

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900389** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.26

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.08.21

(54) ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ УЧАСТКИ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ CD3 И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ БИСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА

(96) 2019000093 (RU) 2019.08.21

(71) Заявитель:
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"МЕЖДУНАРОДНЫЙ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
"ГЕНЕРИУМ" (RU)**

(72) Изобретатель:
**Пискунов Александр Александрович,
Аббасова Светлана Георгиевна,
Морозов Антон Николаевич, Шустер
Александр Михайлович (RU), Славни
Петер, Гриффитс Даниел, Касзинска
Изабеле, МсСафферти Джон, Дайсон
Михаел (GB)**

(74) Представитель:
Завелева Э.В. (RU)

(57) Изобретение относится к области иммунологии и биотехнологии, а также к созданию новых эффективных высокомолекулярных соединений, обладающих терапевтическими свойствами. Предложены варианты аминокислотных последовательностей определяющих комплементарность участков (CDR) антигенсвязывающих фрагментов белковой молекулы, специфичной к человеческим клеточным рецепторам CD3. Предложенные CDR могут быть использованы при конструировании различных антигенсвязывающих молекул, одной из неотъемлемых функций которых является специфическое взаимодействие с CD3-несущими клетками. При включении указанных CDR в состав антителоподобной молекулы, исходно связывающейся с рецептором CD19, были сконструированы биспецифические молекулы, которые специфично связываются с человеческими клеточными рецепторами CD3 и CD19. Предложенные CDR могут быть использованы при конструировании биспецифических терапевтических антител, пригодных для создания лекарственного средства для лечения опухолевых заболеваний, в частности гематологических злокачественных заболеваний В-клеточной природы, таких как острый лимфобластный лейкоз и В-клеточные лимфомы, включая их рефрактерные или рецидивирующие формы.

A1

201900389

201900389

A1

ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ КОМПЛЕМЕНТАРНОСТЬ УЧАСТКИ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ CD3 И СОДЕРЖАЩАЯ ИХ БИСПЕЦИФИЧЕСКАЯ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА

Изобретение относится к области иммунологии и биотехнологии, а также к созданию новых эффективных высокомолекулярных соединений, обладающих терапевтическими свойствами. Предложены варианты аминокислотных последовательностей определяющих комплементарность участков (CDR) антигенсвязывающих фрагментов белковой молекулы, специфичной к человеческому клеточному рецептору CD3. Указанные последовательности CDR, обеспечивающие связывание данных фрагментов с антигеном CD3, получили с помощью технологии фагового дисплея. Предложенные CDR могут быть использованы при конструировании различных антигенсвязывающих молекул, одной из неотъемлемых функций которых является специфическое взаимодействие с CD3-несущими клетками. При включении указанных CDR в состав антителоподобной молекулы, исходно связывающейся с рецептором CD19, были также сконструированы биспецифические молекулы, которые специфично связываются с человеческими клеточными рецепторами CD3 и CD19. В одном из воплощений биспецифические молекулы состоят из двух полипептидных цепей, каждая из которых содержит переменный домен легкой цепи, специфичный к антигену CD3 (VLCD3), переменный домен тяжелой цепи, специфичный к антигену CD19 (VHCD19), переменный домен легкой цепи, специфичный к антигену CD19 (VL CD19) и переменный домен тяжелой цепи, специфичный к антигену CD3 (VH CD3). Домены расположены в следующем порядке VL CD3 – VH CD19 - VL CD19 – VH CD3. Такое расположение переменных доменов в антиген-связывающей молекуле от N-конца к С-концу полипептида обеспечивает возможность одновременного связывания молекулы с двумя различными антигенами, что и определяет ее терапевтическую эффективность за счет селективного связывания с экстраклеточной частью человеческих рецепторов CD3 и CD19, экспрессируемых Т- и В-клетками, соответственно. При одновременном взаимодействии молекулы по изобретению с экстраклеточной частью рецепторов CD3 и CD19 происходит контакт Т- и В-клеток, что приводит к активации Т-клеток, образованию цитолитического синапса и высвобождению протеолитических ферментов, разрушающих CD19-позитивные клетки-мишени. Предложенная структура расположения антигенсвязывающих участков биспецифической молекулы позволяет сформировать молекулу, эффективно связывающую экстраклеточную часть рецепторов CD3 и CD19, экспрессируемых различными видами клеток. Подобная молекула активирует Т-клетки в

ответ на взаимодействие с клетками-мишенями, экспрессирующими опухолевый антиген (CD19), что приводит к цитолизу последних. Группа изобретений позволяет на основе комбинации CDR, содержащейся в любом из предложенных четырнадцати антигенсвязывающих фрагментов, получить рекомбинантное моноклональное биспецифическое терапевтическое антитело, пригодное для создания лекарственного средства для лечения опухолевых заболеваний, в частности гематологических злокачественных заболеваний В-клеточной природы.

Сокращения и термины:

МКПК - Мононуклеарные клетки периферической крови

TDCC - Т-клеточно-зависимая цитотоксическая активность

BCAT – биспецифическое антитело

MFI - mean fluorescence intensity, усредненная интенсивность флуоресценции

V- вариабельный домен

VL -вариабельный домен легкой цепи

VH -вариабельный домен тяжелой цепи

CDR – определяющий комплементарность участок

Fc-фрагмент - кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина (Fc, fragment crystallizable region, Fc region).

Антитело – молекула иммуноглобулина, для которого существует антиген.

Аффинность — термодинамическая характеристика, количественно описывающая силу взаимодействия антигена и антитела; определяется по закону действующих масс как отношение концентрации комплекса антиген — антитело к произведению концентраций компонентов.

Авидность — характеристика общей стабильности комплекса антигена и антитела; определяется аффинностью антитела к антигену, количеством антигенсвязывающих центров в молекуле антитела и особенностями пространственной структуры антигена, создающими стерические препятствия для создания комплекса. В отличие от аффинности, которая является термодинамическим параметром, количественно описывающим силу единственного взаимодействия антигена и антитела, авидность описывает силу кооперативных аффинных взаимодействий.

Антигенсвязывающий участок антитела - часть антитела, распознающая эпитоп. Имеет несколько названий: активный или антигенсвязывающий центр антител, антидетерминанта или паратоп.

Биспецифические антитела – молекулы иммуноглобулина, которые объединяют антиген-связывающие участки для двух различных антигенов в одной молекуле. Биспецифическое антитело в состоянии связывать два антигена одновременно.

Злокачественные заболевания В-клеточной природы означают в настоящем изобретении:

- В-клеточные опухоли из клеток предшественников В-лимфоцитов

В-лимфобластная лимфома/лейкоз из клеток-предшественников (В-клеточный острый лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников)

- В-клеточные опухоли с фенотипом зрелых лимфоцитов

1. Хронический лимфоцитарный лейкоз / лимфоцитарная лимфома
2. В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз
3. Лимфоплазмочитарная лимфома
4. Селезеночная лимфома маргинальной зоны
5. Волосатоклеточный лейкоз
6. Миелома или плазмочитома (солитарная и внекостная)
7. Экстранодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (MALT-лимфома)
8. Нодальная В-клеточная лимфома маргинальной зоны (с или без моноцитоподобными В-клетками)
9. Фолликулярная лимфома
10. Лимфома из клеток зоны мантии
11. Диффузная В-крупноклеточная лимфома
12. Медиастинальная В-крупноклеточная лимфома
13. Первичная лимфома серозных полостей
14. Лимфома/Лейкоз Беркитта

Истощение В-клеток – снижение числа клеток, экспрессирующих определенный антиген.

Комплементарность антитела – способность антитела к специфическому взаимодействию с антигеном. За редким исключением, антитело взаимодействуют только с тем антигеном, который индуцировал их образование и подходит к ним по пространственной структуре.

Определяющий комплементарность участок – гипервариабельный участок вариабельной цепи, образующий антигенсвязывающий центр молекулы антитела.

Опухолевые антигены — антигены, продуцируемые раковыми клетками и способные вызвать иммунный ответ организма. Являются результатом проявления измененного генома раковой клетки.

Острый лимфобластный лейкоз — злокачественное заболевание системы кроветворения, характеризующееся неконтролируемой пролиферацией незрелых лимфоидных клеток (лимфобластов).

В-клеточная лимфома — разновидность неходжкинских новообразований. Заболевание возникает на фоне бесконтрольного деления В-лимфоцитов, принимающих клетки и ткани организма за чужеродные.

Специфичность — способность антитела проявлять различную аффинность по отношению к различным антигенам.

Эпитоп, или антигенная детерминанта — часть макромолекулы антигена, небольшой участок молекулы антигена, который взаимодействует со специфичным к нему антителом. Этот участок распознаётся клетками или молекулами иммунной системы (антителами, В-лимфоцитами, Т-лимфоцитами).

CD3 (англ. Cluster of Differentiation 3) — мультипротеиновый комплекс на поверхности Т-лимфоцитов, у млекопитающих образован 4 субъединицами: CD3 γ , CD3 δ и двумя CD3 ϵ .

CD19, или В-лимфоцитарный антиген CD19 — белок, расположенный на поверхности В-лимфоцитов.

Все термины и сокращения, используемые в настоящей заявке, употребляются в том же значении, как это принято в данной области техники, и понятны специалистам. Приведенные выше определения даны для устранения каких-либо разночтений.

Описание чертежей.

Фиг.1. Эффективность связывания препарата БСАТ с человеческими CD19-позитивными клеточными линиями. А) клеточная линия Namalwa (ATCC® CRL-1432™); Б) клеточная линия Daudi (ATCC® CCL-213™); В) клеточная линия NALM6 (ATCC® CRL-3273™); Г) клеточная линия Ramos (ATCC® CRL-1596™); Д) клеточная линия Toledo (ATCC® CRL-2631™); Е) клеточная линия Raji (ATCC® CCL-86™).

Фиг.2. Эффективность связывания препарата БСАТ с CD3-позитивными клеточными линиями. А) клеточная линия HUT78 (ATCC® TIB-161™); Б) клеточная линия CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™); В) клеточная линия Jurkat (ATCC® TIB-152™).

Фиг.3. Взаимодействие CD19-позитивных PBMC условно здоровых доноров с конъюгированным с FITC антителом к экстраклеточной части человеческого рецептора

CD19 (клон HD37) (Millipore milli-mark, кат. № FCMAV184F) в присутствии препарата БСАТ в разных концентрациях.

Фиг.4. Взаимодействие БСАТ с CD3-позитивными РВМС условно здоровых доноров.

Фиг.5. Эффективность цитолиза CD19-позитивных клеток человеческой линии Raji препаратом БСАТ при использовании в качестве эффекторных клеток активированных МКПК условно здоровых доноров.

Фиг.6. Способность БСАТ одновременно связывать CD3 и CD19 при использовании клеток человеческой линии Raji и эффекторных клеток коммерческой репортерной линии Jurkat-LUCIA-NFAT (Promega).

Фиг.7. Оценка активности и специфичности биспецифических IgG-подобных молекул в ходе анализа активации клеток линии Jurkat. IgG-подобные молекулы титровали и оценивали их способность активировать транскрипцию NFAT в репортерных клетках линии Jurkat. Синими линиями обозначена активация эффекторных клеток (модифицированных путем генной инженерии клеток линии Jurkat) в присутствии клеток-мишеней (клеток линии Raji), красными линиями обозначена активация эффекторных клеток в отсутствие клеток-мишеней. Нумерация клонов справа налево и сверху вниз: 309_01_A02; 309_01_G04; 309_01_G12; 309_02_A08; 309_02_F01; 309_04_A04; 309_05_B08; контроль1; контроль2; 400_01_D06; 400_03_H07; 410_01_C03; 410_01_C09; 418_01_C05; 418_03_E12; 418_03_H01; отрицательный контроль.

