочтительно ≤100 пг/мл и наиболее предпочтительно ≤50 пг/мл или ниже.

Предпочтительно биспецифические конструкции по настоящему изобретению не индуцируют/не

опосредуют лизис или по существу не индуцируют/не опосредуют лизис клеток, негативных в отношении антигена клетки-мишени, таких как клетки СНО. Термин "не индуцируют лизис", "по существу не индуцируют лизис", "не опосредует лизис" или "по существу не опосредует лизис" означает, что конструкции на основе антитела по настоящему изобретению не индуцируют или не опосредуют лизис более 30%, предпочтительно не более 20%, более предпочтительно не более 10%, особенно предпочтительно не более 9, 8, 7, 6 или 5% клеток, негативных в отношении антигена клеток-мишеней, при этом лизис позитивной в отношении антигена клеток-мишеней клеточной линии принят за 100%. Подобное отношение, как правило, применимо к концентрациям конструкции на основе антитела до 500 нМ. Специалист в данной области знает, как измерить лизис клеток без дополнительных затруднений. Кроме того, в настоящем описании приведены конкретные инструкции по измерению клеточного лизиса.

Предпочтительно биспецифическую конструкцию для применения в соответствии с изобретением вводят в соответствии со схемой, включающей следующие последовательности:

- (a) введение первой дозы биспецифической конструкции с последующим
- (b) введение второй дозы биспецифической конструкции, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу, необязательно с последующим
- (c) введение третьей дозы биспецифической конструкции, причем указанная необязательная третья доза превышает указанную вторую дозу.

В соответствии с вышеизложенным также предпочтительно, чтобы период введения первой дозы составлял до семи дней. Данный период введения первой дозы может быть использован во время начальной фазы/первого цикла введения биспецифической конструкции, например, для снижения опухолевой нагрузки у пациента (уменьшение размеров опухоли), избегая при этом таких условий как цитокиновый шторм и/или синдром высвобождения цитокинов, чего следовало бы ожидать в случае использования более высокой дозы в течение периода введения первой дозы.

Хотя в одном варианте осуществления изобретения период введения первой дозы составляет до семи дней, в данный предпочтительный вариант осуществления входит введение такой первой дозы в течение периода из шести дней, пяти дней, четырех дней, трех дней, двух дней или одного дня. В случае, когда опухолевая нагрузка или общее состояние отдельного пациента требует введения ограниченной дозы биспецифической конструкции на первой стадии с ограниченной дозой, такое введение первой последовательности дозы понимается как вводная фаза/фаза адаптации, которая должна позволить избежать или ограничить побочные эффекты, возникающие в результате первого контакта пациента с биспецифической конструкцией.

Предпочтительный диапазон для дозы в такой вводной фазе/фазе адаптации может находиться в диапазоне от 1 до 50 мкг/д., предпочтительно в диапазоне от 3 до 30 мкг/д., более предпочтительно в диапазоне от 4 до 20 мкг/д. и еще более предпочтительно в диапазоне от 5 до 15 мкг/д. для канонического ViTE®, такого как AMG 330, который представляет собой одноцепочечный полипептид массой 54 кДа. В очень предпочтительном варианте осуществления биспецифическую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением вводят в дозе 10 мкг/д. В случае биспецифической конструкции на основе антитела с продленным периодом полувыведения можно с легкостью определять соответствующие эквивалентные дозы. Однако в случае, если опухолевая нагрузка или общее состояние отдельного пациента не требует такого введения ограниченной дозы биспецифической конструкции при введении первой последовательности с ограниченной дозой, то уже первая доза может находиться в данном диапазоне.

Предпочтительные диапазоны для второй дозы биспецифической конструкции, например для канонического ViTE®, такого как AMG 330, находятся в диапазоне от 10 мкг/д. до 10 мг/д., более предпочтительно в диапазоне от 25 мкг/д. до 1 мг/д. и еще более предпочтительно в диапазоне 30 мкг/д. до 500 мкг/д. В наиболее предпочтительном варианте осуществления вторая доза составляет 30 мкг/д. или 60 мкг/д. В соответствии с вышеизложенным предпочтительные диапазоны для третьей дозы биспецифической конструкции превышают соответствующую дозу второй дозы. Третья доза обычно находится в диапазоне от 60 до 500 мкг/д. и предпочтительно уничтожает остаточные клетки-мишени, которые могут избежать воздействия эквивалентного второй дозе лечения в соответствии с настоящим изобретением.

В одном варианте осуществления биспецифической конструкции для применения по данному изобретению полный период введения последовательности дозы после первой дозы находится в диапазоне от 8 до 13 дней. В соответствии с вышеизложенным полный период введения разных последовательностей доз не превышает 14 дней. Соответственно, период введения второй и необязательной третьей дозы биспецифической конструкции может составлять предпочтительно 13, 12, 11, 10, 9 или 8 дней, наиболее предпочтительно 10 дней.

Неожиданно было обнаружено, что при применении ступенчатого дозирования, например, если первая доза вводится в течение четырех дней, а вторая доза вводится в течение 10 дней, причем первая доза составляет от 5 до 15 мкг/д., предпочтительно 10 мкг/д., а вторая доза составляет от 30 до 500 мкг/д., предпочтительно 30 или 60 мкг/д., то иммунологические побочные эффекты, такие как нежелательное высвобождение цитокинов, например синдром высвобождения цитокинов, могут быть эффективно предотвращены. Напротив, если доза, эквивалентная второй дозе, введена без предшествующей более низ-

кой дозы, эквивалентной первой дозе настоящего изобретения, возможно появление побочных эффектов, таких как нежелательное высвобождение цитокинов, например синдром высвобождения цитокинов.

Также предпочтительным для настоящего изобретения является период введения второй дозы от четырех до семи дней, предпочтительно четыре дня и период введения третьей дозы от четырех до семи дней. Соответственно, особенно предпочтителен период введения второй дозы 7, 6, 5 или 4 дня, а период введения необязательной третьей дозы - 7, 6, 5 или 4 дня.

Также в соответствии с настоящим изобретением лечение миелоидного лейкоза предпочтительно включает два или более цикла лечения, каждый из которых включает максимальный период в 14 дней введения конструкции, за которым следует период по меньшей мере 14 дней без введения конструкции. В случае, если лечение в соответствии с изобретением состоит из двух или более циклов, в одном варианте осуществления дополнительно предпочтительно, чтобы только первый цикл лечения включал введение в соответствии с последовательностью (a), тогда как следующие циклы начинались с дозы в соответствии с последовательностью (b).

Также в соответствии с настоящим изобретением для биспецифической конструкции, используемой при лечении миелоидного лейкоза, предпочтительно, чтобы первый связывающий домен биспецифической конструкции включал группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-12 и 14-16, 22-24 и 26-28, 34-36 и 38-40, 46-48 и 50-52, 58-60 и 62-64, 70-72 и 74-76, 82-84 и 86-88, 94-96 и 98-100.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением для биспецифической конструкции, используемой при лечении миелоидного лейкоза, предпочтительно, чтобы второй связывающий домен биспецифической конструкции включал группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-14, 27-32, 45-50, 63-68, 81-86, 99-104, 117-122, 135-140, 153-158 и 171-176 в соответствии с заявкой WO 2008/119567.

Как и второй связывающий домен, первый (или любой другой) связывающий домен конструкции на основе антитела по данному изобретению имеют межвидовую специфичность к представителям млекопитающим из отряда приматов. Домены, связывающие CD3 с межвидовой специфичностью описаны, например, в WO 2008/119567. В соответствии с одним вариантом осуществления первый и второй связывающие домены, в дополнение к связыванию с человеческим антигеном CD33 клетки-мишени и человеческим CD3, соответственно, будут также связываться с антигеном CD33 клетки-мишени/CD3 приматов, включая (но не ограничиваясь ими) приматов Нового Света (таких как *Callithrix jacchus*, *Saguinus Oedipus* или *Saimiri sciureus*), приматов Старого Света (таких как бабуины и макаки), гиббонов и представителей подсемейства *homininae*, не относящихся к людям. *Callithrix jacchus* и *Saguinus oedipus* относятся к приматам Нового Света, принадлежащим к семейству *Callitrichidae*, тогда как *Saimiri sciureus* - примат Нового Света, принадлежащий к семейству *Cebidae*.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения биспецифическая конструкция представляет собой биспецифическую конструкцию на основе антитела. В соответствии с приведенными выше определениями, данный вариант осуществления относится к биспецифическим конструкциям, которые являются конструкциям на основе антитела. В предпочтительном варианте осуществления изобретения биспецифическая конструкция на основе антитела представляет собой одноцепочечную конструкцию. Такая биспецифическая одноцепочечная конструкция на основе антитела может содержать в соответствии с изобретением аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 30, 31, 32, 42, 43, 44, 54, 55, 56, 66, 67, 68, 78, 79, 80, 90, 91, 92, 102, 103, 104, 105, 106, 107 и 108.

Также предполагаются модификации аминокислотной последовательности описанных в данном документе биспецифических конструкций. Например, может быть желательным улучшить аффинность связывания и/или другие биологические свойства биспецифической конструкции. Варианты аминокислотной последовательности биспецифических конструкций получают путем введения соответствующих нуклеотидных изменений в нуклеиновую кислоту биспецифических конструкций или путем пептидного синтеза. Все описанные ниже модификации аминокислотных последовательностей должны приводить к получению биспецифической конструкции, которая по-прежнему сохраняет желаемую биологическую активность (связывание с антигеном клетки-мишени и CD3) немодифицированной родительской молекулы.

Термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток" типично относится к аминокислоте, имеющей признанное в данной области определение, как, например, к аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из следующих: аланин (Ala или A); аргинин (Arg или R); аспарагин (Asp или N); аспарагиновая кислота (Asp или D); цистеин (Cys или C); глутамин (Gln или Q); глутаминовая кислота (Glu или E); глицин (Gly или G); гистидин (His или H); изолейцин (Ile или I); лейцин (Leu или L); лизин (Lys или K); метионин (Met или M); фенилаланин (Phe или F); пролин (Pro или P); серин (Ser или S); треонин (Thr или T); триптофан (Trp или W); тирозин (Tyr или Y) и валин (Val или V), хотя при желании могут быть использованы и модифицированные, синтетические или редкие аминокислоты. Обычно аминокислоты можно объединять в группы как имеющие неполярную боковую цепь (например, Ala, Cys, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Val); отрицательно заряженную боковую цепь (например, Asp, Glu); положительно заряженную

боковую цепь (например, Arg, His, Lys) или незаряженную полярную боковую цепь (например, Asp, Cys, Gln, Gly, His, Met, Phe, Ser, Thr, Trp и Tyr).

Модификации аминокислот включают, например, делеции и/или вставки и/или замещения остатков в аминокислотных последовательностях биспецифических конструкций. Любая комбинация удаления, вставки и замещения производится для получения окончательной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками. Аминокислотные изменения также могут изменять посттрансляционные процессы биспецифических конструкций, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования.

Например, в каждом из CDR могут быть вставлены или удалены 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот (конечно, в зависимости от длины), в то время как в каждом из каркасных областей (FR) могут быть вставлены или удалены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот. Предпочтительно, вставки аминокислотной последовательности включают в себя amino- и/или карбоксиконцевые слияния, имеющие длину от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 остатков до полипептидов, содержащих 100 или более остатков, а также внутрипоследовательные вставки одного или нескольких аминокислотных остатков. Вариант вставки в биспецифическую конструкцию по изобретению включает слияние фермента с N-концом или C-концом биспецифической конструкции или слияние с полипептидом, который увеличивает период полувыведения биспецифической конструкции из сыворотки.

Увеличенный период полувыведения обычно полезен при применении *in vivo* иммуноглобулинов, особенно антител и, в особенности, фрагментов антител небольшого размера. Хотя такие конструкции на основе фрагментов антител (Fv, дисульфидно связанные Fv, Fab, scFv, dAb) способны быстро достигать большинства частей тела, такие конструкции на основе антитела, вероятно, будут достаточно быстро выводиться из организма. Стратегии, описанные в данной области техники для расширения периода полувыведения конструкций на основе антитела, таких как одноцепочечные диатела, включают конъюгацию полиэтиленгликолевых цепей (пэгилирование), слияние с областью IgG Fc, с альбумином или альбуминсвязывающим доменом.