Фиг. 8. Анализ связывания IgG-подобных антител к CD3 с клетками линии Jurkat методом проточной цитометрии. По оси y представлена средняя интенсивность флуоресценции, по оси x – логарифм концентрации биспецифической IgG-подобной молекулы. Данные, полученные в независимых экспериментах, представлены отдельно (верхняя и нижняя панели). Обозначения: MFI (FU)- Средняя интенсивность флуоресценции (единицы флуоресценции). IBC Genetium BiM- биспецифическая IgG-подобная молекула, положительный контроль и BiM - биспецифическая IgG-подобная молекула, отрицательный контроль

Фиг. 9. Сравнительная способность биспецифического антитела по изобретению 309-02-F08 и терапевтического антитела BIMSA2 одновременно связывать CD3 и CD19 с использованием клеток человеческой линии Raji и эффекторных клеток коммерческой репортерной линии Jurkat-LUCIA-NFAT (Promega).

Фиг. 10, А-Е. Эффективность цитолиза CD19-позитивных клеток человеческой линии Raji препаратами различных вариантов БСАТ при использовании в качестве эффекторных клеток активированных МКПК условно здоровых доноров. А: клон

309_01_G04, Б: клон 309_01_A02, В: клон 309_02_F01, Г: клон 309_01_G12, Д: клон 309_02_A08, Е: клон 309_05_B08.

Фиг.11. Схема возможного фолдинга БСАТ.

Антитела, или иммуноглобулины (Ig), - это растворимые гликопротеины крови и тканевой жидкости. Классические антитела представляют собой мультимерные белки, объединяющие две идентичные тяжелые (H) цепи и две идентичные легкие (L) цепи. H-цепи, в свою очередь, состоят из вариабельного домена (VH) и трех константных (CH1, CH2, CH3) доменов, а также шарнирного участка между CH1 и CH2 доменами. L-цепи состоят из вариабельного, VL, и константного, CL, доменов. Четыре цепи объединяются в молекулу посредством нековалентных и ковалентных (дисульфидных) связей. Комбинация антигенсвязывающих участков (CDR-Complementarity Determining Regions) вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи формирует участок связывания антигена, в то время как каркасные регионы вариабельных доменов (FR - Framework Regions) и константные домены антител непосредственно не участвуют в распознавании антигена. Вариабельные области, хотя и находятся на большом отдалении друг от друга в первичной структуре легкой цепи, при образовании трехмерной структуры оказываются расположенными в непосредственной близости друг к другу. В пространственной структуре вариабельных доменов гипервариабельные последовательности расположены в зоне изгибов полипептидной цепи, направленной навстречу соответствующим участкам V-домена другой цепи (т.е. CDR легкой и тяжелой цепей направлены навстречу друг другу). В результате взаимодействия вариабельного домена H- и L-цепей формируется антигенсвязывающий участок (активный центр) иммуноглобулина. Пространственная структура этой полости, обусловленная строением гипервариабельных участков, определяет способность антител распознавать и связывать конкретные молекулы на основе пространственного соответствия (специфичность антител). Гипервариабельные участки V-доменов входят в состав активного центра не полностью — поверхность антигенсвязывающего участка захватывает только около 30% CDR. Специфически взаимодействуют с эпитопами антигена отдельные аминокислотные остатки в CDRh.

Минимизированной производной антигенсвязывающего фрагмента классических антител является одноцепочечная конструкция, в которой вариабельные домены тяжелой и легкой цепей соединены линкерной последовательностью (scFv). Участок связывания антигена имеет разную пространственную конфигурацию для каждой антигенной специфичности антитела. Когда антиген вступает в контакт с антителом, многочисленные

простетические группы антигена как зеркальное изображение соответствуют таким же группам антитела, благодаря чему между антителом и антигеном осуществляется быстрое и плотное связывание. Если антитело высокоспецифично, сцепление между антителом и антигеном может происходить посредством сразу нескольких форм взаимодействия: гидрофобных связей; водородных связей; ионного притягивания; Ван-дер-Ваальсовых сил. Антитело, имеющее два переменных участка для прикрепления антигена, называют бивалентным. Биспецифическое антитело в состоянии связывать два различных антигена одновременно. В зависимости от практической задачи исследователи могут изменять размер антител, их специфичность, аффинность, валентность, уменьшать иммуногенность, оптимизировать фармакокинетические свойства и эффекторные функции. В дополнение к этому, антитела получают в виде рекомбинантных составных белков, включающих антитела другой специфичности, цитокины, белковые токсины и радиоизотопы, ферменты, флуоресцентные белки (см. Деев С. М., and Лебедеенко Е. Н. "Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения" Acta Naturae (русскоязычная версия), vol. 1, no. 1, 2009, pp. 32-50). Каждое антитело обладает уникальной специфичностью и высоким сродством, или аффинностью ($KD\ 10^{-8}$ - 10^{-11} М) к своему антигену, которое обеспечивается комплементарностью антиген-связывающего участка антитела определенному участку молекулы антигена (эпитопу). Различные антитела способны одновременно связывать один, два и более антигенов. Аффинность антител, применяемых для терапии в настоящее время, лежит в пределах наномолярных концентраций (от 10^{-8} до 10^{-10} М), которые являются оптимальными для большинства задач. Размер молекул терапевтического антитела является важным фактором, определяющим возможность их вывода через почки и, соответственно, быстроту выведения из организма. Время полувыведения белков через почки коррелирует с размером молекулы. Оптимальным поверхностным зарядом для терапевтических антител является интервал их изоэлектрических точек от 5 до 9. Увеличение как положительного, так и отрицательного заряда ухудшает связывание антитела с клетками-мишенями.

Свойства предложенных по изобретению 14 функциональных антител, способных к связыванию рецепторного комплекса CD3 на поверхности экспрессирующих его клеток, даны в таблице 1. Антитело «ОКТ3» включено в качестве стандартного контроля. Антитела содержат одну из комбинаций CDR, предложенных по изобретению, а также антигенсвязывающий фрагмент для рецептора CD19. В таблице представлена информация о характеризующих антитело последовательностях CDR3 легкой и тяжелой цепи, активности по данным анализа взаимодействия с клетками и индикаторе пригодности к

промышленному производству, такому как продуктивность экспрессии. Последовательности всех антител характеризуются уникальными комбинациями последовательностей CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи и способностью активировать клетки линии Jurkat (с репортерным геном, регулируемым ядерным фактором активированных Т-клеток (NFAT)) в ответ на взаимодействие с клетками-мишенями, экспрессирующими CD19. В отсутствие клеток-мишеней неспецифическая активация клеток линии Jurkat была низкой или не обнаруживалась (при концентрациях биспецифических JgG-подобных молекул ≥ 1 нМ). Данные об активности в отношении активации клеток линии Jurkat приведены в таблице 1. Связывание с нативным CD3 на поверхности клеток линии Jurkat измеряли путем проточной цитометрии.

Таблица 1. Свойства предложенных функциональных антител, способных к связыванию рецепторного комплекса CD3 на поверхности экспрессирующих его клеток

Название клона	Последовательность CDR3 тяжелой цепи	Последовательность CDR3 легкой цепи	Активность (EC ₅₀ для активации клеток линии Jurkat, нМ)	Связывание с клетками линии Jurkat	Продуктивность экспрессии (мг/л)
309_01_A02	SSRIQAGMDV	QSYDSNNRV	7,9	++	15,5
309_01_G04	EDYYGGYFDY	QSYDSSNQAV	2,0	++	33,2
309_01_G12	PSRYSNYVD	QSYDNTNPWV	13,8	+	19,7
309_02_A08	TGKNYYYYGMDA	QSYDTSNHVV	2,2	++	15,1
309_02_F01	DKRYSSGWYEN	QSYDSSSVI	32,2	+	14,9
309_04_A04	ATRNGVFDY	QSYDSGVV	3,7	++	5,5
309_05_B08	STVTRPDFDY	QSYDSSNQRV	275,8	+	8,6
400_01_D06	DRGDYGDITYFDY	QSYDSSDRVV	17,5	+	9,3
400_03_H07	SGIAAAGFDY	QSYDSSNRV	328,5	+	11,5
410_01_C03	ATRNGAFDY	QSYDSSNVV	3,0	+	6,8
410_01_C09	PSRYSNYVD	QSYDSRWI WV	2,2	+	5,9
418_01_C05	DKPLSGYAFDI	QSYATR TQGVV	1,5	+	2,4
418_03_E12	RSFSSVFADY	QSYATRSQSVV	1,0	+	8,3
418_03_H01	VYSSGWFSY	QSYDG SNWV	4,3	+	7,2
OKT3 (BiM8)			10,6	+++	0,5

При одновременном взаимодействии биспецифической молекулы с экстраклеточной частью рецепторов CD3 и CD19 происходит контакт Т- и В-клеток, что приводит к активации Т-клеток, образованию цитолитического синапса и высвобождению протеолитических ферментов, разрушающих CD19-позитивные клетки-мишени. CD3-CD19 – направленные биспецифические антитела в настоящее время разрабатываются преимущественно для терапии злокачественных В-клеточных заболеваний или для истощения В-клеток, например, для терапии неходжкинской лимфомы, острого лимфобластного лейкоза и др. Биспецифические антитела (БСАТ) выполняют функцию адаптеров, которые физически соединяют Т-клетки с опухолевыми CD19-позитивными клетками-мишенями и запускают их цитолиз. CD3 является пан-Т-клеточным рецептором, то есть он представлен на всех Т-лимфоцитах, поэтому при применении биспецифического антитела к опухолевым клеткам будут привлекаться различные субпопуляции Т-клеток. Рецептор CD19 устойчиво и равномерно экспрессируется только клетками В-лимфоцитарного ряда (в том числе и опухолевыми). CD19 практически нигде, кроме В-клеток, более не синтезируется и, соответственно, получаемая терапия специфична. БСАТ соединяет Т-клетку и раковую клетку за счет одновременного связывания с CD3 и с антигеном-мишенью. В этом случае происходит активация и пролиферация Т-клеток, образование цитолитического синапса с высвобождением цитотоксических гранул и секреция цитокинов. Направленный лизис раковых клеток включает в себя перфорацию мембраны клетки-мишени с участием перфорины и последующий апоптоз, индуцированный гранзимами. Связывание БСАТ только с Т-клеткой в отсутствие клетки-мишени не вызывает Т-клеточную активацию.

Примеры биспецифических антител, известных из уровня техники (Blood, (ASH Annual Meeting Abstracts), 2009, 114:840), свидетельствуют о том, что эффективная терапевтическая концентрация препаратов, полученных на основе использования мультивалентных антител, существенно ниже по сравнению с классическими антителными противораковыми препаратами. Это способствует хорошей переносимости, возможности осуществления длительных курсов лечения и уменьшению риска побочных эффектов.