Сывороточный альбумин представляет собой белок, физиологически продуцируемый печенью; он растворяется в плазме крови и является наиболее распространенным белком крови у млекопитающих. Альбумин необходим для поддержания онкотического давления, необходимого для надлежащего распределения жидкостей организма между кровеносными сосудами и тканями организма. Он также действует как носитель плазмы путем неспецифического связывания нескольких гидрофобных стероидных гормонов и в качестве транспортного белка для гемина и жирных кислот. Термин "сывороточный альбумин", соответственно, его человеческий вариант ("человеческий альбумин") определяется в контексте изобретенных белков либо как родительский сывороточный белок человека (последовательность в соответствии с описанием в SEQ ID NO: 109) или любой вариант (например, такой как белок альбумина, указанный в SEQ ID NO: 110-138), или его фрагмент, предпочтительно экспрессируемые в виде генетических гибридных белков, и химически сшитые и т. д. по меньшей мере с одним терапевтическим белком. Варианты, содержащие одиночные или множественные мутации или фрагменты альбумина обеспечивают улучшенные свойства, такие как аффинность к рецептору FcRn и удлиненный период полувыведения из плазмы по сравнению с родительским или референтным. Варианты альбумина человека описаны, например, в заявке на патент WO 2014/072481. В соответствии с изобретением сывороточный альбумин может быть связан с конструкцией на основе антитела с помощью пептидного линкера. Предпочтительно, чтобы пептидный линкер имел аминокислотную последовательность  $(GGGGS)_n$  (SEQ ID NO: 13)<sub>n</sub>, где "n" представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 5. Кроме того, предпочтительным является вариант, в котором "n" представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 3 и наиболее предпочтительно "n" равно 1 или 2.

Сайты, представляющие наибольший интерес для замещающего мутагенеза, включают CDR тяжелой и/или легкой цепи, в частности гипервариабельные области, но также рассматриваются изменения FR в тяжелой и/или легкой цепи. Замещения предпочтительно представляют собой консервативные замещения в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе. Предпочтительно в CDR могут быть замещены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, тогда как в каркасных областях (FR) могут быть замещены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или 25 аминокислот. Например, если последовательность CDR включает 6 аминокислот, предполагается, что одна, две или три из этих аминокислот замещены. Аналогично, если последовательность CDR включает 15 аминокислот, предполагается, что одна, две, три, четыре, пять или шесть из этих аминокислот замещены.

Полезный способ идентификации определенных остатков или областей биспецифических конструкций, которые являются предпочтительными местами для мутагенеза, называется "мутагенезом на основе аланинового сканирования", как описано Cunningham and Wells в Science, 244:1081-1085 (1989). В данном документе идентифицируют остаток или группу остатков-мишеней в биспецифической конструкции (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (наиболее предпочтительно - аланином или полиаланином), чтобы повлиять на взаимодействие аминокислот в пределах эпитопа.

Те положения аминокислот, которые демонстрируют функциональную чувствительность к замеще-

ниям, затем уточняют введением дополнительных или других вариантов на сайтах замещения или около них. Таким образом, хотя сайт или область для введения вариации аминокислотной последовательности predeterminedены, сама по себе природа мутации не должна быть predeterminedена. Например, для анализа или оптимизации эффективности мутации на данном сайте может проводиться аланиновое сканирование или случайный мутагенез в целевом кодоне или области, и экспрессируемые варианты биспецифической конструкции подвергаются скринингу для определения оптимального сочетания желаемой активности. Способы выполнения замещающих мутаций на заранее определенных участках ДНК, имеющих известную последовательность, хорошо известны, например мутагенез с праймером M13 и ПЦР-мутагенез. Скрининг мутантов проводят с использованием анализов активности связывания целевого антигена.

Как правило, если аминокислоты замещены в одном или нескольких или всех CDR тяжелой и/или легкой цепи, предпочтительно, чтобы полученная тогда "замещенная" последовательность была по меньшей мере на 60%, более предпочтительно на 65%, еще больше предпочтительно на 70%, особенно предпочтительно на 75%, более предпочтительно на 80% идентична "оригинальной" CDR-последовательности. Это означает, что степень идентичности "замещенной" последовательности зависит от длины CDR. Например, CDR, содержащий 5 аминокислот, должен быть предпочтительно на 80% идентичен своей замещенной последовательности, чтобы иметь по меньшей мере одну замещенную аминокислоту. Соответственно, CDR биспецифической конструкции на основе антитела могут иметь разную степень идентичности с соответствующими замещенными последовательностями, например идентичность CDRL1 может составлять 80%, тогда как идентичность CDRL3 может составлять 90%.

Предпочтительные замещения (или замены) являются консервативными замещениями. Однако любое замещение (включая неконсервативное замещение или одно или более иллюстративных замещений, перечисленных в табл. 1) предусматривается до тех пор, пока биспецифическая конструкция сохраняет свою способность связываться с антигеном клетки-мишени на первом связывающем домене и связываться с CD3-эпсилон на втором связывающем домене и/или ее CDR имеют идентичность с полученной затем последовательностью с замещением (будут по меньшей мере на 60%, более предпочтительно на 65%, еще более предпочтительно на 70%, особенно предпочтительно на 75%, более предпочтительно на 80% идентичны "исходной" CDR-последовательности).

Консервативные замещения приведены в табл. 1 под заголовком "предпочтительные замещения". Если такие замещения приводят к изменению биологической активности, то могут быть введены более существенные изменения, обозначенные в табл. А как "иллюстративные замещения" или как дополнительно описано в отношении классов аминокислот, и продукты могут быть подвергнуты скринингу на желаемые характеристики.

Таблица А

## Аминокислотные замены

Исходные	Иллюстративные замещения	Предпочтительные замещения
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys, gln, asn	lys
Asn (N)	gln, his, asp, lys, arg	gln
Asp (D)	glu, asn	glu
Cys (C)	ser, ala	ser
Gln (Q)	asn, glu	asn
Glu (E)	asp, gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn, gln, lys, arg	arg
Ile (I)	leu, val, met, ala, phe	leu
Leu (L)	норлейцин, ile, val, met, ala	ile
Lys (K)	arg, gln, asn	arg
Met (M)	leu, phe, ile	leu
Phe (F)	leu, val, ile, ala, tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr, phe	tyr
Tyr (Y)	trp, phe, thr, ser	phe
Val (V)	ile, leu, met, phe, ala	leu

Существенные модификации биологических свойств биспецифической конструкции по настоящему изобретению осуществляются путем выбора замещений, которые существенно различаются по своему влиянию на поддержание (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде плоской или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы на целевом сайте или (с) общей части боковой цепи. Естественным образом встречающиеся в природе остатки возможно разделить на группы, основанные на общих свойствах боковой цепи: (1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile; (2) нейтрально гидрофильные: cys, ser, thr, asn, gln; (3) кислотные: asp, glu; (4) основные: his, lys, arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: gly, pro; и (6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замещения влекут за собой замену члена одного из данных классов на член другого класса. Любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании надлежащей конформации биспецифической конструкции, может быть замещен, как правило, серином, для улучшения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения aberrантного сшивания. И наоборот, цистеиновые связи могут быть добавлены к антителу для улучшения его стабильности (в частности, когда антитело является фрагментом антитела, таким как фрагмент Fv).

Для аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательностей определяют с использованием стандартных методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, алгоритм идентификации локальной последовательности Smith and Waterman, 1981 г., Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания идентичности последовательностей Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443, способ поиска сходств Pearson and Lipman, 1988 г., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, компьютеризованные реализации данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин), программа Best Fit sequence, описанная Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387-395, предпочтительно с использованием настроек по умолчанию, или путем проверки. Предпочтительно процентная идентичность вычисляется с использованием FastDB на основе следующих параметров: mismatch penalty (штраф за ошибочное спаривание) - 1; gap penalty (штраф за пропуск в последовательности) - 1; gap size penalty (штраф за размер пропуска в последовательности) - 0,33 и joining penalty (штраф за соединение) - 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, p. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.

Примером подходящего алгоритма является PILEUP. Алгоритм PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей с использованием про-

грессивных парных выравниваний. Он также может отображать дерево, показывающее отношения кластеризации, используемые для создания выравнивания. Алгоритм PILEUP использует упрощение метода прогрессивного выравнивания Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360; метод аналогичен методу, описанному Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS*, 5:151-153. Применимые параметры PILEUP включают следующие: default gap weight (штраф за делецию по умолчанию) - 3,00, default gap length weight (штраф за продолжение делеции по умолчанию) - 0,10 и weighted end gaps (оцениваемые концевые делеции).

Другим примером применимого алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; и Karin et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5787. Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная у Altschul et al., 1996, *Methods in Enzymology*, 266:460-480. Программа WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, большинство из которых имеют настроенные значения по умолчанию. Регулируемые параметры задаются со следующими значениями: overlap span (интервал перекрытия) = 1, overlap fraction (доля перекрытия) = 0,125, word threshold (пороговая длина слова (T)) = 11. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и определяются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, в которой осуществляется поиск исследуемой последовательности; однако значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

Дополнительным полезным алгоритмом является gapped BLAST, как сообщают Altschul et al., 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402. Алгоритм Gapped BLAST использует очки замещения BLOSUM-62; параметр threshold T (пороговая длина слова) установлен на 9; two-hit method to trigger ungapped extensions (двухударный способ запуска продолжения без делеции) изменяет значение gap lengths (продолжение делеции) k с cost (ценой)  $10+k$ ; Xu установлен на 16, а Xg установлен на 40 для этапа поиска в базе данных и до 67 для выходного каскада алгоритмов. Содержащие разрывы выравнивания запускаются посредством оценки, соответствующей примерно 22 битам.

Как правило, гомология, сходство или идентичность аминокислот среди отдельных CDR вариантов составляет по меньшей мере 60% для последовательностей, представленных в данном документе, и, более типично, с предпочтительными возрастающими гомологиями или идентичностями по меньшей мере 65 или 70%, более предпочтительно по меньшей мере 75 или 80%, еще более предпочтительно по меньшей мере 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и почти 100%. Аналогичным образом, "выраженная в процентах идентичность последовательности нуклеиновой кислоты" (%) в отношении последовательности нуклеиновой кислоты связывающихся белков, определенных в данном документе, определяется как процентное содержание в последовательности-кандидате нуклеотидных остатков, которые идентичны нуклеотидным остаткам в кодирующей последовательности биспецифической конструкции. В конкретном методе используется модуль BLASTN программы WU-BLAST-2, заданный по умолчанию, с интервалом перекрытия и долей перекрытия, установленным на 1 и 0,125 соответственно.

Как правило, гомология, сходство или идентичность последовательности нуклеиновой кислоты между нуклеотидными последовательностями, кодирующими отдельные CDR вариантов, и приведенными в данном документе нуклеотидными последовательностями составляют по меньшей мере 60% и, более типично, с предпочтительно возрастающими гомологиями или идентичностями по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99 и почти 100%. Таким образом, "CDR варианта" представляет собой CDR с указанной гомологией, сходством или идентичностью с родительским CDR по изобретению и разделяет биологическую функцию, включая, но не ограничиваясь ими, по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% специфичности и/или активности родительского CDR.

В одном варианте осуществления биспецифическую конструкцию для применения в соответствии с настоящим изобретением вводят в комбинации с одним или несколькими эпигенетическими факторами, выбранными из группы, включающей ингибиторы гистоновой деацетилазы (HDAC), ингибиторы ДНК метилтрансферазы (DNMT) I, гидроксимочевину, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), ингибиторы гистоновой деметилазы и ATRA (полностью транс-ретиноевую кислоту) и при этом:

- (a) один или несколько эпигенетических факторов вводят до введения биспецифической конструкции;
- (b) один или несколько эпигенетических факторов вводят после введения биспецифической конструкции или
- (c) один или несколько эпигенетических факторов и биспецифическая конструкция вводятся одновременно.

Термин "эпигенетический фактор" в связи с настоящим изобретением определяет соединение, которое способно при введении изменять экспрессию гена или клеточный фенотип популяции клеток. Понятно, что такое изменение относится к одной или нескольким функционально значимым модификациям генома без изменения последовательности нуклеиновой кислоты. Примерами таких модификаций являются метилирование ДНК и модификация гистонов, которые важны для регуляции экспрессии генов без изменения исходной последовательности ДНК.

В международной заявке на патент РСТ/EP2014/069575 приведены подробности для лечения миелоидного лейкоза, включающего введение биспецифической конструкции в сочетании с одним или несколькими описанными выше эпигенетическими факторами.

В одном варианте осуществления изобретения предпочтительно, чтобы один или несколько эпигенетических факторов вводились в пределах семи дней до введения биспецифической конструкции.

Также в одном варианте осуществления изобретения предпочтительно, чтобы эпигенетическим фактором являлась гидроксимочевина.