В настоящее время известны различные полипептиды, специфичные в отношении CD19 и CD3, и их применение в качестве компонента лекарственного средства для истощения В-клеток и лечения В-клеточных заболеваний. Изобретение, раскрытое в RU2228202, раскрывает одноцепочечный многофункциональный полипептид, специфичный в отношении C19 и CD3 антигенов формулы: $V_LCD19 - V_HCD19 - V_HCD3 - V_LCDS$, полинуклеотид, кодирующий этот полипептид, экспрессирующий вектор, штамм

культуры клеток, способ получения полипептида, фармацевтическую композицию для лечения злокачественных заболеваний В-клеток, диагностическую композицию, способ выявления активаторов или ингибиторов Т-клеточной активации или стимуляции, способ приготовления фармацевтической композиции, предназначенной для лечения злокачественных заболеваний В-клеток, способ лечения злокачественных заболеваний В-клеток или истощения В-клеток и способ замедления развития патологического состояния. Из патента RU2651776 известно рекомбинантное моноклональное биспецифическое антитело, включающее две соединенных дисульфидными связями цепи, каждая из которых состоит из следующих доменов: VL(CD3)-L1-VH(CD19)-L2-VL(CD19)-L3-VH(CD3)-H-CH2-CH3(IgG2), где VL (CD3) и VH(CD3). Антитело может быть использовано для лечения гематологических злокачественных заболеваний В-клеточной природы.

Известна также димерная антиген-связывающая молекула тандемного диатела для одновременного связывания с двумя различными антигенами, раскрытая в документе RU2613368. Молекула состоит из двух идентичных полипептидных цепей.

В заявленном изобретении каждую полипептидную цепь биспецифической молекулы составляют первый домен VL CD3, являющийся варибельным доменом легкой цепи, специфичным по отношению к CD3; второй домен VH CD19, являющийся варибельным доменом тяжелой цепи, специфичным по отношению к CD19; третий домен VL CD19, являющийся варибельным доменом легкой цепи, специфичным по отношению к CD19; и четвертый домен VH CD3, являющийся варибельным доменом тяжелой цепи, специфичным по отношению к CD3. Указанные домены расположены в каждой из полипептидных цепей в следующем порядке: VLCD3-VHCD19-VLCD19-VHCD3 от N-конца к С-концу. Первый домен VLCD3 связан со вторым доменом VHCD19 посредством первого линкера L1, второй домен VHCD19 связан с третьим доменом VLCD19 посредством второго линкера L2, и третий домен VLCD19 связан с четвертым доменом VHCD3 посредством третьего линкера L3. Линкер L2 состоит из 15 или менее аминокислотных остатков. При формировании биспецифической молекулы первый домен VLCD3 первой полипептидной цепи оказывается связан с четвертым доменом VHCD3 первой полипептидной цепи с образованием антиген-связывающего сайта для CD3; второй домен VHCD19 первой полипептидной цепи связан с третьим доменом VLCD19 первой полипептидной цепи с образованием антиген-связывающего сайта для CD19 (Фиг. 11). На схеме для наглядности CD3-связывающий домен обозначен символом А, CD19-связывающий домен обозначен символом В. Добавление Fc-области к молекуле продлевает время её пребывания в кровотоке за счет связывания с неонатальным

10

рецептором FcRn, увеличивая, таким образом, период полувыведения лекарственного препарата (Hmila I., et al.. Mol. Immunol. England, 2008, Vol. 45, no. 14, pp. 3847-3856). Образование полной молекулы из двух цепей происходит в результате классического процесса фолдинга антител. В процессе формирования третичной структуры антитела между константными регионами тяжелых цепей образуются дисульфидные связи. Одна цепь является полностью функциональной. Димер является более стабильным по сравнению с мономером, и большая молекулярная масса позволяет ему дольше циркулировать в крови.

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

Особенно предпочтительными являются линкеры, которые представляют собой пептиды, состоящие по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или 100% из небольших аминокислот, таких как глицин, серин и аланин. Особенно предпочтительными являются линкеры, состоящие только из молекул глицина и серина. Предпочтительно линкерные последовательности по изобретению состоят из 5-15 аминокислот. Более предпочтительно, чтобы линкеры LI, L2, L3 антитела против CD3*CD19 по изобретению были выбраны из следующих последовательностей:

LI : (XXS) k , где $k=2-3$, L2: (XXS) n , где $n=4-5$, L3: (XXS) m , где $m=2-3$, X=G.

В одном из воплощений в антителе по изобретению LI, L2, L3 могут быть представлены последовательностями, соответствующими SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19.

В одном из воплощений посредством короткого шарнирного участка каждая из указанных цепей присоединена к Fc-последовательности IgG2 человека. Биспецифическая

молекула в отсутствие Fc фрагмента и шарнирной области также связывается с CD3 и CD19 антигенами, вследствие малой молекулярной массы не взаимодействует с Fc-рецепторами и поэтому быстро выводится из кровотока.

Шарнирная область представляет собой последовательность, которая в природном иммуноглобулине связывает CH1 -домен с областью CH2-CH3 Fc-фрагмента. Шарнирная область, используемая в антителе по изобретению предпочтительно гомологична природной области иммуноглобулина и обычно включает цистеиновые остатки, связывающие две тяжелые цепи посредством дисульфидных связей, как в природных иммуноглобулинах. Типичные последовательности шарнирных областей иммуноглобулинов человека и мыши можно найти в ANTIBODY ENGINEERING, a PRACTICAL GUIDE, (Borrebaeck, ed., W. H. Freeman and Co., 1992). Подходящие шарнирные области по настоящему изобретению могут происходить от IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 и других изотипов иммуноглобулинов. В представленном воплощении в конструкции антитела по изобретению использована шарнирная область IgG1 с последовательностью, представленной в SEQ ID NO:15.

Fc фрагмент представляет собой концевую часть молекулы иммуноглобулина, которая взаимодействует с Fc-рецептором на поверхности клетки и с некоторыми белками системы комплемента. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелых цепей иммуноглобулины подразделяют на классы: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, IgA1 и IgA2. В соответствии с константными областями тяжелых цепей различные классы иммуноглобулинов называют [альфа], [дельта], [эпсилон], [гамма] и [мю], соответственно. Четыре изотипа человеческого IgG связывают различные рецепторы, такие как неонатальный Fc-рецептор, активирующие Fc-рецепторы гамма, FcγRI, FcγRIIa и FcγRIIIa, ингибирующий рецептор FcγRIIb и C1q с различной аффинностью, получая разные виды активности. Однако термин "Fc-последовательность" в рамках настоящего изобретения относится, в том числе, к Fc-последовательностям, модифицированным для изменения сродства к соответствующему рецептору. Антитело по настоящему изобретению содержит Fc-часть, чтобы продлить период полураспада. Такая Fc-последовательность имеет предпочтительно человеческое происхождение, более предпочтительно, представляет собой человеческую Fc- последовательность антитела IgG, более предпочтительно IgG2. В одном из предпочтительных воплощений последовательность соответствует SEQ ID NO:16. При этом выбор Fc-последовательности типа IgG2 позволяет обеспечить снижение

эффекторной нагрузки, обусловленной Fc-последовательностью и снизить таким образом направленную токсичность антитела по изобретению.

Таким образом, молекула, включающая предложенные по изобретению новые антиген-связывающие участки CD3 антигена, конструируется на основе единого каркаса, где переменные домены легкой и тяжелой цепей для связывания CD3 и CD19 антигенов соединены тремя линкерными участками в определенном порядке. Дополнительные функциональные свойства молекуле добавляет присоединение к ней Fc фрагмента посредством шарнирной области.

На основании предложенных CD3-антигенсвязывающих фрагментов авторы изобретения получили набор антител, имеющих различные последовательности переменных участков легкой и тяжелой цепи для связывания CD3, соединенных в биспецифическую молекулу согласно указанной выше единой схеме. Был получен ряд антителоподобных молекул, полные последовательности которых приведены в списке последовательностей, №№1-14. Последовательности CDR для связывания CD19 воссозданы на основании известного антитела HD37, являются общими для всех биспецифических антител и представляют собой для тяжелой цепи:

CDRH1: GYAFSSY

CDRH2: WIGQIWPGDGDNTYNGKFKG

CDRH3: RETTTVGRYYYAMDY

Для легкой цепи:

CDRL1: KASQSVDYDGDSYLN

CDRL2: DASNLVS

CDRL3: QQSTEDPWT

Последовательности CDR, обеспечивающие связывание молекулы с антигенами CD3, для каждого из антител приведены в таблице 2.

Таблица 2. Варианты сочетаний CD3-связывающих участков легкой и тяжелой цепи в составе биспецифической молекулы

№ П/П	КЛОН	ВАРИАБЕЛЬНЫЕ УЧАСТКИ ТЯЖЕЛОЙ ЦЕПИ			ВАРИАБЕЛЬНЫЕ УЧАСТКИ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ		
		CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
1	>309_0 1_A02	GFTFSSYSM N	SISSSSYIYY ADSVKG	SSRIQAGMDV	TRSSGTI ASTYVQ	EDNQRPS	QSYDSNNR V
2	>309_0 1_G04	GFTVSSNY MS	SAISGSGGST YYADSVKG	EDYYGGYFDY	TRSSGSI ASNYVQ	EDNQRPS	QSYDSSNQ AV
3	>309_0 1_G12	GYTFTGYY MH	RINPNSGGTN YAQKFQG	PSRYSNYVD	TRSSGSI ASNYVQ	DDDQRP S	QSYDNTNP WV
4	>309_0 2_A08	GYTFTGYY MH	IINPSGGSTSY AQKFQG	TGKNYYYYGM DA	TRSSGSI ARNYVQ	EDNQRPS	QSYDTSNH VV
5	>309_0 2_F01	GYTFTGYY MH	WINPNSGGT NYAQKFQG	DKRYSSGWYE N	TRSSGSI ASKYVQ	EDNQRPS	QSYDSSSVI
6	>309_0 4_A04	GGSFSGYY WS	EISRSGTTNY NSSLKS	ATRNGVFDY	TRSSGSI ASNYVQ	EDNQRPS	QSYDSGVV
7	>309_0 5_B08	GFTFSSYAM S	AISGSGGSTY YADSVKG	STVTRPDFDY	TRSSGSI ARNYVQ	EDNQRPS	QSYDSSNQ RV
8	>400_0 1_D06	GGTFSSYAI S	GIPIFGTANY AQKFQG	DRGDYGDITYF DY	TGSSGSI ASNYVQ	EDNHRPS	QSYDSSDR VV
9	>400_0 3_H07	GFTFSSYSM N	SISSSSYIYY ADSVKG	SGIAAAGFDY	ARSSGSI ASNYVQ	EDNRRPS	QSYDSSNR V
10	>410_0 1_C03	GGSFSGYY WS	EINHSGSTNY NPSLKS	ATRNGAFDY	TRSSGRI ASNYVQ	EDNQRPS	QSYDSSNV V
11	>410_0 1_C09	GYTFTSYY MY	RINPNSGGTN YAQKFQG	PSRYSNYVD	TRSSGSI ASNYVQ	EDNQRPS	QSYDSRWI WV
12	>418_0 1_C05	GFTFSSYGM H	YINRSSTIY YADSVKG	DKPLSGYAFDI	TRSSGSI ASNFVQ	DDDQRP S	QSYATRTQ GVV
13	>418_0 3_E12	GFTFSSYGM H	SISSSSYIYY ADSVKG	RSFSSVFADY	TRSRGSI ASNYVQ	DDDQRP S	QSYATRSQ SVV
14	>418_0 3_H01	GGSFSTRYY WS	EIKHRGRTN YNPSLKS	VYSSGWFSY	TRSSGSI ARNYVQ	EDNQRPS	QSYDGSNW V

Активность и специфичность полученных антител подтверждена рядом примеров.