Для настоящего изобретения предпочтительно, чтобы миелоидный лейкоз был выбран из группы, включающей острый миелобластный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, лейкоз миелоидной дендритной клетки, хронический миелолейкозный лейкоз с ускоренной фазой, острый миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, острый базофильный лейкоз, острый эозинофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, эссенциальный тромбоцитоз, острый эритроидный лейкоз, истинная полицитемия, миелодиспластический синдром, острый панмиелоидный лейкоз, миелоидная саркома и острый бифенотипический лейкоз. Более предпочтительно миелоидный лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ). Определение ОМЛ включает, помимо прочего, острый миелобластный лейкоз, острый миелоидный дендритный клеточный лейкоз, острый миеломоноцитарный лейкоз, острый базофильный лейкоз, острый эозинофильный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, острый эритроидный лейкоз и острый панмиелоидный лейкоз.

Биспецифическая конструкция, описанная в связи с настоящим изобретением, может быть приготовлена для соответствующего введения индивиду, нуждающегося в этом, в форме фармацевтической композиции.

Препараты, описанные в данном документе, пригодны в качестве фармацевтических композиций для лечения, снижения интенсивности и/или профилактики патологического заболевания в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе у пациента, нуждающегося в этом. Термин "лечение" относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам. Лечение включает применение или введение препарата в организм, изолированную ткань или клетку пациента, у которого есть заболевание/расстройство, симптом заболевания/расстройства или предрасположенность к заболеванию/расстройству, с целью вылечить, лечить, смягчить, облегчать, изменять, устранять, улучшать, устранять или влиять на болезнь, симптом заболевания или предрасположенность к болезни.

Термин "болезнь" или "заболевание" относится к любому состоянию, на которое может положительно повлиять лечение биспецифической конструкцией или описанной в данном документе фармацевтической композицией. Он включает хронические и острые расстройства или заболевания, включая те патологические состояния, которые предрасполагают млекопитающее к рассматриваемому заболеванию.

Термины "субъект, нуждающийся в этом" или "нуждающийся в лечении" включают тех субъектов, у которых уже имеется расстройство, а также тех, у которых это расстройство следует предотвратить. Субъект, нуждающийся в этом, или "пациент", включает людей и других субъектов-млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Биспецифическая конструкция по изобретению, как правило, предназначена для конкретных путей и способов введения, для конкретных дозировок и частот введения, для конкретного лечения конкретных заболеваний, с диапазонами биологической доступности и стойкости, кроме всего прочего. Материалы композиции предпочтительно составлены в концентрациях, приемлемых для места введения.

Таким образом, составы и композиции могут быть разработаны в соответствии с изобретением для доставки любым подходящим способом введения. В контексте настоящего изобретения пути введения включают, но не ограничиваются ими, местные пути введения (такие как накожный, ингаляционный, назальный, офтальмологический, аурикулярный/внутриушной, вагинальный, путем нанесения на слизистую); энтеральные пути введения (такие как пероральный, желудочно-кишечный, подязычный, субlingвальный, буккальный, ректальный); а также парентеральные пути введения (такие как внутривенный, внутриартериальный, внутрикостный, внутримышечный, внутримозговой, интрацеребровентрикулярный, эпидуральный, интратекальный, подкожный, внутрибрюшинный, экстраамниотический, внутрисуставной, внутрисердечный, внутрикожный, внутриочаговый, внутриматочный, внутрипузырный, интравитреальный, чрескожный, интраназальный, чресслизистый, внутрисуставной, внутрисосудный).

Фармацевтические композиции и биспецифическая конструкция, описанные в связи с изобретением, особенно полезны для парентерального введения, например подкожной или внутривенной доставки, например, путем инъекции, такой как болюсная инъекция, или путем инфузии, такой как непрерывная инфузия.

Фармацевтические композиции можно вводить с использованием медицинского устройства. Примеры медицинских устройств для введения фармацевтических композиций описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447 233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

В частности, настоящее изобретение предусматривает непрерывное введение подходящей компози-

ции. В качестве неограничивающего примера непрерывное или практически непрерывное, т.е. продолжительное, введение может быть реализовано с помощью небольшой насосной системы, носимой пациентом для измерения притока терапевтического агента в тело пациента. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическую конструкцию, описанную в связи с изобретением, может быть введена с использованием упомянутых насосных систем.

Такие насосные системы обычно известны в данной области и часто требуют периодической замены картриджей, содержащих вводимый терапевтический агент. При замене картриджа в такой насосной системе может произойти временное прерывание потока терапевтического агента в организм пациента, который в ином случае оставался бы непрерывным. В таком случае фаза введения перед заменой картриджа и фаза введения после замены картриджа все еще будут рассматриваться в концепте фармацевтических средств и способов согласно изобретению как составляющие единого "непрерывного введения" такого терапевтического агента.

Продолжительное или непрерывное введение биспецифической конструкции, описанной в связи с изобретением, может быть выполнено внутривенно или подкожно посредством устройства для доставки жидкости или небольшой насосной системы, включающей в себя механизм подачи жидкости для выведения жидкости из резервуара и исполнительный механизм для приведения в действие механизма подачи. Системы насосов для подкожного введения могут включать иглу или канюлю для проникновения через кожу пациента и доставки подходящей композиции в тело пациента. Указанные насосные системы могут быть непосредственно закреплены или прикреплены к коже пациента независимо от вены, артерии или кровеносного сосуда, тем самым обеспечивая прямой контакт между насосной системой и кожей пациента. Система насоса может быть прикреплена к коже пациента в течение от 24 ч до нескольких дней. Насосная система может быть небольшого размера с резервуаром для небольших объемов. В качестве неограничивающего примера объем резервуара для подходящей фармацевтической композиции, подлежащей введению, может составлять от 0,1 до 50 мл.

Непрерывное введение также может быть чрескожным посредством использования пластыря, носимого на коже и периодически заменяемого. Специалист в данной области знаком с пластырными системами для доставки лекарств, подходящими для данной цели. Следует отметить, что чрескожное введение особенно способствует непрерывному введению, так как замена первого израсходованного пластыря может быть успешно осуществлена одновременно с размещением нового второго пластыря, например, на поверхности кожи, непосредственно примыкающей к первому израсходованному пластырю и непосредственно перед удалением первого израсходованного пластыря. Не возникает проблем с прерыванием потока или отказом элемента питания.

Если фармацевтическая композиция лиофилизована, лиофилизованный материал сначала восстанавливают в соответствующей жидкости перед введением. Лиофилизованный материал может быть восстановлен, например, в бактериостатической воде для инъекций (BWF1), физиологическом солевом растворе, забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) или в той же композиции, в которой белок находится перед лиофилизацией.

Композиции по настоящему изобретению могут вводиться индивиду в подходящей дозе, которая может быть определена, например, путем исследования с повышением дозы путем введения повышающихся доз биспецифической конструкции, описанной в связи с изобретением, проявляющей межвидовую специфичность, описанную в данном документе, для приматов, не являющихся шимпанзе, например, макака. Как указано выше, биспецифическая конструкция, описанная в связи с изобретением, демонстрирующая межвидовую специфичность, описанная в данном документе, может быть преимущественно использована в идентичной форме при доклиническом тестировании у приматов, не являющихся шимпанзе, и в качестве лекарственного средства у людей. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и клиническими факторами. Как известно в медицине, дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное вводимое соединение, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие вводимые одновременно препараты.

Термин "эффективная доза" или "эффективная дозировка" определяется как количество, достаточное для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта. Термин "терапевтически эффективная доза" определяется как количество, достаточное для лечения или по меньшей мере частичной остановки развития заболевания и его осложнений у пациента, уже страдающего от этого заболевания. Количества или дозы, эффективные для такого использования, будут зависеть от состояния, подлежащего лечению (назначения), введенной биспецифической конструкции, терапевтического контекста и целей, тяжести заболевания, предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на терапевтический агент, пути введения, размеров (масса тела, площадь тела или размер органа) и/или состояния (возраст и общее состояние здоровья) пациента, а также от общего состояния собственной иммунной системы пациента. Надлежащая доза может быть скорректирована в соответствии с суждением лечащего врача таким образом, что ее можно вводить пациенту один раз или в ходе нескольких введений для достижения оптимального терапевтического эффекта.

Типичная доза может составлять от примерно 0,1 мкг/кг до примерно 30 мг/кг или более в зависимости от факторов, упомянутых выше. В конкретных вариантах осуществления дозировка может состав-

лять от 1,0 мкг/кг до примерно 20 мг/кг, необязательно от 10 мкг/кг до примерно 10 мг/кг или от 100 мкг/кг до примерно 5 мг/кг.

Терапевтическое эффективное количество биспецифической конструкции, описанной в связи с изобретением, предпочтительно приводит к уменьшению тяжести симптомов заболевания, увеличению частоты или продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращению нарушений или инвалидности из-за болезни. Для лечения опухолей, экспрессирующих антиген клеток-мишеней, терапевтически эффективное количество биспецифической конструкции, описанной в связи с изобретением, например, конструкции на основе антигена к клеткам-мишеням/антигена к CD3, предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на 20%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% относительно необработанных пациентов. Способность соединения ингибировать рост опухоли можно оценить на животной модели и на основе этого спрогнозировать эффективность в опухолях человека.

Фармацевтическая композиция может быть введена в виде единственного терапевтического средства или в сочетании с дополнительными терапиями, такими как противораковые терапии по мере необходимости, например, с другими белковыми и небелковыми препаратами. Такие лекарственные средства можно вводить одновременно с композицией, содержащей биспецифическую конструкцию, описанную в связи с изобретением, как определено в данном документе, или отдельно до или после введения указанной биспецифической конструкции с учетом своевременных определенных интервалов и доз.

Кроме того, авторы настоящего изобретения отметили, что редкие побочные эффекты, такие как иммунологические побочные эффекты, могут быть предотвращены или облегчены с помощью предварительной и/или одновременной терапии глюкокортикоидами.

Соответственно, настоящее изобретение устанавливает, что глюкокортикоиды, такие как дексаметазон, смягчают или даже предотвращают неблагоприятные эффекты, которые могут возникнуть в ходе лечения специфическими биспецифическими конструкциями CD33/CD3 в соответствии с настоящим изобретением.

Глюкокортикоиды (ГК) все еще являются наиболее широко используемыми иммунодепрессантами для лечения воспалительных заболеваний и аутоиммунных заболеваний. Глюкокортикоиды представляют собой класс стероидных гормонов, которые связываются с глюкокортикоидным рецептором (ГР), присутствующим почти в каждой клетке позвоночных, включая людей. Данные соединения являются мощными противовоспалительными средствами, независимо от причины воспаления. Глюкокортикоиды подавляют, в частности, клеточно-опосредованный иммунитет путем ингибирования генов, кодирующих цитокины IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 и IFN- $\gamma$ .

Кортизон, который относится к группе ГК, является важным терапевтическим препаратом, который используется для борьбы со многими недугами, начиная от болезни Аддисона и заканчивая ревматоидным артритом. С тех пор как были обнаружены его противоревматические свойства, которые привели к его признанию как чудодейственного препарата, было получено много производных кортизона с улучшенными свойствами, предназначенных для усиленного действия на определенные заболевания. Кортизон относится к группе стероидов, известных как кортикостероиды. Такие стероиды вырабатываются корой надпочечников, которая является наружной частью надпочечников, желез, расположенных около почек. Кортикостероиды подразделяются на две основные группы: глюкокортикоиды, которые контролируют обмен жиров, белков, кальция и углеводов, и также минералокортикоиды, контролирующие уровни натрия и калия. Кортизон относится к первой группе, т.е. к глюкокортикоидам. Кортизон и его многочисленные производные используются при различных заболеваниях. Кортизон также позволил воплотить в реальность трансплантацию органов благодаря своей способности минимизировать защитную реакцию организма в отношении чужеродных белков, присутствующих в имплантированном органе. Данная защитная реакция приводила к нарушению функциональности имплантированного органа. При этом, несмотря на клиническое применение в течение более чем 50 лет, специфические противовоспалительные эффекты ГК на разных клеточных отделениях иммунной системы пока не ясны. ГК влияют почти на каждую клетку иммунной системы, и все больше данных указывает на механизмы, специфичные для клеточного типа.

В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к глюкокортикоиду для использования для снижения интенсивности, лечения или профилактики побочных эффектов, вызванных биспецифической конструкцией CD33/CD3. Как указано выше, подобные нежелательные побочные эффекты могут быть предотвращены ступенчатым дозированием в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе. Однако в качестве предосторожности могут быть предоставлены глюкокортикоиды для использования для снижения интенсивности, лечения или профилактики (иммунологических) побочных эффектов у пациента, при котором упомянутый пациент подвергается лечению биспецифической конструкцией на основе антитела CD33/CD3. Соответственно, в одном дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к глюкокортикоиду для использования в способе снижения интенсивности, лечения или профилактики иммунологических побочных эффектов, вызванных биспецифической конструкцией на основе антитела CD33/CD3 в соответствии с настоящим

изобретением.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу снижения интенсивности, лечения или профилактики иммунологических побочных эффектов, вызванных биспецифической конструкцией на основе антитела CD33/CD3, причем указанный способ включает введение глюкокортикоидов пациенту, нуждающемуся в этом. ГК предпочтительно вводят в количестве, достаточном для снижения интенсивности, лечения или профилактики указанных иммунологических побочных эффектов, вызванных биспецифической конструкцией на основе антитела CD33/CD3.

Термин "глюкокортикоид" означает соединения, которые связываются, предпочтительно, специфически связываются с глюкокортикоидным рецептором. Указанный термин включает соединения, выбранные из группы, состоящей из кортизона, кортизола (гидрокортизона), клопреднола, преднизона, преднизолона, метилпреднизолона, дефлазакорта, флуоокртолона, триамцинолона, дексаметазона, бета-метазона, кортивазола, параметазона и/или флутиказона, включая их фармацевтически приемлемые производные. В контексте вариантов осуществления настоящего изобретения указанные соединения могут использоваться отдельно или в комбинации. Предпочтительным является дексаметазон. Настоящее изобретение, однако, не ограничивается вышеупомянутыми конкретными ГК. Предполагается, что все вещества, которые уже являются или будут классифицированы как "глюкокортикоиды", также могут быть использованы в контексте настоящего изобретения. Такие будущие глюкокортикоиды включают соединения, которые специфически связываются с глюкокортикоидным рецептором и активируют его. Термин "специфически связывается с рецептором ГК" означает в соответствии с настоящим изобретением, что ГК (или соединение, которое, как предполагается, действует как ГК) связывается (например, взаимодействует) с ГК-рецептором (также известным как NR3C1) до статистически значимой степени по сравнению со связыванием с белками/рецепторами в целом (т. е., неспецифическим связыванием). При связывании ГК-рецептора с глюкокортикоидами основным механизмом действия является регуляция транскрипции гена. В отсутствие ГК, глюкокортикоидный рецептор (ГР) находится в цитозоле в комплексе, образованном множеством белков, включая белок теплового шока 90 (hsp90), белок теплового шока 70 (hsp70) и белок FKBP52 (FK506-связывающий белок 52). Связывание ГК с глюкокортикоидным рецептором (ГР) приводит к высвобождению белков теплового шока. Таким образом, предполагается, что будущий ГК или фармацевтически приемлемое производное или соль ГК предпочтительно могут связываться с ГК-рецептором и высвобождать вышеупомянутые белки теплового шока. Активированный комплекс ГР повышающе регулирует экспрессию противовоспалительных белков в ядре или подавляет экспрессию провоспалительных белков в цитозоле (предотвращая перенос других транскрипционных факторов из цитозоля в ядро).

В предпочтительном варианте осуществления указанный ГК выбран из наиболее часто клинически используемых и подходящих ГК, таких как дексаметазон, флутиказонпропионат, преднизолон, метилпреднизолон, бетаметазон, триамцинолонацетонид или их комбинации.

В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный ГК представляет собой дексаметазон.

Дексаметазон обладает самой высокой глюкокортикоидной активностью среди наиболее часто используемых стероидов, а также имеет самый длинный период полувыведения (см. таблицу ниже). Однако специалист в данной области может выбрать один из других известных глюкокортикоидов, некоторые из которых раскрыты в данном документе, и выбрать подходящую эффективную дозу для снижения интенсивности или предотвращения иммунологических побочных эффектов, которые могут возникнуть в результате лечения пациента, нуждающегося в этом.

Агент	Прибл. эквив. доза (мг)	Относительная противовоспалительная (глюкокортикоид) активность	Относительная минералкортикоидная (удержание Na <sup>+</sup> ) активность	Период биологического полувыведения (часы)
Кортизон	25	0,8	0,8	8-12
Гидрокортизон	20	1	1	8-12
Преднизон	5	4	0,8	18-36
Преднизолон	5	4	0,8	18-36
Метилпреднизолон	5	5	0,5	18-36
Дексаметазон	0,75	25	0	36-54

Дексаметазон также обладает положительным эффектом при злокачественной болезни центральной нервной системы (например, лимфомы ЦНС или метастазирования в мозг), возможно, из-за специфического проникновения в ЦНС. Также он предпочтительно (по сравнению с другими стероидами) используется для лечения отека мозга. Хотя кортикостероиды уменьшают проницаемость капилляров в самой опухоли, на животных моделях было установлено, что дексаметазон может действовать по-другому и уменьшать отек посредством воздействия на объемный поток от опухоли (Molnar, Lapin, & Goothuis, 1995 г., Neurooncol. 1995; 25(1):19-28.

Для клинических испытаний в связи с применением биспецифической конструкции на основе антитела CD33/CD3 авторам настоящего изобретения необходимо разработать режим лечения, который был бы эффективным и хорошо переносился большинством пациентов. С этой целью авторы настоящего изобретения применяли поэтапное применение биспецифической конструкции на основе антитела CD33/CD3, в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе. Таким образом, может быть уменьшено количество побочных эффектов, снижена их интенсивности и даже такие побочные эффекты могут быть предотвращены. Соответствующая дозировка может быть выбрана клиницистом на основании эффективности, переносимости и безопасности с минимальными побочными эффектами у пациента.

Доза ГК, которая должна использоваться в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, не ограничена, т.е. она будет зависеть от ситуации отдельного пациента. ГК можно вводить внутривенно или перорально. Предпочтительные дозы ГК включают, однако, от 1 до 6 мг (эквивалент дексаметазона) на нижнем пределе дозирования до 40 мг (эквивалент дексаметазона).

Указанную дозу можно вводить всю сразу или подразделять на более мелкие дозы. Предпочтительно, вводимая норма препарата разделяется на несколько доз, при этом одна доза ГК вводится до вливания первой и/или второй дозы в соответствии со ступенчатым дозированием в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе, и другая доза ГК вводится до введения второй или третьей дозу в соответствии со ступенчатым дозированием в соответствии с описанием, предоставленным в данном документе. Следовательно, ГК предпочтительно дозируется два раза в течение цикла лечения. Еще более предпочтительно ГК вводят за 24, или 8, или 4, или 1 ч до начала цикла лечения или в начале введения следующей более высокой дозы в течение указанного цикла лечения. В этом отношении наиболее предпочтительным является 1 ч. Доза составляет от 1 до 40 мг каждая, предпочтительно от 5 до 20 мг, наиболее предпочтительно по 8 мг каждая. Сокращение "д." обозначает один день. Дополнительные схемы дозировки выводятся из прилагаемых примеров. Все дозы, приведенные в данном параграфе, относятся к эквивалентам дексаметазона.

Используемый в данном документе термин "эффективная и нетоксичная доза" относится к допустимой дозе биспецифической конструкции, которая достаточно высока, чтобы вызвать истощение популяции патологических клеток, устранение опухоли, уменьшение опухоли или стабилизацию заболевания без или по существу без значительных токсических эффектов. Такие эффективные и нетоксичные дозы могут быть определены, например, исследованиями с повышением дозы, описанными в данной области, и должны быть ниже дозы, вызывающей серьезные неблагоприятные побочные явления (ограничивающая дозу токсичность, DLT).

Используемый в данном документе термин "токсичность" относится к токсическому воздействию препарата, проявляющемуся в виде неблагоприятных событий или тяжелых неблагоприятных явлений. Такие побочные явления могут относиться к отсутствию переносимости препарата в целом и/или к отсутствию местной переносимости после введения. Токсичность также может включать тератогенные или канцерогенные эффекты, вызванные препаратом.

Термины "безопасность", "безопасность in vivo" или "переносимость", используемые в данном документе, определяют введение лекарственного средства, не вызывающее серьезных побочных эффектов непосредственно после введения (местная переносимость) и в течение более длительного периода применения препарата. "Безопасность", "безопасность in vivo" или "переносимость" могут оцениваться, например, через регулярные промежутки времени в течение периода лечения и наблюдения. Измерения включают в себя клиническую оценку, например органные проявления, и скрининг для выявления отклонения лабораторных показателей от нормы. Может быть выполнена клиническая оценка, и отклонения от нормальных результатов могут быть записаны/закодированы в соответствии со стандартами NCI-CTC и/или MedDRA. Органные проявления могут включать такие критерии, как аллергия/иммунология, кровь/костный мозг, сердечная аритмия, коагуляция и т.п., как указано, например, в общих терминологических критериях неблагоприятных событий v3.0 (CTCAE). Лабораторные параметры, которые могут быть протестированы, включают, например, гематологию, клиническую химию, профиль коагуляции, анализ мочи и исследование других жидкостей организма, таких как сыворотка, плазма, лимфоидная или спинная жидкость, ликвор и т.п. Таким образом, безопасность может быть оценена, например, физикальным осмотром, методами визуализации (т.е. посредством ультразвуковой диагностики, рентгенографии, компьютерной томографии, магнитно-резонансной томографии (МРТ)), а также с использованием других измерений, выполненных с помощью технических устройств (например, электрокардиография), посредством оценки основных показателей жизнедеятельности, путем измерения лабораторных показателей и регистрации неблагоприятных событий. Например, неблагоприятные события у приматов, не являющихся шимпанзе, в применениях и способах согласно изобретению, могут быть исследованы гистопатологическими и/или гистохимическими методами.

Вышеупомянутые термины также упоминаются, например, в Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived Pharmaceuticals S6; ICH Harmonised Tripartite Guideline; ICH Steering Committee meeting от 16 июля 1997 г.

Изобретение также относится к способу лечения миелоидного лейкоза, включающему введение те-

рапевтически эффективного количества биспецифической конструкции, содержащей первый связывающий домен, специфически связывающийся с CD33, и второй связывающий домен, специфически связывающийся с CD3, индивиду, нуждающимся в этом, способ включает стадию введения указанному индивиду конструкции в течение максимального периода в 14 дней с последующей стадией без введения конструкции в течение по меньшей мере 14 дней.

Для способа по изобретению предпочтительно, чтобы биспецифическую конструкцию вводили в соответствии со схемой, включающей следующие последовательности:

(a) введение первой дозы биспецифической конструкции с последующим

(b) введением второй дозы биспецифической конструкции, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу, необязательно с последующим

(c) введением третьей дозы биспецифической конструкции, причем указанная необязательная третья доза превышает указанную вторую дозу.

В предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению период введения первой дозы составляет до семи дней.

Также в предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению полный период введения последовательности дозы после первой дозы находится в диапазоне от 8 до 13 дней.

В соответствии с одним вариантом осуществления способа по изобретению полный период введения последовательности дозы после первой дозы находится в диапазоне от 8 до 13 дней.

Для предпочтительного варианта осуществления способа по изобретению предполагается, что период введения второй дозы составляет от 4 до 7 дней и период введения третьей дозы составляет от 4 до 7 дней.

Способ по изобретению может предпочтительно включать два или более циклов лечения, каждый из которых включает максимальный период 14 дней введения биспецифической конструкции, за которым следует период по меньшей мере 14 дней без введения биспецифической конструкции.

В предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению только первый цикл лечения включает введение в соответствии с последовательностью (a), тогда как следующие циклы начинаются с дозы в соответствии с последовательностью (b).

Для способа по изобретению предпочтительно, чтобы первый связывающий домен биспецифической конструкции содержал группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-12 и 14-16, 22-24 и 26-28, 34-36 и 38-40, 46-48 и 50-52, 58-60 и 62-64, 70-72 и 74-76, 82-84 и 86-88, 94-96 и 98-100.

Также в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления способа по изобретению второй связывающий домен биспецифической конструкции содержит группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-14, 27-32, 45-50, 63-68, 81-86, 99-104, 117-122, 135-140, 153-158 и 171-176 в соответствии с заявкой на патент WO 2008/119567.

В предпочтительном варианте осуществления способа по изобретению биспецифическая конструкция представляет собой биспецифическую конструкцию на основе антигена.

Более того, для способа по изобретению предпочтительно, чтобы биспецифическая конструкция на основе антигена была одноцепочечной конструкцией, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 30, 31, 32, 42, 43, 44, 54, 55, 56, 66, 67, 68, 78, 79, 80, 90, 91, 92, 102, 103, 104, 105, 106, 107 и 108.

В одном варианте осуществления способа по изобретению биспецифическую конструкцию вводят в комбинации с одним или несколькими эпигенетическими факторами, выбранными из группы, включающей ингибиторы гистоновой деацетилазы (HDAC), ингибиторы ДНК-метилтрансферазы (DNMT) I, гидроксимочевину, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), ингибиторы гистоновой деметилазы и ATRA (полностью транс-ретиноевую кислоту) и при этом:

(a) один или несколько эпигенетических факторов вводят до введения биспецифической конструкции;

(b) один или несколько эпигенетических факторов вводят после введения биспецифической конструкции или

(c) один или несколько эпигенетических факторов и биспецифическая конструкция вводятся одновременно.