Функционально активные биспецифические IgG-подобные молекулы были подвергнуты скринингу на предмет связывания с эндогенным белком CD3, присутствующим на поверхности клеток линии Jurkat в составе Т-клеточного рецепторного комплекса. Сначала связывание с клетками линии Jurkat оценивали путем проточной цитометрии для одной концентрации биспецифических IgG-подобных молекул 100 нМ; все 14 биспецифических IgG-подобных молекул демонстрировали связывание с клетками. Для дальнейшего определения профиля связывания с клетками каждого клона биспецифические IgG-подобные молекулы-кандидаты титровали и оценивали зависимость от концентрации связывание с клетками линии Jurkat (результаты представлены на Фиг. 8). Эти эксперименты были проведены отдельно для двух независимых серий клонов антител к CD3. Для сравнения приведены данные для применявшихся в качестве положительных контролей двух биспецифических IgG-подобных молекул, содержащих ОКТ3 в роли связывающегося с CD3 фрагмента и HD37, связывающегося с CD19. В качестве негативного контроля использовали BiM8_D1.3, в котором одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) антитела к CD3 замещен на одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) антитела к лизоциму (D1.3). Все антитела к CD3 оказались способными связываться с нативным CD3 на поверхности клеток, хотя максимальные сигналы и активность существенно варьировались между клонами. Как и ожидалось, контрольный BiM_D1.3 не связывался с клетками ни в одной из исследованных концентраций.

Фиг.9. демонстрирует сравнительную способность биспецифического антитела по изобретению и терапевтического антитела по патенту RU2651776 одновременно связывать CD3 и CD19 с использованием клеток человеческой линии Raji и эффекторных репортерных клеток.

Весь набор антител, имеющих заявленную структуру, был протестирован на цитолитическую активность в отношении CD19-позитивных клеток-мишеней в репортерном TDCC-тесте. Эффективность цитолиза CD19-позитивных клеток человеческой линии Raji препаратами различных вариантов предложенных БСАТ при использовании в качестве эффекторных клеток активированных МКПК условно здоровых доноров продемонстрирована на Фиг. 10.

Была подтверждена способность биспецифических антител вызывать активацию и пролиферацию CD3-позитивных клеток в ответ на контакт с CD19-позитивными клетками-мишенями и вызывать выброс провоспалительных цитокинов Т клетками.

Таким образом, приведенные данные показывают, что молекулы, созданные с использованием предложенных вариантов CDR, могут быть с высокой эффективностью продуцированы в культуре клеток, обладают функциональными свойствами, не уступающими известным биспецифическим CD3-CD19 направленным молекулам и, следовательно, могут быть использованы при разработке лекарственных препаратов, применяемых при лечении В-клеточных заболеваний.

Препарат на основе биспецифической молекулы, связывание которых с антигеном CD3 обеспечивается включением в состав указанной молекулы вариантов легкой и тяжелой цепи, содержащих CDR, перечисленные в таблице 2, может быть применен для терапии пре-В-клеточного отрицательного по филадельфийской хромосоме рецидивирующего или рефрактерного острого лимфобластного лейкоза. Механизм действия обеспечивается связыванием БСАТ с CD19-рецептором на поверхности В-лимфоцитов и с CD3-рецептором на поверхности эффекторных Т-лимфоцитов и инициирует активацию Т клеток, которая приводит к лизису CD19-позитивных В-клеток.

Для указанных антител была определена специфичность и эффективность взаимодействия с CD3- и CD19-позитивными человеческими клеточными линиями с использованием проточной цитометрии. Предложенные молекулы специфично связываются с CD3-позитивными клеточными линиями (Jurkat, HUT-78, CCRF-CEM) и CD19-позитивными клеточными линиями (Raji, NALM6, Daudi, Namalwa, Ramos и др.). Эксперименты *in vitro* доказывают, что молекулы по настоящему изобретению могут демонстрировать в 7 раз более высокую цитотоксическую активность в сравнении с молекулами, обладающими альтернативной доменной структурой.

Подтверждением физиологической активности предложенной молекулы послужили следующие эксперименты: была определена концентрация препарата, при которой 50% CD3- и CD19- рецепторов находятся в комплексе с биспецифической молекулой с использованием МКПК условно здоровых доноров; определена Т-клеточно-опосредованная цитолитическая активность препарата в отношении CD19-позитивных клеток-мишеней опухолевых линий человека при использовании в качестве эффекторных клеток активированных МКПК условно здоровых доноров. Способность одновременно связывать CD3 и CD19 подтверждена с помощью клеток линии Raji и клеток коммерческой репортерной линии Jurkat-LUCIA-NFAT (Promega).

Примеры 1-4 показывают, что антитело по изобретению имеет высокое сродство к таргетным CD3- и CD19-позитивным человеческим клеточным линиям в субнанолярном диапазоне. Концентрация, при которой выявляли 50% свободных CD3-

рецепторов при инкубации с РВМС условно здоровых доноров, варьировала от 52,1 до 66,5 нМ. Концентрация, при которой выявляли 50% свободных CD19-рецепторов, варьировала от 0,02 до 0,06 нМ в зависимости от донора. Препарат БСАТ проявлял Т-опосредованную цитолитическую активность в отношении CD19-позитивных клеток-мишеней человеческой линии Raji при использовании в качестве эффекторных клеток МКПК условно здоровых доноров. EC50 варьировала от 1,3 рМ до 3,1 рМ, а процент максимального лизиса клеток-мишеней – от 41 до 100, в зависимости от донора. В репортерном тесте EC50 составила 2,3 рМ. Оба метода подтверждают одновременное связывание препарата 309_02_A08 по изобретению с CD3- и CD19- позитивными клетками.

Все молекулы по настоящему изобретению могут быть получены с использованием рутинных методов, применяемых в настоящее время для получения терапевтических белковых молекул с известной первичной структурой. Ген, кодирующий полипептидную цепь, имеющую любую из предложенных аминокислотных последовательностей, получают путем отжига перекрывающихся химически синтезированных олигонуклеотидов и затем клонируют в экспрессионный вектор рMT1638. Полученный вектор рMT1638 верифицируется рестрикционным картированием и секвенированием. После этого проводят трансфекцию с последующей селекцией по резистентности к пуромицину с использованием стандартных методов. Трансфекцию проводят с использованием коммерчески доступного штамма CHO-K1, адаптированного к суспензионному росту. Выбор линии клеток-продуцентов обусловлен необходимостью формирования оптимального профиля гликозилирования при синтезе человеческих белков, а также их стабильностью, безопасностью и возможностью применения суспензионных условий культивирования данной линии клеток, что является важнейшими параметрами для производства терапевтических антител. Культивирование продуцента проводится в режиме fed-batch с использованием питательной среды BalanCD CHO Growth A (Irvine Scientific) и нутриентной добавки BalanCD® CHO Feed 4 (Irvine Scientific) в течение 11 суток при температуре 37°C (1-6 сутки), 32°C (7-11 сутки) и 5% CO₂ в газовой фазе инкубатора. После культивирования культуральная жидкость осветляется центрифугированием.

Для выделения и очистки целевого продукта из культуральной жидкости могут быть применены различные известные методы очистки антител. Может быть использована, например, схема, включающая аффинную стадию с использованием сорбента на основе протеина А и катионообменную хроматографию на сорбенте высокого

разрешения, обеспечивающую эффективное разделение целевой формы белка и его олигомерных форм.

Пример 1. Определение специфичности и эффективности взаимодействия молекулы БСАТ с CD3- и CD19-позитивными клетками человека.

Клеточные суспензии CD19-позитивных клеточных линий (NALM6 (ATCC® CRL-3273™), Toledo (ATCC® CRL-2631™), Namalwa (ATCC® CRL-1432™), Daudi (ATCC® CCL-213™), Ramos (RA 1) (ATCC® CRL-1596™), Raji (ATCC® CCL-86™)) и CD3-позитивных клеточных линий (HuT78 (ATCC® TIB-161™), CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™), Jurkat (ATCC® TIB-152™)) с концентрацией $2 \cdot 10^6$ клеток в мл вносили по 30 мкл в 96-луночный планшет с V-образным дном (Corning Inc, кат. № 3894). Вносили в лунки с клетками по 30 мкл раствора БСАТ клон 309_02_A08 в последовательных 3-кратных разведениях от 200 нМ до 0,003 нМ (финальные концентрации от 100 нМ до 0,0016 нМ). Инкубировали 60 мин на льду. По окончании инкубации дважды отмывали клетки FACS буфером, осаждая клетки центрифугированием при 1000 об/мин (4 ± 2) °C. К осадку клеток добавляли по 30 мкл раствора антител к человеческому IgG, меченных FITC, (Donkey F(ab)₂ Anti-Human IgG, Abcam, кат. № Ab102437) в разведении 1:200. Инкубировали 30 мин на льду в темноте с последующей трехкратной отмывкой FACS буфером. После отмывки клетки фиксировали, ресуспендируя клеточный осадок в каждой лунке в 150 мкл FIX-буфера (фосфатно-солевой буфер с 1% раствором формалина). Интенсивность флуоресценции клеток в FITC-канале измеряли на цитометре Canto II.

Таблица 3. Эффективность связывания БСАТ с CD19- и CD3- позитивными клеточными линиями.

	Клеточная линия	EC50, нМ
CD3-позитивные клеточные линии	CCRF-CEM	0,40
	HUT78	1,20
	Jurkat	0,37
CD19-позитивные клеточные линии	Namalwa	0,29
	Daudi	0,12
	NALM6	0,28
	Ramos	0,38
	Toledo	0,24
	Raji	0,33

Показано, что БСАТ специфично связывается с CD19- и CD3- позитивными клеточными линиями с субнаномолярным аффинитетом. Результаты экспериментов продемонстрированы на фигурах 1 и 2 и в таблице 3.

Пример 2. Определение концентрации препарата БСАТ, при которой 50% CD3- и CD19- рецепторов находятся в комплексе с антителом, с использованием МКПК условно здоровых доноров

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

Кровь условно здоровых доноров стерильно отбирали в вакутейнеры с гепарином (Greiner Bio-One, кат. № 455084). Кровь разбавляли равным объемом фосфатно-солевого буфера (ЭКО сервис, кат. № В-60201), наслаивали на градиент плотности фиколла ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$) («ПанЭко», кат. № P052) и центрифугировали в течение 30 минут при 800 g при температуре $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. Собирали МКПК на границе фаз и дважды отмывали клетки изотоническим фосфатно-солевым буферным раствором. Осадок клеток ресуспендировали в 15 мл среды ДМЕМ/Ф12 (Sigma, кат. № D8900-10L) с 10% фетальной бычьей сыворотки (GE Healthcare, кат. № SV30160) и инкубировали 4 часа в культуральном флаконе (SPL Life Sciences Co, кат. № 70075) при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ для прикрепления моноцитов. По окончании инкубации собирали неприкрепленные клетки, клеточную суспензию центрифугировали, осадок клеток ресуспендировали в FACS буфере с добавлением раствора Fc Block в разведении 1:100 (BD PharmingenTM, кат. № 564220) для ингибирования неспецифического связывания Fc-рецепторов, экспонированных на мембране В-клеток. Приготовленную суспензию МКПК с концентрацией клеток $4 \cdot 10^6/\text{мл}$ вносили по 50 мкл ($2 \cdot 10^5$ клеток на лунку) в 96-луночный планшет с V-образным дном (Corning Inc, кат. № 3894).