Для способа по изобретению предпочтительно, чтобы один или несколько эпигенетических факторов вводились в пределах 7 дней до введения биспецифической конструкции.

Для одного варианта осуществления способа по изобретению предпочтительно, чтобы эпигенетический фактор представлял собой гидроксимочевину

Как описано выше, в соответствии с настоящим изобретением миелоидный лейкоз выбран из группы, включающей острый миелобластный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, лейкоз миелоидной дендритной клетки, хронический миелолейкозный лейкоз с ускоренной фазой, острый миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, острый базофильный лейкоз, острый эозинофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, эссенциальный тромбоцитоз, острый эритроидный лейкоз, истинная

полицитемия, миелодиспластический синдром, острый панмиелоидный лейкоз, миелоидная саркома и острый бифенотипический лейкоз. Предполагается, что миелоидный лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

Также в одном варианте осуществления изобретение обеспечивает применения биспецифической конструкции, содержащей первый связывающий домен, специфически связывающийся с CD33, и второй связывающий домен, специфически связывающийся с CD3, для получения фармацевтической композиции для лечения миелоидного лейкоза, при котором конструкцию вводят в течение максимального периода в 14 дней с последующим периодом по меньшей мере 14 дней без введения конструкции.

Для применения изобретения предпочтительно, чтобы биспецифическую конструкцию вводили в соответствии со схемой, включающей следующие последовательности:

- (a) введение первой дозы биспецифической конструкции с последующим
- (b) введением второй дозы биспецифической конструкции, причем указанная вторая доза превышает указанную первую дозу, необязательно с последующим
- (c) введением третьей дозы биспецифической конструкции, причем указанная необязательная третья доза превышает указанную вторую дозу.

В предпочтительном варианте применения изобретения период введения первой дозы составляет до 7 дней.

Также в предпочтительном варианте применения изобретения полный период введения последовательности дозы после первой дозы находится в диапазоне от 8 до 13 дней.

В соответствии с одним вариантом применения изобретения полный период введения последовательности дозы после первой дозы находится в диапазоне от 8 до 13 дней.

Для предпочтительного варианта осуществления способа по изобретению предполагается, что период введения второй дозы составляет от 4 до 7 дней и период введения третьей дозы составляет от 4 до 7 дней.

В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения лечение миелоидного лейкоза включает два или более цикла лечения, каждый из которых включает максимальный период 14 дней введения биспецифической конструкции с последующим периодом по меньшей мере 14 дней без введения биспецифической конструкции.

В предпочтительном варианте применения изобретения только первый цикл лечения включает введение в соответствии с последовательностью (a), тогда как следующие циклы начинаются с дозы в соответствии с последовательностью (b).

Для применения изобретения предпочтительно, чтобы первый связывающий домен биспецифической конструкции содержал группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10-12 и 14-16, 22-24 и 26-28, 34-36 и 38-40, 46-48 и 50-52, 58-60 и 62-64, 70-72 и 74-76, 82-84 и 86-88, 94-96 и 98-100.

Также в соответствии с предпочтительным вариантом применения изобретения второй связывающий домен биспецифической конструкции содержит группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-14, 27-32, 45-50, 63-68, 81-86, 99-104, 117-122, 135-140, 153-158 и 171-176 в соответствии с заявкой на патент WO 2008/119567.

В предпочтительном варианте использования изобретения биспецифическая конструкция представляет собой биспецифическую конструкцию на основе антитела.

Более того, для применения по изобретению предпочтительно, чтобы биспецифическая конструкция на основе антитела была одноцепочечной конструкцией, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 30, 31, 32, 42, 43, 44, 54, 55, 56, 66, 67, 68, 78, 79, 80, 90, 91, 92, 102, 103, 104, 105, 106, 107 и 108.

В одном варианте применения изобретения биспецифическую конструкцию вводят в комбинации с одним или несколькими эпигенетическими факторами, выбранными из группы, включающей ингибиторы гистоновой деацетилазы (HDAC), ингибиторы ДНК-метилтрансферазы (DNMT) I, гидроксимочевину, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), ингибиторы гистоновой деметилазы и ATRA (полностью транс-ретиноевую кислоту) и при этом:

- (a) один или несколько эпигенетических факторов вводят до введения биспецифической конструкции;
- (b) один или несколько эпигенетических факторов вводят после введения биспецифической конструкции или
- (c) один или несколько эпигенетических факторов и биспецифическая конструкция вводятся одновременно.

Для применения изобретения предпочтительно, чтобы один или несколько эпигенетических факторов вводились в пределах 7 дней до введения биспецифической конструкции.

Для одного варианта применения изобретения предпочтительно, чтобы эпигенетическим фактором представлял собой гидроксимочевину.

Как описано выше, в соответствии с настоящим изобретением миелоидный лейкоз выбран из группы, включающей острый миелобластный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, лейкоз миелоид-

ной дендритной клетки, хронический миелолейкозный лейкоз с ускоренной фазой, острый миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, острый базофильный лейкоз, острый эозинофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, эссенциальный тромбоцитоз, острый эритроидный лейкоз, истинная полицитемия, миелодиспластический синдром, острый панмиелоидный лейкоз, миелоидная саркома и острый бифенотипический лейкоз. Предполагается, что миелоидный лейкоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

#### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. На фигуре показаны типы гемопоэтических клеток и их происхождение (типы клеток-предшественников).

Источник: Википедия.

Фиг. 2. Человеческие клетки CD33<sup>+</sup> EOL-1 или негативные CD33<sup>-</sup> клетки Kato III были культивированы совместно с мононуклеарными клетками периферической крови человека (PBMC) при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням (E:T) 5:1 и в присутствии AMG 330 в течение 48 ч. Лизис клеток контролировали определением поглощения PI способом проточной цитометрии (A). Активацию Т-клеток анализировали путем определения поверхностной экспрессии CD69 (B). Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех измерений. Шкала ошибок представляет собой стандартную ошибку среднего значения.

Фиг. 3. Клетки HEK293-huCD33, HEK293-cyCD33 или HEK293 культивировали совместно с PBMC яванского макака (соотношение клеток E:T 5:1) при увеличении концентрации AMG 330 в течение 48 ч. Лизис клеток контролировали определением поглощения PI способом проточной цитометрии (A). Поверхностную экспрессию CD69 на Т-клетках определяли посредством проточной цитометрии с использованием антигенспецифических моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромом (B). Каждая точка данных представляет собой среднее значение данных оценки двух (A) или трех лунок (B). Шкалы ошибок представляют стандартные ошибки среднего значения.

Следует понимать, что изобретения, приведенные в данном документе, не ограничиваются конкретной методологией, протоколами или реагентами, поскольку таковые могут различаться. Обсуждение и примеры, предоставленные в данном документе, представлены с целью описания исключительно конкретных вариантов осуществления и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения, который определен только формулой изобретения.

Все публикации и патенты, приведенные в тексте данного описания (включая все патенты, патентные заявки, научные публикации, спецификации производителя, инструкции и т. д.), независимо от того, указаны они выше или ниже в тексте, тем самым полностью включены в настоящее описание путем ссылки. Ничто в настоящем документе не следует интерпретировать в качестве признания того, что данное изобретение не предоставляет право датировать такое описание более ранним числом на основании более раннего изобретения. В той степени, в которой материал, включенный посредством ссылки, противоречит или не согласован с данным описанием, данное описание будет превалировать над любым таким материалом.

#### Примеры

Следующие примеры приведены для иллюстрации конкретных вариантов осуществления или особенностей настоящего изобретения. Эти примеры не должны толковаться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Примеры включены для целей иллюстрации, и настоящее изобретение ограничено только формулой изобретения.

Пример 1.

AMG 330-опосредованный перенаправленный лизис и активация Т-клеток.

Активность AMG 330 требует одновременного связывания как с клетками-мишенями, так и с Т-клетками. Фармакологическое действие AMG 330 опосредовано специфическим перенаправлением предварительно примированных цитотоксических CD8<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на уничтожение CD33<sup>+</sup> клеток (Laszlo et al., 2014, Blood, 123(4):554-561; Krupka et al., 2014, Blood, 123(3):356-365; Friedrich et al., 2014, Mol Cancer Ther, 13(6):1549-1557; Aigner et al., 2013, Leukemia, 27(5):1107-1115). AMG 330 представляет собой высокоактивную молекулу, показывающую полумаксимальный лизис линий клеток ОМЛ эффекторной клеткой человека *in vitro* в диапазоне от 24 до 200 пг/мл (от 0,4 до 3,7 пМ) (Friedrich et al., 2014).

Эксперименты *in vitro* и *ex vivo* показали, что AMG 330 способна также рекрутировать и активировать Т-клетки яванского макака; значения EC<sub>50</sub> перенаправленного лизиса линий опухолевых клеток CD33<sup>+</sup> были немного выше по сравнению с человеческими клетками (от 79 до 254 пг/мл [от 1,5 до 4,7 пМ]). При оценке активности эффекторных клеток максимальная наблюдаемая разница составляла 3-кратно превышающие данные человека по сравнению с яванским макаком. Данные связывания и биологической активности подтверждают использование яванского макака в качестве подходящего вида для оценки токсичности.

AMG 330 индуцирует активацию Т-клеток человека, а также яванского макака и опосредует перенаправленный лизис клеток CD33<sup>+</sup> дозозависимым образом.

Специфичность активности AMG 330 была проверена с использованием человеческих клеток CD33<sup>+</sup> EOL-1 или негативных CD33<sup>-</sup> человеческих клеток Kato III. AMG 330 селективно опосредует перенаправленный лизис клеток EOL-1 человеческими Т-клетками, в то время как жизнеспособность клеток Kato III оставалась неизменной даже при воздействии высоких концентраций AMG 330 (фиг. 2А). Кроме того, AMG 330 увеличивает поверхностную экспрессию активационного маркера CD69 на Т-клетках только в присутствии клеток CD33<sup>+</sup>, при этом не наблюдалось значительного увеличения CD69<sup>+</sup> Т-клеток в совместных культурах с негативными CD33<sup>-</sup> клетками Kato III (фиг. 2В).

AMG 330 избирательно опосредует перенаправленный лизис клеток НЕК293, стабильно экспрессирующих либо человеческие CD33 (huCD33), либо CD33 яванского макака (суCD33), посредством эффекторных клеток яванского макака, в то время как жизнеспособность целевых негативных клеток не была затронута (фиг. 3А). Активация Т-клеток яванского макака (CD69) молекулой AMG 330 характеризовалась высокой специфичностью и не наблюдалась в отсутствие CD33-экспрессирующих клеток (фиг. 3В).

Активность AMG 330 исследовали с использованием панели линий опухолевых клеток CD33<sup>+</sup> ОМЛ человека, экспрессирующих человеческий CD33. РВМС или изолированные CD3<sup>+</sup> Т-клетки здоровых доноров-людей культивировали совместно с CD33-экспрессирующими клетками-мишенями в присутствии возрастающих концентраций AMG 330. Специфический клеточный лизис определяли посредством проточной цитометрии. Опосредованный AMG 330 полумаксимальный лизис (EC<sub>50</sub>) клеточных линий ОМЛ эффекторными клетками человека *in vitro* варьировался от 24 до 200 пг/мл (от 0,4 до 3,7 пМ) (табл. 1).

Таблица 1

Значения EC<sub>x</sub> опосредованного AMG 330 перенаправленного лизиса человеческими Т-клетками

Клеточная линия	EC <sub>50</sub> [пг/мл]		EC <sub>90</sub> [пг/мл]		Амплитуда [%]		N
	Среднее	± SEM	Среднее	± SEM	Среднее	± SEM	
KG-1	23,6	± 4,1	62,8	± 10,2	66,4	± 1,9	16
HL-60	25,1	± 4,1	64,9	± 11,8	58,4	± 4,3	11
THP-1	29,3	± 6,3	150,3	± 45,4	58,5	± 5,6	4
MO1M-13	32,5	± 9,1	91,2	± 43,5	61,5	± 5,6	9
U937	34,1	± 10,9	56,5	± 10,9	71,8	± 5,1	4
KASUMI-1	60,4	± 10,3	250,4	± 43,9	55,4	± 3,9	4
SKM-1	63,4	± 31,1	163,5	± 82,0	62,5	± 9,3	5
NB-4	123,6	± 44,0	335,4	± 151,3	70,9	± 2,5	5
M-07e	174,8	± 62,7	261,2	± 71,4	77,6	± 0,4	4
EOL-1	180,7	± 44,6	1605,2	± 447,8	78,1	± 3,7	6
NOMO-1	199,2	± 36,9	813,4	± 231,5	57,6	± 2,2	5

Различия между клеточными линиями скорее всего связаны с изменением объема экспрессии CD33 на поверхности клеток. При оценке цитотоксичности AMG 330 наблюдалась количественная корреляция между экспрессией мишени и значениями EC<sub>50</sub>, повышение уровня экспрессии CD33 приводило к более низким значениям EC<sub>50</sub> (Laszlo et al., 2014, loc cit.).

Пример 2.

Фармакокинетика AMG 330.

ФК AMG 330 характеризовали после однократной болюсной внутривенной инъекции 300 мкг/кг или 900 мкг/кг, однократной подкожной болюсной инъекции 900 мкг/кг и однократной внутривенной болюсной инъекции 900 мкг/кг, введенных мышам линии BALB/c. В табл. 2 показаны параметры некомпартментного анализа ФК AMG 330 после однократной дозы при внутривенном, подкожном и внутривенном введении. Концентрации AMG 330 в сыворотке определяли количественно до 24 ч после внутривенного введения. Период полувыведения, клиренс и объем распределения были одинаковыми в обеих группах доз, что указывало на линейную фармакокинетику AMG 330. Площадь под кривой концентрации-времени от момента времени 0 до бесконечности (AUC<sub>inf</sub>) и C<sub>max</sub> увеличивались линейно в зависимости от дозы от 300 до 900 мкг/кг. После подкожного введения значение C<sub>max</sub> достигло 210,3 нг/мл через 2 ч после введения дозы, а содержание AMG 330 поддавалось количественному определению в течение до 36 ч. По сравнению с AUC<sub>inf</sub> при оценке ФК при болюсном внутривенном введении 900 мкг/кг абсолютная биодоступность при подкожном введении составляла 22%. При внутривенном введении значение C<sub>max</sub> достигло 2201 нг/мл через 2 ч после введения, а содержание AMG 330 поддавалось количественному определению в течение до 36 ч. Абсолютная биодоступность при внутривенном введении составляла 99%, исходя из сравнения с AUC<sub>inf</sub> после болюсного внутривенного введения 900 мкг/кг. Кажущийся период полувыведения был одинаковым для всех путей введения и со-

ставлял от 6,5 до 8,7 ч (табл. 2).

Таблица 2  
Средние фармакокинетические параметры после разовой дозы при внутривенном (IV), подкожном (SC) или внутрибрюшинном (IP) введении Введение мышам линии BALB/c

Доза (мкг/кг)	Путь	$t_{max}$ (ч.)	$C_{max}$ (нг/мл)	$t_{1/2}$ (ч.)	$AUC_{inf}$ (нг*ч./мл)	$Vd/F$ (мл/кг)	$CL/F$ (мл/ч./кг)	F (%)
300	IV	Н/П	5614	6,5	4468	201,7	67,2	Н/П
900	IV	Н/П	16092	7,6	15788	236,4	57,0	Н/П
900	SC	2	210,3	8,7	3536	3184,7	254,5	22
900	IP	2	2201,3	7,5	15557	621,8	57,9	99

$t_{max}$  = время максимальной концентрации;

$C_{max}$  = максимальная концентрация;

$t_{1/2}$  = период полувыведения;

$AUC_{inf}$  = площадь под кривой концентрации-времени от момента времени 0 до бесконечности;

$Vd$  = объем распределения;

$CL$  = клиренс;

$F$  = биодоступность;

Н/П = не применимо.

### Пример 3.

Прогнозируемые концентрации AMG 330 у людей.

Возможная ФК AMG 330 у человека была спрогнозирована на основе предыдущего опыта с другими находящимися в разработке молекулами ViTE®. Клинические анализы ФК блинатумомаба, AMG 211 и AMG 110 были схожими (табл. 3), причем период полувыведения варьировался от 2,1 до 4,4 ч на основе некомпартментных анализов клинических данных концентрации-времени. Ожидается, что ФК AMG 330 будет соответствовать этим данным, так как структура и молекулярная масса данных соединений сходны, и они имеют аналогичный механизм действия; все подобные молекулы ViTE® имеют одно плечо, нацеленное на CD3<sup>+</sup> Т-клетки, и другое плечо, нацеленное на CD19, SEA или EpCAM для блинатумомаба, AMG 211 и AMG 110, соответственно. Поскольку AMG 330 предназначена для введения посредством непрерывной внутривенной инфузии для лечения пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ), что является показанием при лечении опухоли жидких тканей, и ее, как и блинатумомаб, вводят посредством непрерывной внутривенной инфузии для лечения ОЛЛ, что также является показанием при лечении опухоли жидких тканей, то параметры ФК человека для AMG 330 были взяты из данных блинатумомаб. Значения  $CL$  и  $Vd$  для AMG 330 предполагались равными 2920 мл/ч и 4500 мл соответственно, согласно оценкам параметров ФК, полученным из некомпартментного анализа данных ФК, взятых из 4 исследований у пациентов с неходжкинской лимфомой (НХЛ), MRD<sup>+</sup> ОЛЛ и рецидивирующего/рефрактерного (Р/Р) ОЛЛ, которым вводился блинатумомаб посредством непрерывной внутривенной инфузии. Хотя блинатумомаб и AMG 330 нацелены на различные клеточные рецепторы (CD19 на В-клетках и CD33 на гематопоэтических клетках соответственно), предшествующий клинический опыт с другими молекулами ViTE® не указывает на наличие мишень-опосредованного распределения препарата (TMDD) в анализируемых диапазонах уровней дозирования. Таким образом, предположение о линейной ФК для AMG 330 согласуется с наблюдаемым линейным ФК других клинически протестированных молекул ViTE®.

На основе данных параметров ФК предсказанный период полувыведения AMG 330 составляет 1 ч; период полувыведения у яванских макаков после непрерывной внутривенной инфузии также был коротким и варьировался от 1,6 до 2,7 ч, хотя период полувыведения после подкожного введения был более продолжительным и составлял от 4 до 7 ч. Кроме того, параметры ФК блинатумомаба также использовались для прогнозирования ФК AMG 110, которая проходила клинические исследования для лечения метастазирующих солидных опухолей. Прогнозируемый период полувыведения AMG 110 находился в пределах примерно 2-кратного наблюдаемого периода полувыведения. Клиренс AMG 110 был примерно в 4 раза ниже ожидаемого на основе данных ФК блинатумомаба, но все еще находился в пределах диапазона клиренса, наблюдаемого у блинатумомаба в 4 клинических исследованиях, из которых были получены параметры ФК, средние значения клиренса составляли от 1,81 до 3,36 л/ч с вариабельностью в диапазоне от 32 до 103% (в соответствии с измерениями на основе коэффициента вариации).

Таблица 3

Средние клинические параметры ФК блинатумомаба, AMG 110 и AMG 211  
на основе некомпартментных анализов

Соединение	Cl (л/ч)	V <sub>z</sub> (л)	t <sub>1/2,z</sub> (ч.)	Источник данных
Блинатумомаб	2,92.	4,5	2,1	Отчеты о клинических испытаниях MT103-104, MT103-202, MT103-206 и MT103-211
AMG 110	0,65	4,0	4,4	Брошюра исследователя AMG 110
AMG 211	2,3	8,0	2,9	Брошюра исследователя AMG 211

Прогнозируемое воздействие на человека (измеренное на основе C<sub>ss</sub>) и предел воздействия после непрерывной внутривенной инфузии AMG 330 в предлагаемых дозах, впервые вводимых человеку, представлены в табл. 4. Пределы воздействия основаны на среднем значении C<sub>ss</sub> у самцов и самок яванского макака 8,36 нг/мл при HNSTD (наивысшая безопасная токсическая доза) равной 10 мкг/кг/день при непрерывной внутривенной инфузии, и корректируются на основе различий активности эффекторных клеток человека и макака. Полученные данные показали трехкратное превышение активности AMG 330 у людей по сравнению с эффекторными клетками макака.

Таблица 4

Прогнозированное воздействие на человека и пределы воздействия  
при установившемся отношении HNSTD после непрерывной  
внутривенной инфузии AMG 330

Доза AMG 330 (мкг/день)	Прогнозируемая человеческая C <sub>ss</sub> (нг/мл)	Прогнозируемые пределы воздействия <sup>a,b,c</sup> (HNSTD=10 мг/кг/день)
0,5	0,0071	391
2,5	0,036	78
10,0	0,14	20
30,0	0,43	6,7
60,0	0,86	3,3
120,0	1,7	1,6
240,0	3,4	0,8
480,0	6,8	0,4
720,0	10,3	0,3
960,0	13,7	0,2

<sup>a</sup> Средняя C<sub>ss</sub> у самцов и самок макаков при HNSTD, разделенная на прогнозируемую человеческую C<sub>ss</sub>.

<sup>b</sup> Средняя C<sub>ss</sub> составляла 8,36 нг/мл при 10 мкг/кг/день.

Скорректировано на 3-кратно превышающую активность человеческих эффекторных клеток по сравнению с клетками макака.

SEQ ID NO.	ОПРЕДЕЛЕНИЕ	ИСТОЧНИК	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	Внеклеточный домен CD3 человека:	человек	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYFGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIGSDE DHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD
2	CD3 человека: 1-27	человек	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILT
3	Внеклеточный домен CD3 <i>Callithrix jacchus</i> s	<i>Callithrix jacchus</i>	QDGNEEMGDDTQNPYKVSISGTTVTLTTPRYDGHEIKWLVNSQNEGHEDHLLLEDFE EMEQSGYYACLKSKETPAEEASHLYLYLKARVCENCVEVD
4	CD3 <i>Callithrix jacchus</i> ε1-27	<i>Callithrix jacchus</i>	QDGNEEMGDDTQNPYKVSISGTTVTLT
5	Внеклеточный домен CD3 <i>Saguinus oedipus</i> s	<i>Saguinus oedipus</i>	QDGNEEMGDDTQNPYKVSISGTTVTLTTPRYDGHEIKWLVNSQNEGHEDHLLLEDFE EMEQSGYYACLKSKETPAEEASHLYLYLKARVCENCVEVD
6	Внеклеточный домен CD3 <i>Saguinus oedipus</i> ε1-27	<i>Saguinus oedipus</i>	QDGNEEMGDDTQNPYKVSISGTTVTLT
7	Внеклеточный домен CD3 <i>Saimiri sciureus</i> s	<i>Saimiri sciureus</i>	QDGNEEIGDTTQNPYKVSISGTTVTLTTPRYDQGEIKWLVNDQNEGHEDHLLLEDFE EMEQSGYYACLKSKETPTEEASHLYLYLKARVCENCVEVD
8	CD3 <i>Saimiri sciureus</i> s 1-27	<i>Saimiri sciureus</i>	QDGNEEIGDTTQNPYKVSISGTTVTLT
9	CD33 VH из AH3	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMSDDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTTVTVSS
10	CD33 HCDR1 из AH3	искусственная	NYGMN
11	CD33 HCDR2 из AH3	искусственная	WINTYTGEPTYADDFKG
12	CD33 HCDR3 из AH3	искусственная	WSWSDGYVYFDY
13	CD33 VL из AH3	искусственная	DIVMTQSPDLSLVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSDFTLTIIDSLQPEDSATYQCQSAHFPITFGQTRLEIK
14	CD33 LCDR1 из AH3	искусственная	KSSQSVLDSKKNKNSLA
15	CD33 LCDR2 из AH3	искусственная	WASTRES
16	CD33 LCDR3 из AH3	искусственная	QSAHFPIT
17	CD33 CD33 HL из AH3	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMSDDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGGGGGSDIVMTQSPDLSLVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIIDSLQPEDSATYQCQSAHFPITFGQTRLEIK
18	CD33 AH3 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMSDDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGGGGGSDIVMTQSPDLSLVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIIDSLQPEDSATYQCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGGGGGQTVVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGQVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
19	CD33 AH3 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMSDDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGGGGGSDIVMTQSPDLSLVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIIDSLQPEDSATYQCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGGGGGQTVVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGQVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
20	CD33 AH3 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVCKASGYTFTNYGMNWRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMSDDTSTSTAYLEINSLRSDDTAIYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSG GGGGGGGSDIVMTQSPDLSLVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIIDSLQPEDSATYQCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGGGGGQTVVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG

			TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAITLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
21	CD33 VH из AF5	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYLELHNLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSS
22	CD33 HCDR1 из AF5	искусственная	NYGMN
23	CD33 HCDR2 из AF5	искусственная	WINTYTGTEPTADDFKFG
24	CD33 HCDR3 из AF5	искусственная	WSWSDGYYVYFDY
25	CD33 VL из AF5	искусственная	DIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIK
26	CD33 LCDR1 из AF5	искусственная	KSSQSVLDSKKNKNSLA
27	CD33 LCDR2 из AF5	искусственная	WASTRES
28	CD33 LCDR3 из AF5	искусственная	QSAHFPIIT
29	CD33HL из AF5	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYLELHNLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLS WASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIKSGGGGS
30	CD33 AF5 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYLELHNLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLS WASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGG GSGGGGGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAITLSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
31	CD33 AF5 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYLELHNLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLS WASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIKSGGGGS
			EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGG GSGGGGGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAITLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
32	CD33 AF5 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYLELHNLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLS WASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTITVTVSSGGG GSGGGGGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTITLTCGSSGAVTSGYYPNWWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAITLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
33	CD33 VH из AC8	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSS
34	CD33 HCDR1 из AC8	искусственная	NYGMN
35	CD33 HCDR2 из AC8	искусственная	WINTYTGTEPTADDFKFG
36	CD33 HCDR3 из AC8	искусственная	WSWSDGYYVYFDY
37	CD33 VL из AC8	искусственная	DIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIK
38	CD33 LCDR1 из AC8	искусственная	KSSQSVLDSKKNKNSLA
39	CD33 LCDR2 из AC8	искусственная	WASTRES
40	CD33 LCDR3 из AC8	искусственная	QSAHFPIIT
41	CD33 HL из AC8	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF KGRVTMTSDTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQQKPGQPKLLLS WASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIK
42	CD33 AC8 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVCKASGYTFITNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGTEPTADDF

			KGRVTMTSDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
43	CD33 AC8 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
44	CD33 AC8 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEIRNLRNDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
45	CD33 VH из AH11	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEISLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSS
46	CD33 HCDR1 из AH11	искусственная	NYGMN
47	CD33 HCDR2 из AH11	искусственная	WINTYTGEPTYADDFKG
48	HCDR3	искусственная	WSWSGYYVYFDY
49	CD33 VL из AH11	искусственная	DIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLSWASTRESGI PDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIK
50	CD33 LCDR1 из AH11	искусственная	KSSQSVLDSKKNKNSLA
51	CD33 LCDR2 из AH11	искусственная	WASTRES
52	CD33LCDR3 из AH11	искусственная	QSAHFPIIT
53	CD33 HL из AH11	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEISLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIK
54	CD33 AH11 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEISLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
55	CD33 AH11 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEISLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGSGTDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
56	CD33 AH11 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPAGESVKVSCKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADDF KGRVTMTSDTSTSTAYMEISLRSDDTAVYYCARWSWSGYYVYFDYWGQTTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDLSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS

			WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTIISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGDFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
57	CD33 VH из B3	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSS
58	CD33 HCDR1 из B3	искусственная	NYGMN
59	CD33 HCDR2 из B3	искусственная	WINTYTGENTYADKFQ
60	CD33 HCDR3 из B3	искусственная	WSWSDGYYVYFDY
61	CD33 VL из B3	искусственная	DIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQKPGQPPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLDIK
62	CD33 LCDR1 из B3	искусственная	KSSQSVLDSSTNKNLSLA
63	CD33 LCDR2 из B3	искусственная	WASTRE
64	CD33LCDR3 из B3	искусственная	QSAHFPIIT
65	CD33 HL из B3	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGGGGGGGSDIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLDIK
66	CD33 B3 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGGGGGGGSDIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLDIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTIISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGDFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
67	CD33 B3 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGGGGGGGSDIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLDIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTIISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGDFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
68	CD33 B3 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG GGGGGGGGSDIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLDIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTIISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYCVRHGDFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GGGGGGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSGSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
69	CD33 VH из F2	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSS
70	CD33 HCDR1 из F2	искусственная	NYGMN
71	CD33 HCDR2 из F2	искусственная	WINTYTGENTYADKFQ
72	CD33 HCDR3 из F2	искусственная	WSWSDGYYVYFDY
73	CD33 VL из F2	искусственная	DIVMTQSPDSMTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQKPGQPPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQTRLEIK
74	CD33 LCDR1 из F2	искусственная	KSSQSVLDSSTNKNLSLA
75	CD33 LCDR2 из F2	искусственная	WASTRES
76	CD33 LCDR3 из F2	искусственная	QSAHFPIIT
77	CD33 HL из F2	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVSKVCKASGYTFNRYGMNWKQAPGGLEWGMWINTYTGENTYADKF QGRVTFSTDTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWWSWDGYYVYFDYWGQGTITVTVSSGGGGSG

			GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDSLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIK
78	CD33 F2 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTFSTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS SGGGGSG GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDSLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYWAYWGQGTFTVVS SGGG GSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSTLTVSPGGTFTLTCGSSGTAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
79	CD33 F2 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTFSTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS SGGGGSG GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDSLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTFTVVS SGGG GSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSTLTVSPGGTFTLTCGSSGTAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
80	CD33 F2 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTFSTSTSTAYMELRNKSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS SGGGGSG GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDSLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYWAYWGQGTFTVVS SGGG GSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSTLTVSPGGTFTLTCGSSGTAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
81	CD33 VH из B10	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS S
82	CD33 HCDR1 из B10	Искусственная	NYGMN
83	CD33HCDR2 из B10	искусственная	WINTYTGGETYADKFQ
84	CD33 HCDR3 из B10	искусственная	WSWSDGYVYFDY
85	CD33 VL из B10	искусственная	DIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSDFTFTLIDGLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIK
86	CD33 LCDR1 из B10	искусственная	KSSQSVLDSSTNKNSLA
87	CD33 LCDR2 из B10	искусственная	WASTRES
88	CD33 LCDR3 из B10	искусственная	QSAHFPIT
89	CD33 HL из B10	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS SGGGGSG GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDGLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIK
90	CD33 B10 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS SGGGGSG GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDGLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYLSYWAYWGQGTFTVVS SGGG GSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSTLTVSPGGTFTLTCGSSGTAVTSGYYPNWWQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
91	CD33 B10 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPGESVKVSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWMGWINTYTGGETYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTFTVVS SGGGGSG GGGSGGGSDIVMTQSPDLSVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTFTLIDGLQPEDSATYCCQSAHFPITFGQTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNKLTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGTFTVVS SGGG GSGGGSGGGGSQTVVVTQEPSTLTVSPGGTFTLTCGSSGTAVTSGNYPNWWQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL

92	CD33 B10 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLEWMGWINTYTGPEYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDGLQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
93	CD33 VH из E11	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLEWMGWINTYTGPEYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSS
94	CD33 HCDR1 из E11	искусственная	NYGMN
95	CD33 HCDR2 из E11	искусственная	WINTYTGPEYADKFGQ
96	CD33 HCDR3 из E11	искусственная	WSWSDGYVYFDY
97	CD33 VL из E11	искусственная	DIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSWASTRESGI PDRFSGSGSDFTLTIDSPQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIK
98	CD33 LCDR1 из E11	искусственная	KSSQSVLDSSTNKNLSA
99	CD33 LCDR2 из E11	искусственная	WASTRES
100	CD33 LCDR3 из E11	искусственная	QQSAHFPIIT
101	CD33 HL из E11	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLEWMGWINTYTGPEYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSPQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIK
102	CD33 E11 HL x H2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLEWMGWINTYTGPEYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSPQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVL
103	CD33 E11 HL x F12Q HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLEWMGWINTYTGPEYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSPQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
104	CD33 E11 HL x I2C HL	искусственная	QVQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLEWMGWINTYTGPEYADKF QGRVTMTTDTSTSTAYMEIRNLRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLS WASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSPQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIKSGGGGS EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
105	CD33 UD H2C HL x AF5 HL	искусственная	EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCSSTGAVTSGYYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGGQ VQLVQSGAEVKKPFGESVKVCKASGYTFTNFGMNWVKQAPGQGLKWMGWINTYTGPEYADDFK GRVTMTSDTSTSTAYLELHNRSDDTAVYYCARWSWSDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNLSLAWYQQKPGQPPKLLLSW ASTRESGIPDRFSGSGSDFTLTIDSLQPEDSATYCCQSAHFPIITFGQGTREIK
106	CD33 UD F12Q HL x AF5 HL	искусственная	EVQLVDSGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYAD SVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWWAYWGQGLTVTVSSGGG

			GSGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSSGGGGSQ VQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADDFK GRVTMTSDTSTSTAYLELHNLRSDDTAVYCARWSWDGYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLSW ASTRESGIPDRFSGSGGTDFTLTIIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIK
107	CD33 UD I2C HL x AF5 HL	искусственная	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYIAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGG GSGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLSSGGGGSQ VQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLKWMGWINTYTGEPYADDFK GRVTMTSDTSTSTAYLELHNLRSDDTAVYCARWSWDGYVYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSKKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLSW ASTRESGIPDRFSGSGGTDFTLTIIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIK
108	CD33 E11 HL x I2C HL H6	искусственная	VQLVQSGAEVKKPGESVKVCSKASGYFTFTNYGMNWKQAPGQGLEWVWINTYTGEPYADKF QGRVTMTSDTSTSTAYMEIRNLGGDDTAVYCARWSWDGYVYFDYWGQGTSTVTVSSGGGGSG GGSGGGSDIVMTQSPDSLTVSLGERTTINCKSSQSVLDSSTNKNKNSLAWYQKPGQPPLKLLS WASTRESGIPDRFSGSGGTDFTLTIIDSLQPEDSATYYCQSAHFPIITFGQGTTRLEIKSGGGGS EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSKAASGFTFNKYAMNWRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYIAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNLLKTEDTAVYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTTLTVSSGGG GSGGGSGGGGSQTVVTQEPSSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGG TKFLAPGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLHHHHHH
109	HALB	человек	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCNKYA EAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEPKPLVVEEP
			QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHEAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKKADKETCFABEGKKL AASQAALGL
110	HALB7	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCNKYA EAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEPKPLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHEAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKKADKETCFABEGKKL AASQAALGL
111	HALB098	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCNKYA EAKDVLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEPKPLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHEAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDFAAFVEKCKKADKETCFABEGKKL AASQAALGL
112	HALB114	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD

			RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASKAALGL
113	HALB254	искусственная	DAHKSEVAHRPKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASQAALGL
114	HALB253	искусственная	DAHKSEVAHRPKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASQAALGL
115	HALB131	искусственная	DAHKSEVAHRPKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASQAALGL
			DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASQAALGL
116	HALB135	искусственная	DAHKSEVAHRPKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASKAALGL
117	HALB133	искусственная	DAHKSEVAHRPKDLGEENFKALVLI AFAQYLQCCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELDRDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVLLLRRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPKRAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEDTYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGPHLV AASKAALGL

118	HALB234	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFH DNEETF LKKLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGP KLV AASKAALGL
119	HALB C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFH DNEETF LKKLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDEITYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGGKLV AASQAALGL
120	HALB7 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFH DNEETF LKKLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDEITYVPKEFNAGTFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAAMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGGKLV AASQAALGL
121	HALB098 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFH DNEETF LKKLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDEITYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGP KLV AASQAALGL
122	HALB114 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFH DNEETF LKKLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALDVEITYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCF AE EGP HLV AASKAALGL
123	HALB254 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECF LQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFH DNEETF LKKLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSI SSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYA EAKDVLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEP

			QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPKAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALGVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFABEGPKLV AASQAALGL
124	HALB253 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLEDELREDEGKAS SAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPKAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALGVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFABEGPKLV AASQAALGL
125	HALB131 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLEDELREDEGKAS SAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPKAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALGVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFABEGPHLV AASQAALGL
126	HALB135 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLEDELREDEGKAS SAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD
			RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPKAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALGVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFABEGPHLV AASKAALGL
127	HALB133 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLEDELREDEGKAS SAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPKAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALGVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFABEGPKLV AASKAALGL
128	HALB234 C34S	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOSPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTCCQAADKAACLLPKLEDELREDEGKAS SAKQRLKASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVS KLVTDLTKVHT ECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRLAKTYETTLEKCCAAADPHCEYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPKAKRMFC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALGVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQALVELVKKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKKADDKETCFABEGPKLV AASKAALGL
129	HALB C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQOAPFEDHVKLNVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVRPEVDMCTAFH

			DNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFEFPKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFABEGGKLV AASQAALGL
130	HALB7 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFEFPKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFABEGGKLV AASQAALGL
131	HALB098 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFEFPKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFABEGGKLV AASQAALGL
132	HALB114 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFEFPKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKCKADDKETCFABEGGPLV AASKAALGL
133	HALB254 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFEFPKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQATALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEGGPLV AASQAALGL
134	HALB253 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQAPPFEDHVKLNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPFYAPPELLFFAKRYKAAFTGCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFFKAFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFLGMFLYFYARRHPDYSVVLRLRAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVDFEFPKPLVEEP QNLIKQNCLEFQELGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHAD

			ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEEGPKLV AASQAALGL
135	HALB131 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFGLMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEEGPHLV AASQAALGL
136	HALB135 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFGLMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEEGPHLV AASKAALGL
137	HALB133 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFGLMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEEGPKLV AASKAALGL
			QNLIKQNCLEFEQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEEGPKLV AASKAALGL
138	HALB234 C34A	искусственная	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYIQQAPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLOHKDDNPNLRLVREVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELFFAKRYKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDELREDEGKAS SAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADD RADLAKYICENQDSISSKLEKCEKPLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA EAKDVFGLMFLYFYARRHPDYSVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHECYAKVDFEFPKLVVEEP QNLIKQNCLEFEQYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKCKHPEAKRMPC AEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVVPKEFNAETFTFHAD ICTLSEKERQIKKQ TALVELVKHKPKATKEQLKAVMDKFAAFVEKCKCKADDKETCFABEEGPKLV AASKAALGL
139	Пептидный линкер	искусственная	GGGG
140	Пептидный линкер	искусственная	GGGGS
141	Пептидный линкер	искусственная	GGGGQ
142	Пептидный линкер	искусственная	PGGGGS
143	Пептидный линкер	искусственная	PGGDGS
144	Пептидный линкер	искусственная	SGGGGS
145	Пептидный линкер	искусственная	GGGGSGGGS
146	Пептидный линкер	искусственная	GGGGSGGGS
147	Пептидный линкер	искусственная	GGGGSGGGS
148	SEQ ID NO: 9 по WO- 2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGYYFN
149	SEQ ID NO: 10 по WO- 2008/119567	искусственная	GTKFLAP

150	SEQ ID NO: 11 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
151	SEQ ID NO: 12 по WO-2008/119567	искусственная	IYAMN
152	SEQ ID NO: 13 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKS
153	SEQ ID NO: 14 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYVSFFAY
154	SEQ ID NO: 27 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGYYPN
155	SEQ ID NO: 28 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
156	SEQ ID NO: 29 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
157	SEQ ID NO: 30 по WO-2008/119567	искусственная	KYAMN
158	SEQ ID NO: 31 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKD
159	SEQ ID NO: 32 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYISYWAY
160	SEQ ID NO: 45 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGYYPN
161	SEQ ID NO: 46 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
162	SEQ ID NO: 47 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
163	SEQ ID NO: 48 по WO-2008/119567	искусственная	SYAMN
	2008/119567		
164	SEQ ID NO: 49 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKG
165	SEQ ID NO: 50 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYLSFWAY
166	SEQ ID NO: 63 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGYYPN
167	SEQ ID NO: 64 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
168	SEQ ID NO: 65 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
169	SEQ ID NO: 66 по WO-2008/119567	искусственная	RYAMN
170	SEQ ID NO: 67 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKG
171	SEQ ID NO: 68 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYLSYFAY
172	SEQ ID NO: 81 по WO-2008/119567	искусственная	RSSTGAVTSGYYPN
173	SEQ ID NO: 82 по WO-2008/119567	искусственная	ATDMRPS
174	SEQ ID NO: 83 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
175	SEQ ID NO: 84 по WO-2008/119567	искусственная	VYAMN
176	SEQ ID NO: 85 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKK

177	SEQ ID NO: 86 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYLSWWAY
178	SEQ ID NO: 99 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGYYPN
179	SEQ ID NO: 100 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
180	SEQ ID NO: 101 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
181	SEQ ID NO: 102 по WO-2008/119567	искусственная	KYAMN
182	SEQ ID NO: 103 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKS
183	SEQ ID NO: 104 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYTSYYAY
184	SEQ ID NO: 117 по WO-2008/119567	искусственная	RSSTGAVTSGYYPN
185	SEQ ID NO: 118 по WO-2008/119567	искусственная	ATDMRPS
186	SEQ ID NO: 119 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
187	SEQ ID NO: 120 по WO-2008/119567	искусственная	GYAMN
188	SEQ ID NO: 121 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKE
189	SEQ ID NO: 122 по WO-2008/119567	искусственная	HRNFGNSYLSWFAY
190	SEQ ID NO: 135 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGYYPN
191	SEQ ID NO: 136 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
192	SEQ ID NO: 137 по WO-2008/119567	искусственная	ALWYSNRWV
193	SEQ ID NO: 138 по WO-2008/119567	искусственная	VYAMN
194	SEQ ID NO: 139 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKK
195	SEQ ID NO: 140 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYISWAY
196	SEQ ID NO: 153 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGNYPN
197	SEQ ID NO: 154 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
198	SEQ ID NO: 155 по WO-2008/119567	искусственная	VLWYSNRWV
199	SEQ ID NO: 156 по WO-2008/119567	искусственная	SYAMN
200	SEQ ID NO: 157 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKG
201	SEQ ID NO: 158 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYVSWWAY
202	SEQ ID NO: 171 по WO-2008/119567	искусственная	GSSTGAVTSGNYPN
203	SEQ ID NO: 172 по WO-2008/119567	искусственная	GTKFLAP
204	SEQ ID NO: 173 по WO-2008/119567	искусственная	VLWYSNRWV
205	SEQ ID NO: 174 по WO-2008/119567	искусственная	KYAMN
206	SEQ ID NO: 175 по WO-2008/119567	искусственная	RIRSKYNNYATYYADSVKD
207	SEQ ID NO: 176 по WO-2008/119567	искусственная	HGNFGNSYISWAY

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения миелоидного лейкоза, включающий введение больному терапевтически эффективного количества биспецифической конструкции, содержащей первый связывающий домен, специфически связывающийся с CD33, где первый связывающий домен биспецифической конструкции содержит группу из шести CDR с SEQ ID NO: 94-96 и 98-100, и второй связывающий домен, специфически связывающийся с CD3, где второй связывающий домен биспецифической конструкции содержит группы из шести CDR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 154-159, 196-201 и 202-207,

где способ включает стадию введения указанному больному конструкции в течение максимального периода в 14 дней с последующей стадией без введения конструкции в течение по меньшей мере 14 дней,

где биспецифическую конструкцию вводят в соответствии со схемой, включающей следующие последовательности:

(а) введение первой дозы биспецифической конструкции, где биспецифическую конструкцию вводят в дозе 10 мкг/д, с последующим

(б) введением второй дозы биспецифической конструкции, где указанная вторая доза превышает указанную первую дозу, где биспецифическую конструкцию вводят в диапазоне доз от 30 до 500 мкг/д, необязательно с последующим

(с) введением третьей дозы биспецифической конструкции, где указанная необязательная третья доза превышает указанную вторую дозу.

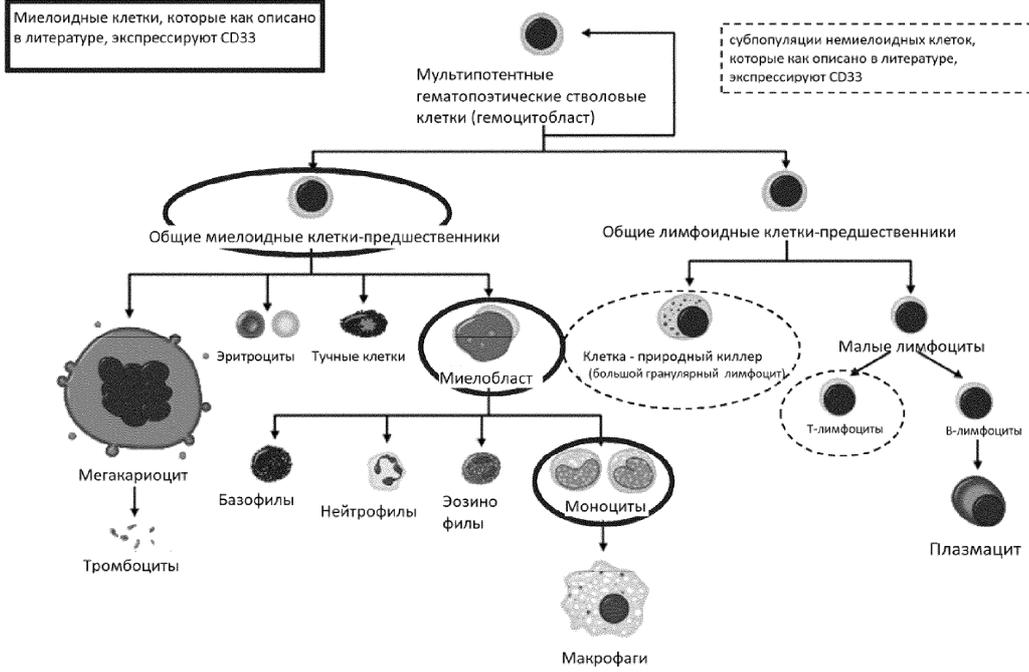
2. Способ по п.1, включающий два или более цикла лечения, каждый из которых включает максимальный период 14 дней введения биспецифической конструкции, за которым следует период по меньшей мере 14 дней без введения биспецифической конструкции.

3. Способ по п.2, где только первый цикл лечения включает введение в соответствии с последовательностью (а), тогда как следующие циклы начинаются с дозы в соответствии с последовательностью (б).

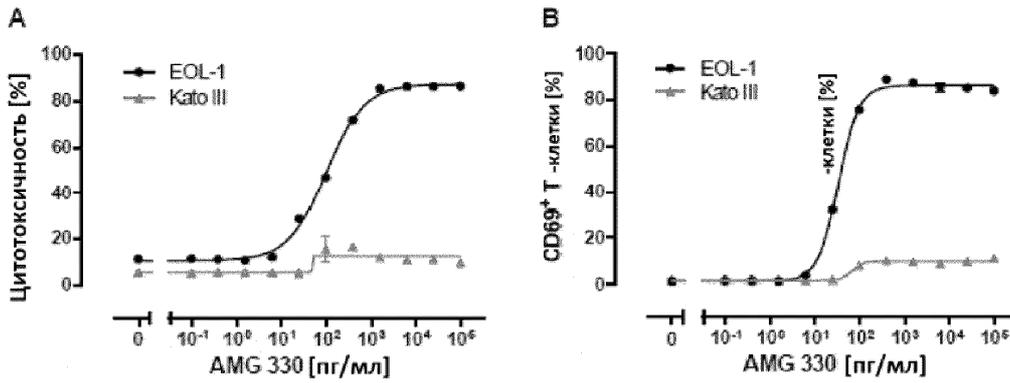
4. Способ по любому из пп.1-3, где биспецифическая конструкция представляет собой биспецифическую конструкцию на основе антитела.

5. Способ по п.4, где биспецифическая конструкция на основе антитела является одноцепочечной конструкцией, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 103, 104, 105, 106, 107 и 108.

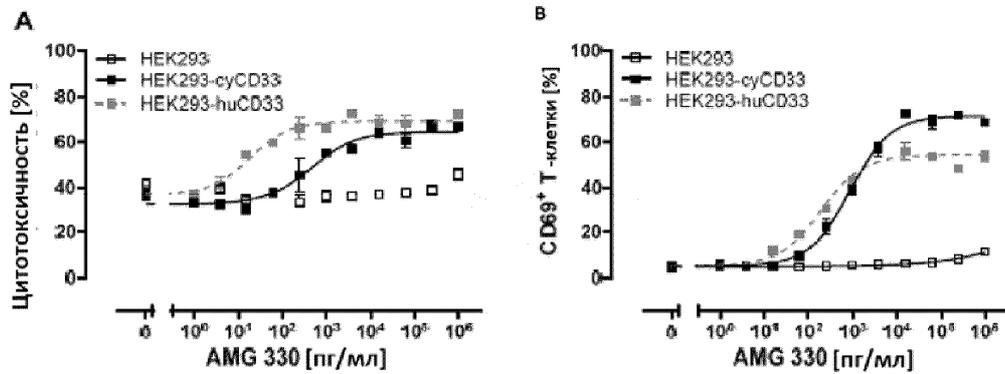
6. Способ по любому из пп.1-5, где миелоидный лейкоз выбран из группы, включающей острый миелобластный лейкоз, хронический нейтрофильный лейкоз, миелоидный дендритноклеточный лейкоз, хронический миелогенный лейкоз в фазе акселерации, острый миеломоноцитарный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, острый базофильный лейкоз, острый эозинофильный лейкоз, хронический эозинофильный лейкоз, острый мегакариобластный лейкоз, эссенциальный тромбоцитоз, острый эритроидный лейкоз, истинную полицитемию, миелодиспластический синдром, острый панмиелоидный лейкоз, миелоидную саркому и острый бифенотипический лейкоз.



Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