Связывание БСАТ с CD19-позитивными мононуклеарными клетками периферической крови условно здоровых доноров.

К клеткам добавляли по 50 мкл раствора БСАТ клон 309_02_A08 в последовательных 3-кратных разведениях в FACS буфере с добавлением Fc Block 1:100 от 200 пМ до 0,003 пМ (финальные концентрации - от 100 до 0,0016 пМ). Инкубировали 60 минут при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. По окончании инкубации дважды отмывали клетки ледяным FACS буфером, осаждая клетки центрифугированием в течение 10 мин при 1300 об/мин и температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$. После этого осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл FACS буфера и добавляли антитела к экстраклеточной части человеческого рецептора CD19 (клон HD37), меченные FITC (Millipore milli-mark, кат. № FCMAB184F) в объеме 10

мкл, конечное разведение 1:150, инкубировали 30 минут при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ с последующей трехкратной отмывкой. Клетки фиксировали ресуспендированием в 250 мкл FIX-буфера (фосфатно-солевой буферный раствор с 1% раствором формалина). Интенсивность флуоресценции клеток в FITC-канале измеряли на цитометре Canto II. Для достоверности получаемых данных собирали не менее 50000 событий.

Связывание препарата БСАТ с CD3-позитивными мононуклеарными клетками периферической крови условно здоровых доноров

К клеткам добавляли по 50 мкл раствора БСАТ клон 309_02_A08 в последовательных 3-кратных разведениях в FACS буфере с добавлением Fc Block (1:100) от 8700 нМ до 0,04 нМ (финальные концентрации - от 2900 нМ до 0,01 нМ). Затем готовили раствор биотинилированного БСАТ с концентрацией 300 нМ и вносили в лунки с клетками по 50 мкл (финальная концентрация препарата 100 нМ). Инкубировали 60 минут при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. По окончании инкубации клетки дважды отмывали клетки ледяным FACS буфером, осаждая клетки центрифугированием в течение 10 мин при 1300 об/мин и температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$. Осадок клеток ресуспендировали в 100 мкл FACS буфера и добавляли конъюгат PE-Streptavidin (BD Pharmingen, кат. № 554061) в объеме 10 мкл (конечное разведение 1:200), инкубировали 30 минут при температуре $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ с последующей трехкратной отмывкой. Клетки фиксировали ресуспендированием в 250 мкл FIX-буфера (фосфатно-солевой буферный раствор с 1% раствором формалина). Интенсивность флуоресценции клеток в PE-канале измеряли на цитометре Canto II. Для достоверности получаемых данных собирали не менее 50000 событий.

Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo, Excel и GraphPad Prism 6.0 с использованием 4-х параметрической логистической функции дозозависимого ингибирования, и функции “constrain – shared value” для значений верхней и нижней асимптот и угла наклона сигмоидной кривой (hill slope). Определяли дозу полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и коэффициент достоверности аппроксимации функции (R^2).

Результаты.

Концентрация БСАТ, при которой выявляли 50% свободных CD19-рецепторов, и соответственно, 50% CD19-рецепторов находились в комплексе с антителом, варьировала от 0,02 до 0,06 нМ в зависимости от донора (фигура 3).

Концентрация БСАТ, при которой выявляли 50% свободных CD3-рецепторов, и соответственно, 50% CD3-рецепторов находились в комплексе с антителом, варьировала от 52,1 до 66,5 нМ в зависимости от донора (фигура 4).

Таблица 4. Концентрация препарата БСАТ, при которой 50% CD3- и CD19-рецепторов находятся в комплексе с антителом, с использованием МКПК условно здоровых доноров

	CD3 рецептор			CD19 рецептор		
	ГА	ПЕ	КН	ПЕ	КА	АК
IC ₅₀ , нМ	66.5	52.1	62.3	0.05	0.02	0.06

Пример 3. Определение Т-клеточно опосредованной цитолитической активности БСАТ в отношении CD19-позитивных клеток-мишеней опухолевых линий человека при использовании в качестве эффекторных клеток активированных МКПК условно здоровых доноров

Выделение и активация мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

Выделяли МКПК условно здоровых доноров проводили, как описано в примере 2. К 5 мл суспензии РВМС с концентрацией $2 \cdot 10^6$ кл/мл в среде ДМЕМ/Ф12 (Sigma, кат. № D8900-10L) с 10% фетальной бычьей сыворотки (GE Healthcare, кат. № SV30160) добавляли IL-2 (Abcam, кат. № ab155694) до конечной концентрации 5 нг/мл и магнитные частицы Dynabeads с иммобилизованными на них антителами к человеческим рецепторам CD3 и CD28 для активации Т-лимфоцитов человека (Gibco, кат. № 11131D) в объеме 65 мкл. Клетки инкубировали в течение 5 - 7 дней при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ в атмосфере $(5,0 \pm 0,5)\%$ CO₂ с ежедневным подсчетом количества клеток, при необходимости добавляли среду ДМЕМ/Ф12 (Sigma, кат. № D8900-10L), содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (GE Healthcare, кат. № SV30160) и IL-2 в концентрации 5 нг/мл.

Постановка метода.

Клетки-мишени человеческой линии Raji (ATCC® CCL-86™) дважды отмывали от культуральной среды изотоническим фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая клетки центрифугированием в течение 10 минут при 1300 об/мин и температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$. Осадок клеток ресуспендировали в изотоническом фосфатно-солевом буферном растворе и добавляли 10 мкл 1 mM раствор кальцеина (Molecular Probes, кат. № C3100MP) из расчета 10 мкл раствора кальцеина на 1 млн клеток и инкубировали в течение 40 минут. По окончании инкубации клетки трижды отмывали от свободного кальцеина изотоническим фосфатно-солевым буферным раствором. Доводили плотность клеточной суспензии до 2×10^5 клеток в мл средой ADCF-Mab (GE Healthcare Life Sciences, кат. № SH30349.02) и добавляли 1/100 объема 100X раствора пробенцида (Sigma-Aldrich, кат. № P8761-25G).

Активированные IL-2/CD3/CD28 Т-клетки осаждали центрифугированием в течение 10 минут при 1300 об/мин и температуре $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, однократно промывали изотоническим фосфатно-солевым буферным раствором. Осадок клеток ресуспендировали в среде ADCF-Mab и доводили клеточную суспензию до концентрации 4×10^6 клеток в мл.

Делали 12 последовательных 3-кратных разведения БСАТ клон 309_02_A08 от 100 до 0,0005 pM и каждый раствор вносили в трипликатах по 50 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (Corning Inc, кат. № 3599). Затем в лунки планшета с препаратом вносили по 50 мкл активированных IL-2/CD3/CD28 Т-клеток и по 50 мкл клеток Raji (соотношение Т-клеток к клеткам Raji 10:1). В лунки планшета вносили также 1) клетки-мишени, меченные кальцеином (контроль спонтанного выхода кальцеина); 2) клетки-мишени, меченные кальцеином, с эффекторными клетками (лизис клеток, обусловленный цитолитической активностью эффекторных клеток без добавления препарата 309_02_A08); 3) клетки-мишени, меченные кальцеином, для последующей обработки раствором тритона X100 (Sigma-Aldrich, кат. № X100-1L). Инкубировали 3 часа при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Через 3 часа в лунки с клетками Raji, меченными кальцеином, вносили по 20 мкл 10% раствора Тритона X100, для полного лизиса клеток (MFI_max) и инкубировали 1 час при температуре $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$.

По окончании инкубации планшет центрифугировали 5 минут при 1300 об/мин и с помощью многоканальной пипетки аккуратно, чтобы не захватить клетки, переносили по 120 мкл супернатанта из каждой лунки в планшеты из непрозрачного белого пластика (Corning Inc, кат. № 3912) для измерения флуоресценции. Флуоресценцию измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200 при длине возбуждения 488 нм и эмиссии при 518 нм. Полученные данные экспортировали в программу Excel и рассчитывали эффективность лизиса в каждой экспериментальной лунке по формуле:

$$\% \text{ специфичного лизиса} = (\text{MFI}_{\text{exp}} - \text{MFI}_{\text{min}}) / (\text{MFI}_{\text{max}} - \text{MFI}_{\text{min}}) * 100\%.$$

Дальнейшую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 6.0 с использованием 4-х параметрической логистической функции и функции “constrain – shared value” для значений верхней и нижней асимптот и угла наклона сигмоидной кривой (hill slope). Определяли полумаксимальную эффективную дозу (EC_{50}) и коэффициент достоверности аппроксимации функции (R^2).

Результаты.

Препарат БСАТ проявлял цитолитическую активность в отношении CD19-позитивных клеток-мишеней человеческой линии Raji при использовании в

качестве эффекторных клеток МКПК условно здоровых доноров. EC50 варьировала от 1,3 рМ до 3,1 рМ, а процент максимального лизиса клеток-мишеней – от 41 до 100, в зависимости от донора. Результаты экспериментов представлены на фигуре 5.

Таблица 5. Концентрация препарата БСАТ, при которой определяли 50% эффективность цитолиза CD19-позитивных клеток человеческой линии Raji при использовании активированных МКПК условно здоровых доноров в качестве эффекторных клеток.

	EC50 БСАТ, рМ	% максимального лизиса
Донор 1	2,0	41
Донор 2	0,13	60
Донор 3	1,9	100
Донор 4	1,5	95
Донор 5	1,3	48

Пример 4. Определение Т-клеточно опосредованной активности БСАТ с использованием клеток коммерческой репортерной линии Jurkat-LUCIA-NFAT (Promega) в качестве эффекторных клеток

Описание метода.

Клеточную линию Raji (ATCC®CCL-86™) культивировали согласно рекомендациям производителя. Клетки-мишени человеческой линии Raji (ATCC® CCL-86™) дважды отмывали от культуральной среды изотоническим фосфатно-солевым буферным раствором, осаждая клетки центрифугированием в течение 10 минут при 1300 об/мин и температуре $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Осадок клеток ресуспендировали в среде для выполнения теста (RPMI-1640 без фенолового красного (Lonza, кат № BE12918F) с 5 % фетальной бычьей сыворотки (GE Healthcare, кат. № SV30160)). Готовили 5 мл клеточной суспензии с концентрацией 2×10^5 клеток в мл.

Клеточную линию Jurkat-Luc-NFAT (эффektorные клетки) (Promega, кат. № jk1-nfat) размораживали на водяной бане при температуре $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Содержимое ампулы переносили в центрифужную пробирку, содержащую 5 мл среды для выполнения теста, и центрифугировали 5 минут при 1000 об/мин. Осадок клеток ресуспендировали в среде для выполнения теста. Делали 5 мл клеточной суспензии с концентрацией $2,5 \times 10^6$ клеток/мл.

Готовили 11 последовательных 3-кратных разведений БСАТ клон 309_02_A08 от 1200 pM до 0,02 pM (финальные концентрации - от 400 до 0,007 pM) в среде для выполнения теста.

В лунки A2-H12, U-образного 96-луночного культурального планшета (Corning Inc, кат. № 3799) вносили растворы препарата в трипликатах по 40 мкл, начиная с минимальной концентрации. В лунки A1-H1 вносили по 40 мкл среды. Смешивали подготовленные суспензии клеток Raji и Jurkat-Luc-NFAT и вносили по 80 мкл во все лунки (A1-H12) планшета. Планшет инкубировали 18 часов при температуре $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

По окончании инкубации содержимое лунок планшета ресуспендировали и переносили по 40 мкл суспензии в лунки 96-луночного плоскодонного планшета из белого непрозрачного пластика (Corning Inc, кат. № 3912). Затем в каждую лунку вносили по 25 мкл подогретого до комнатной температуры $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ субстрата QUANTI-Luc™ Lucia™ (Invivogen, кат. № rep-qlc1, rep-qlc2). Содержимое лунок аккуратно перемешивали. Интенсивность хемилюминесценции измеряли на планшетном спектрофотометре Tecan Infinite M200.

Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6.0. Зависимость уровня хемилюминесценции от десятичного логарифма концентрации препарата БСАТ аппроксимировали уравнением 4-параметрической логарифмической функции. Автоматически определяли EC_{50} и R^2 .

Результаты.

При совместном культивировании клеточной линии Raji с клетками Jurkat-Luc-NFAT в присутствии БСАТ наблюдали дозозависимое увеличение сигнала хемилюминесценции, EC_{50} составила 2,3 pM. Результаты эксперимента представлены на Фиг.6.

Пример 5. Оценка функциональной активности и специфичности биспецифических антител путем анализа активации клеток линии Jurkat

Активацию Т-клеток измеряли с использованием клеток линии Jurkat с репортерным геном, закупленных у компании Promega. Данные об активности (EC_{50}) 14 биспецифических IgG-подобных антител к CD3 приведены в таблице 1, а полные кривые зависимости доза-ответ представлены на Фиг. 7. Исследуемые биспецифические IgG-подобные молекулы титровали и оценивали их способность индуцировать транскрипцию NFAT в эффекторных клетках линии Jurkat в присутствии или в отсутствие клеток-мишеней, экспрессирующих CD19 (т.е. оценивали мишень-зависимую и мишень-независимую активацию). Все биспецифические IgG-подобные молекулы

демонстрировали высокую мишень-зависимую активность в этом анализе. Также приведены данные для применявшихся в качестве положительных контролей двух различных биспецифических IgG-подобных молекул, в которых ОКТЗ используется как связывающийся с CD3 фрагмент (контроли 1 и 2). В качестве негативного контроля использовали BiM8_D1.3 (в котором одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) антитела к CD3 замещен на аналогичный фрагмент антитела к лизоциму куриного яйца D1.3). Для этого анализа используются модифицированные путем генной инженерии клетки линии Jurkat, стабильно экспрессирующие репортерный ген люциферазы, регулируемый элементом ответа ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT). Совместное культивирование этих репортерных клеток с экспрессирующими CD19 клетками линии Raji в присутствии функциональных биспецифических антител к CD3/CD19 приводит к активации Т-клеточного рецепторного комплекса и увеличению активности люциферазы, обусловленному активацией элемента ответа NFAT.

Готовые к использованию после размораживания клетки линии GloResponse™ NFAT-Re-luc2 Jurkat (каталожный номер компании Promega CS176403) были разморожены в течение 2 минут на водяной бане при температуре 37°C и осторожно перенесены в предварительно нагретую среду для анализа RPMI 1640 (каталожный номер компании Gibco 22400) объемом 4 мл с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (каталожный номер компании HyClone SH30070.03). По 25 мкл ресуспендированных клеток было помещено в каждую лунку белого 96-луночного планшета для анализа (каталожный номер компании Costar 3917), итоговое количество клеток линии Jurkat в каждой лунке составило 1×10^5 . Суспензия клеток линии Raji была приготовлена в концентрации 2×10^6 /мл в среде для анализа, и по 25 мкл суспензии было добавлено в лунки, содержащие репортерные клетки линии Jurkat (количество клеток линии Raji в каждой лунке составило 5×10^4). Было добавлено по 5,5 мкл исследуемой биспецифической IgG-подобной молекулы (или используемого в качестве контроля растворителя, если применимо), и образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 5 часов (статический инкубатор, 5% CO₂). По завершении инкубации планшеты для анализа были оставлены при комнатной температуре (21°C) на 15 минут, после чего в лунки было добавлено по 55 мкл реагента Bio-Glo (каталожный номер компании Promega G7940, реагент был растворен в соответствии с инструкцией производителя). Наконец, планшеты инкубировали в течение 5 минут (21°C), и измеряли люминесценцию при помощи прибора BMG Pherastar.

Низкий уровень мишень-независимой активации клеток линии Jurkat является многообещающим свойством всех клонов предложенных биспецифических IgG-подобных молекул.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 (>309_01_A02)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMAQEVQLV
ESGG
GLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRF
TISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSSRIQAGMDVWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGSGG
GASN
FMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGTIASTYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDR
FSGS
IDSSSNSASLTISGLKTEDAADYFCQSYDSNNRVFGGGTKVTVLGQPAAGGGGSQVQL
QQSG
AELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWP GDGDTNYNGKFK
GKAT
LTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSSASA
AVECPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPR
EEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:2 (>309_01_G04)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMAQEVQLV
ESGG
GVVQPGRSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR
FTTSR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCAKEDYYGGYFDYWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGG
SGGGA
SNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVP
DRFS
GSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQAVFGGGTKVTVLGQPAAGGGGSQ
VQLQ
QSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWP GDGDTNYNG
KFKG
KATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSS
ASAAVE
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKT
KPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:3 (>309_01_G12)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLV
QSGA
EVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQ
GRVT
MTRDTSISTAYMELSRRLSDDAAVYYCARPSRYSNYVDWGQGTSTVTVSSGGGGSGGG
GSGGG
ASNFMILTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTTVIYDDDQRPSG
VPDR
FSGSIDRSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDNTNPWVFGGGTKLTVLGQPAAAGGGG
SQVQL
QQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYN
GKFK
GKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTV
SSASAA
VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNA
KTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:4 (>309_02_A08)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLV
QSGA
EVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQG
RVTM
TRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCARTGKNYYYYGMDAWGQGTSTVTVSSGGGGSG
GGSG
GGASNFMILTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIARNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQR
SGVP
DRFSASIDSSNSASLTISGLQTEDEADYYCQSYDTSNHVVFGGGTKLTVLGQPAAAGG
GGSQV
QLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTN
YNGK
FKGKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTV
TVSSASA
AVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDG
EVHN
AKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRE
PQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKL
TVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:5 (>309_02_F01)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASN LVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMAQVQLV
QSGA
EVKKPGASVKVSKKASGYTFTGYMHVVRQAPGGGLEWMGWNPNSGGTNYAQKFQ
GRVT
MTRDTSISTAYMELSSLRSED TAVYYCARDKRYSSGWYENWGQGT LVTVSSGGGGSG
GGSG
GGASNFM LTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQR P
SGVP
DRFSGSIDISSNSASLTISGLKTEDEADYFCQSYDSSSVIFGGGTKLTVLGQPAAAGGGGS
QVQLQ
QSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGGLEWIGQIWP GDGDTNYNG
KFKG
KATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT SVTVSS
ASAAVE
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKT
KPREEQFNSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:6 (>309_04_A04)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASN LVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMAQVQLQ
QWG
AGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEISRSGTTNYNSSLKSRVT
ISVDTS
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARATRNGVFDYWGQGT LVTVSSGGGGSGGGGGSGGGA
SNFM
LTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPSTVIYEDNQRPSGVPDRFS
GSID
SSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSGVVFGGGTKLTVLGQPAAAGGGGSQVQLQQS
GAELV
RPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGGLEWIGQIWP GDGDTNYNGKFKGKAT
LTAD
ESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT SVTVSSASAAVEC
PPCPAP
PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQF
NSTFRVVS VLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:7 (>309_05_B08)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASN LVS
GIPPRF

SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLV
ESGGG
LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRF
TISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAISTVTRPDFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGG
GASNF
MLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIARNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDR
FSGSI
DSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNQRVFGGGTKVTVLGQPAAGGGGSQVQ
LQQSG
AELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFK
GKAT
LTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSSASA
AVECPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:8 (>400_01_D06)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLV
QSGA
EVKKPGSSVKVSCCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRV
TITAD
ESTSTAYMEVRSLSDDTAVYYCVRDRGDYGDITYFDYWGQGTLLTVSSGGGGSGGG
GSGGG
ASNFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSAPTIVYEDNHRPSG
VPDR
FSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSDRVFGGGTKVTVLGQPAAGGGGS
QVQL
QQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYN
GKFK
GKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTV
SSASAA
VECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VHNA
KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:9 (>400_03_H07)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLV
ESGG

GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSSYIYYADSVKGRF
TISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGIAAAGFDYWGGTGLTVTVSSGGGGSGGGGSGG
GASN
FMLTQPHSVSESPGKTVTISCARSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNRRPSGVPD
RFSGS
FDSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNRVFGGGTKLTVLGQPAAAGGGGSQVQL
QQSG
AELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFK
GKAT
LTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSSASA
AVECPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:10 (>410_01_C03)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLQ
QWG
AGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGGINHSGSTNYPNPSLKSRVT
ISVDT
KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARATRNAGFDYWGGTGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGA
SNFM
LTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGRIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDRFS
GSID
SSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGGTQLTVLGQPAAAGGGGSQVQLQQ
SGAE
LVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGK
ATLT
ADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSSASAA
VECPPC
PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPRE
EQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:11 (>410_01_C09)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIKGGSGGAMAQVQLV
QSGA
EVKKPGASVKVSCASGYTFTSYMYWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGGTNYAQKFQ
GRVT

MTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARPSRYSNYVDWQGTLTVTVSSGGGGSGGGG
SGGG
ASNFMILTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRP
SG
VPDR
FSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSRWIWSGGGKVTVLGQPAAAGGGG
SQVQL
QQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTN
YNG
GKFK
GKATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT
SVTV
SSASAA
VEPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVE
VHNA
KTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQ
PREP
QVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY
SKLT
VDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:12 (>418_01_C05)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMA
EVQLV
ESGG
GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSYINSRSSTIYYADSVKGRF
TISR
D
NAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAKDKPLSGYAFDIWGQGTTTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGAS
NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNFVQWYQQRPGRAPTIVIFDDDQRP
SGV
PD
RFS
GSIDRSSDSASLSISGLKTEDEADYYCQSYATRTQGVVFGGGTKVTVLGQPAAAGGGGS
QVQLQ
QSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGQGLEWIGQIWPGDGDTN
YNG
KFKG
KATLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGT
SVTVSS
ASA
AVE
CPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE
VH
NAKT
KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP
QV
YTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLT
VD
KSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:13 (>418_03_E12)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMAQVQLV
ESGG
GVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRF
TISR
DN
AKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCARRSFSSVFADYWGQGT
LTVTVSSGGGGSGGGGSGG
GASNF

MLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSRGSIASNYVQWYQQRPGRAPTIVIFDDDQRPSPGVPDR
FSGSI
DRSSDSASLRISGLKTEDEADYYCQSYATRSQSVVFGGGTKLTVLGQPAAAGGGGSQV
QLQQS
GAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPBGDGTNYNGKF
KGKA
TLTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSSAS
AAVECP
PCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKP
REEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT
LPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:14 (>418_03_H01)

DIQLTQTPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGD SYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLS
GIPPRF
SGSGSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGTKLEIKGGSGGAMAQVQLQ
QWG
AGLLKPSETLSLTCAVYGGSFYRYYWSWIRQSPGKGLEWIGEIKHRGRTNYPNLSKSRV
TMSVDT
SKNQFSLQLRSVTAADTAVYYCARVYSSGWFSYWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGG
ASNF
MLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIARNYVQWYQQRPGSAPTTVIYEDNQRPSGVPDR
FSGSI
DSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDGSNWVFGGGTKVTVLGQPAAAGGGGSQVQL
QQSG
AELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPBGDGTNYNGKFK
GKAT
LTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTSTVTVSSASA
AVECPP
CPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK
TKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:15 (шарнирная область)

VECPPCP

SEQ ID NO:16 (Fc-фрагмент IgG2 человека)

APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQV
YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 17 (линкер 1)

GGSGGAMA

SEQ ID NO: 18 (линкер 2)

GGGGSGGGGSGGGAS

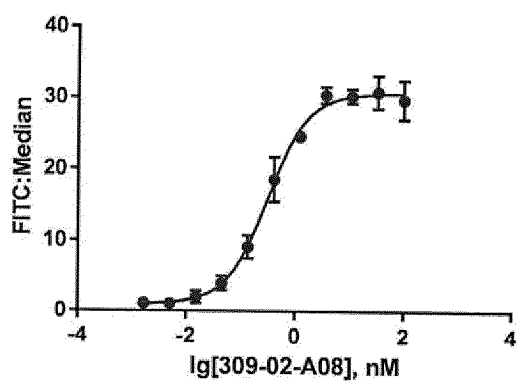
SEQ ID NO: 19 (линкер 3)

AAAGGGGS

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белковая молекула, способная связывать рецепторный комплекс CD3, содержащая по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент, включающий переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, отличающаяся тем, что определяющие комплементарность участки тяжелой цепи HCDR1, HCDR2 и HCDR3 и определяющие комплементарность участки легкой цепи LCDR1, LCDR2 и LCDR3 выбраны из группы, состоящей из вариантов 1-14, приведенных в таблице 2.
2. Белковая молекула по п.1, которая моновалентно и специфически связывает CD3, расположенный на Т-лимфоцитах человека.
3. Белковая молекула по п.1, где LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменном домене легкой цепи, специфичном по отношению к CD3, идентичны LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащимся в последовательности антитела, выбранного из списка: >309_01_A02; >309_01_G04; >309_01_G12; >309_02_A08; >309_02_F01; >309_04_A04; >309_05_B08; >400_01_D06; >400_03_H07; >410_01_C03; >410_01_C09; >418_01_C05; >418_03_E12; >418_03_H01.
4. Белковая молекула по п.1, где HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменном домене тяжелой цепи, специфичном по отношению к CD3, идентичны HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащимся в последовательности антитела, выбранного из списка: >309_01_A02; >309_01_G04; >309_01_G12; >309_02_A08; >309_02_F01; >309_04_A04; >309_05_B08; >400_01_D06; >400_03_H07; >410_01_C03; >410_01_C09; >418_01_C05; >418_03_E12; >418_03_H01.
5. Белковая молекула по любому из пп.1-4, которое является частью биспецифической антигенсвязывающей молекулы.
6. Белковая молекула по любому из пп.1-5, которая содержит вторую антигенсвязывающую полипептидную конструкцию, которая моновалентно и специфически связывает CD19, расположенный на В-лимфоцитах человека.
7. Белковая молекула по любому из пп.1-6, последовательность которой включает (а) первый домен, включающий антигенсвязывающий участок молекулы по любому из пп.1-5, и (б) второй домен, содержащий антигенсвязывающий участок цепи иммуноглобулина или антитела, который специфически распознает антиген CD19 В-клеток человека, причем домены, формирующие антигенсвязывающие участки, расположены в следующем порядке: VLCD3-VHCD19-VHCD19-VLCD3.
8. Белковая молекула по любому из пп.1-7, которая дополнительно содержит Fc фрагмент.
9. Белковая молекула по любому из п.1-8, которая способна индуцировать активацию Т-клеток в формате биспецифического антитела.
10. Белковая молекула по любому из пп.1-9, аминокислотная последовательность которой включает в себя последовательности, выбранные из списка SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14.

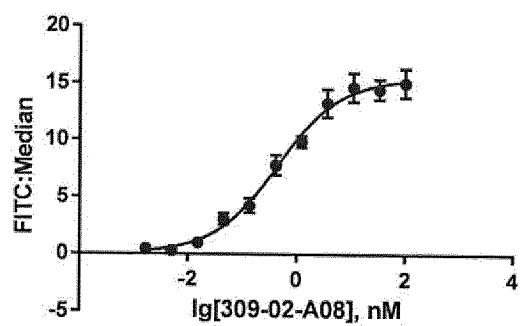
11. Применение молекулы по любому из пп.1-10 для создания лекарственного средства для лечения злокачественных заболеваний В-клеточной природы или истощения В-клеток.
12. Применение по п. 11, где лекарственное средство включает молекулу по любому из пп.1-10 в эффективном количестве, и необязательные нейтральные носители из круга традиционно применяющихся в композициях этого назначения.
13. Применение по п.11, где злокачественное заболевание В-клеточной природы выбрано из острого лимфобластного лейкоза и В-клеточных лимфом.
14. Применение по п. 13, где заболевание проходит в рефрактерной или рецидивирующей форме.



A

Bottom	1.015
Top	30.71
LogEC50	-0.5041
HillSlope	1.149
EC50	0.3132
R square	0.9858

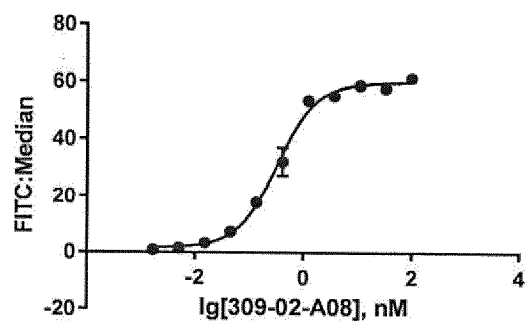
Фиг. 1 (А)



Б

Top	15.46
LogEC50	-0.3515
HillSlope	0.7472
EC50	0.4451
R square	0.9817

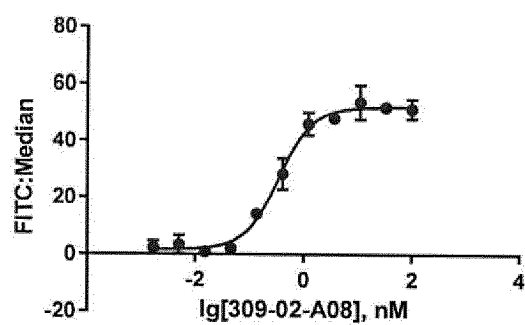
Фиг. 1 (Б)



B

Bottom	1.525
Top	59.87
LogEC50	-0.4897
HillSlope	1.185
EC50	0.3238
R square	0.9912

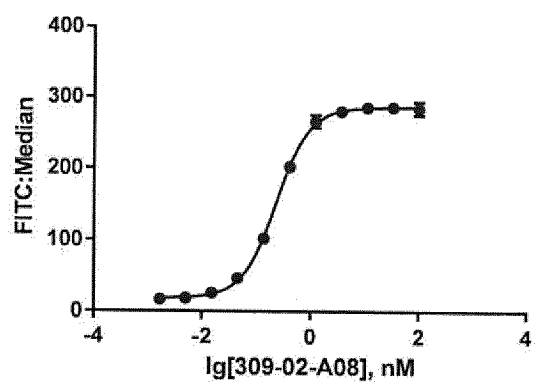
Фиг. 1 (B)



Г

Bottom	1.626
Top	52.06
LogEC50	-0.4560
HillSlope	1.398
EC50	0.3499
R square	0.9807

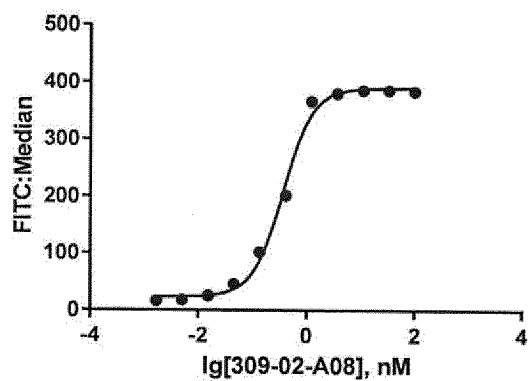
Фиг. 1 (Г)



Д

Bottom	18.41
Top	286.8
LogEC50	-0.6279
HillSlope	1.408
EC50	0.2355
R square	0.9988

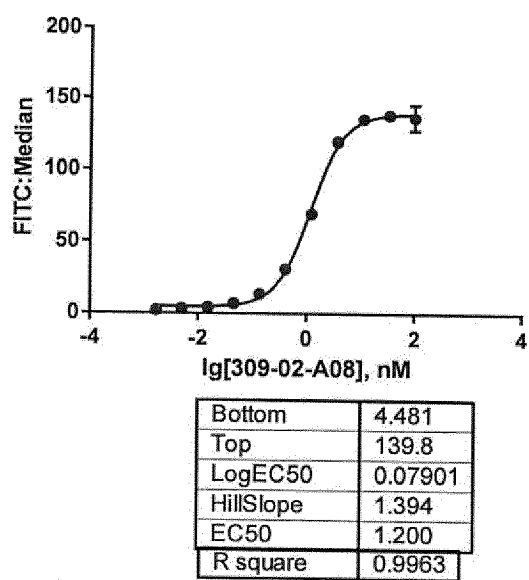
Фиг. 1 (Д)



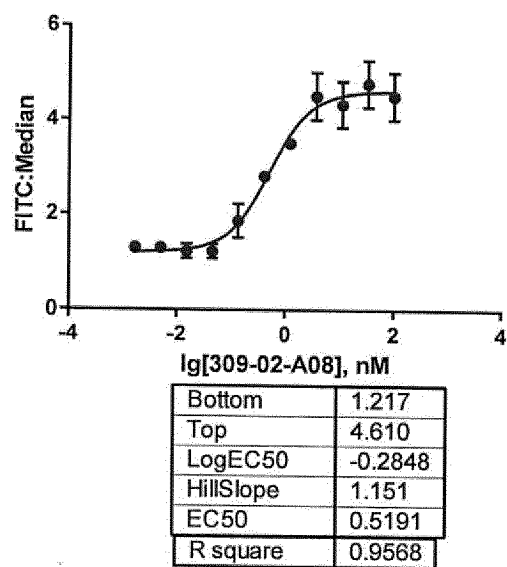
Е

Bottom	23.92
Top	390.6
LogEC50	-0.4314
HillSlope	1.571
EC50	0.3704
R square	0.9947

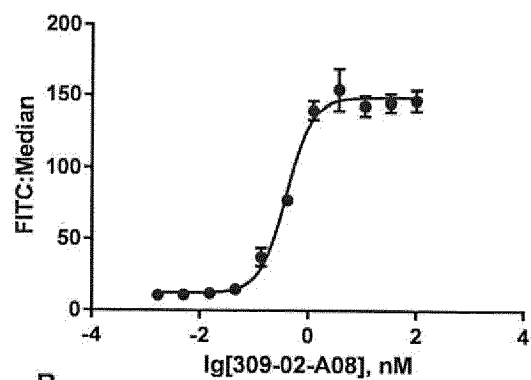
Фиг. 1 (Е)



Фиг. 2 (А)



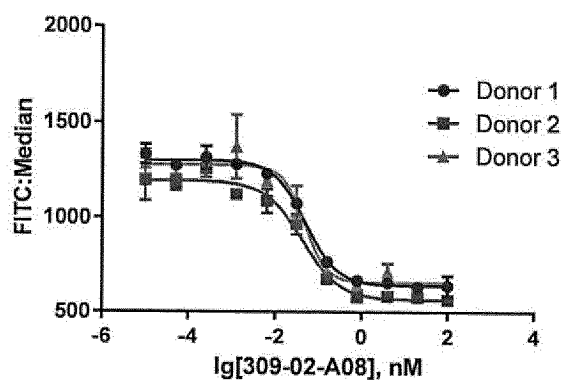
Фиг. 2 (Б)



B

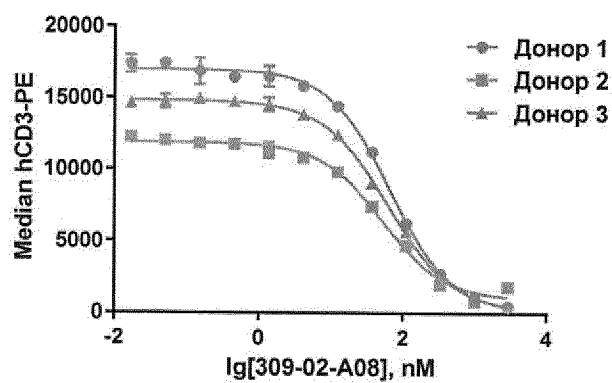
Bottom	12.55
Top	148.8
LogEC50	-0.4058
HillSlope	1.816
EC50	0.3928
R square	0.9871

Фиг. 2 (B)



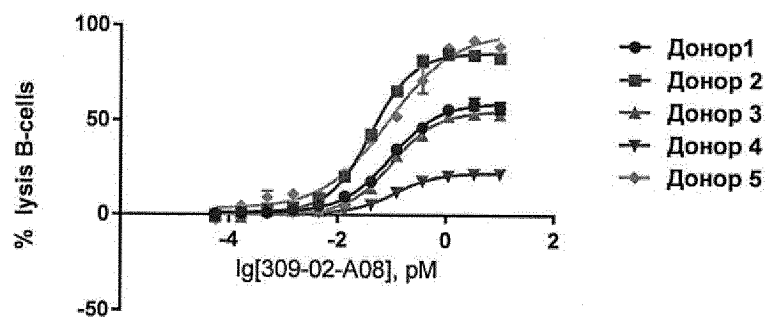
	Donor 1	Donor 2	Donor 3
Bottom	640.4	565.4	655.9
Top	1301	1195	1276
LogIC50	-1.289	-1.364	-1.312
HillSlope	-1.188	-1.012	-1.739
IC50	0.05136	0.04324	0.04871
	Donor 1	Donor 2	Donor 3
R square	0.9917	0.9742	0.9535

Фиг. 3



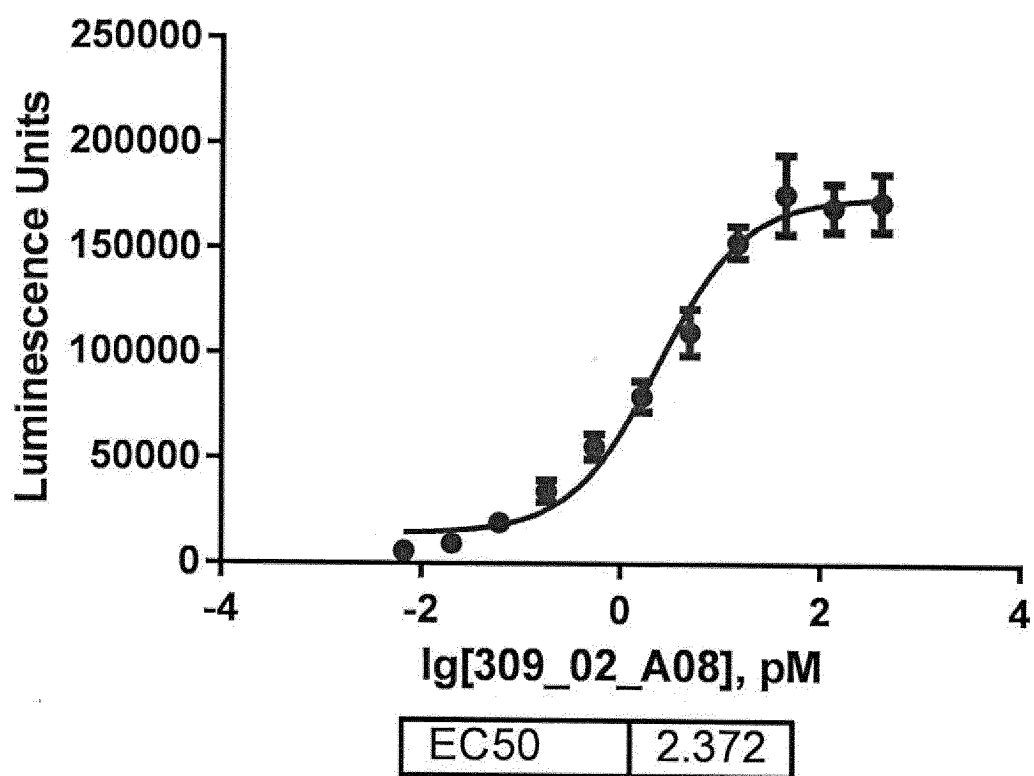
	Донор 1	Донор 2	Донор 3
Bottom	99.15	947.5	147.8
Top	16984	11858	14844
LogIC50	1.823	1.717	1.794
HillSlope	-1.023	-1.023	-0.9638
IC50	66.47	52.06	62.28
	Донор 1	Донор 2	Донор 3
R square	0.9967	0.9917	0.9982

Фиг. 4

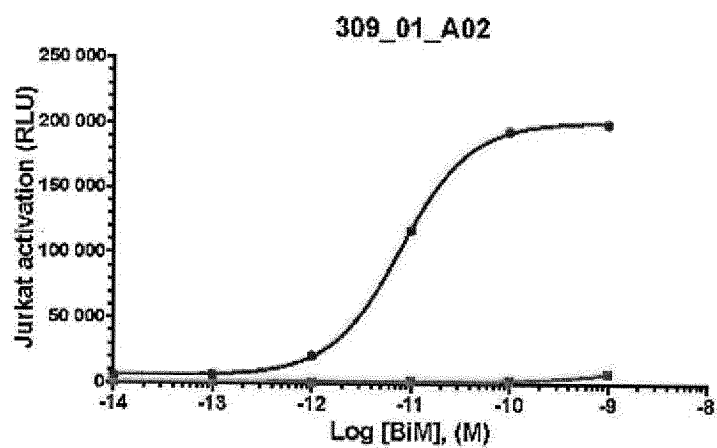


	Донор1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
Bottom	1.119	1.051	-0.01028	0.7708	2.884
Top	59.46	85.92	55.00	22.22	96.41
LogEC50	-1.031	-1.385	-0.9967	-0.9466	-1.070
HillSlope	0.9845	1.129	1.057	1.162	0.7238
EC50	0.09304	0.04120	0.1008	0.1131	0.08517
	Донор1	Донор 2	Донор 3	Донор 4	Донор 5
R square	0.9958	0.9976	0.9965	0.9935	0.9873

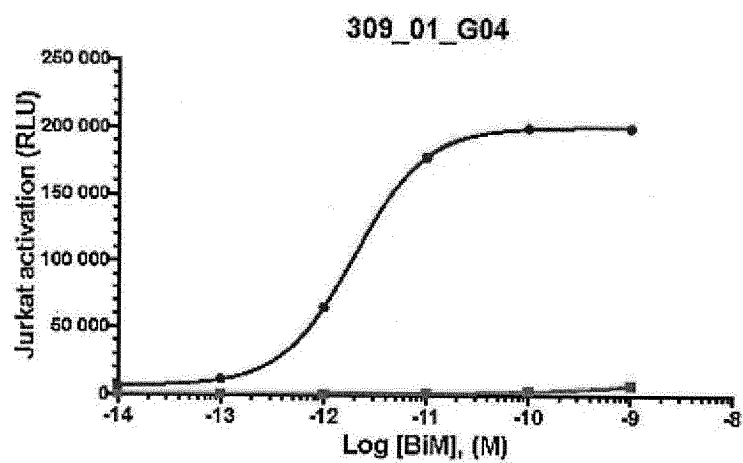
Фиг. 5



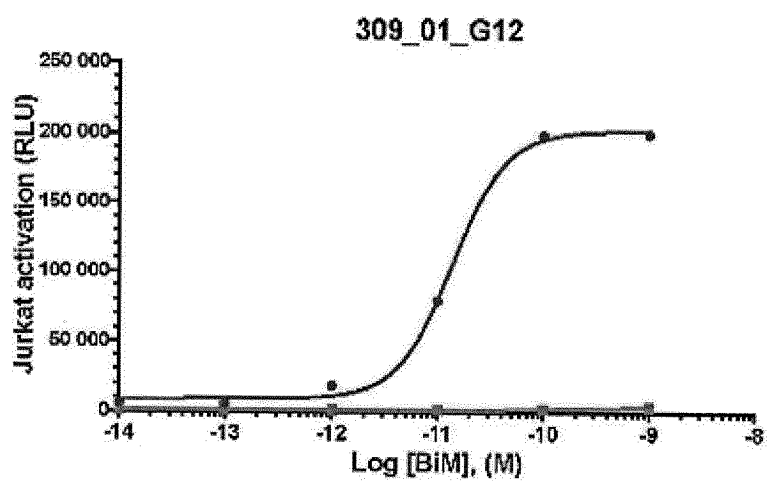
Фиг. 6



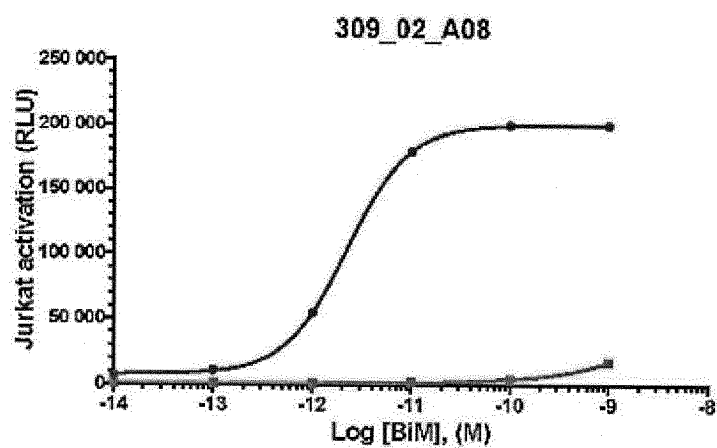
Фиг. 7 (А)



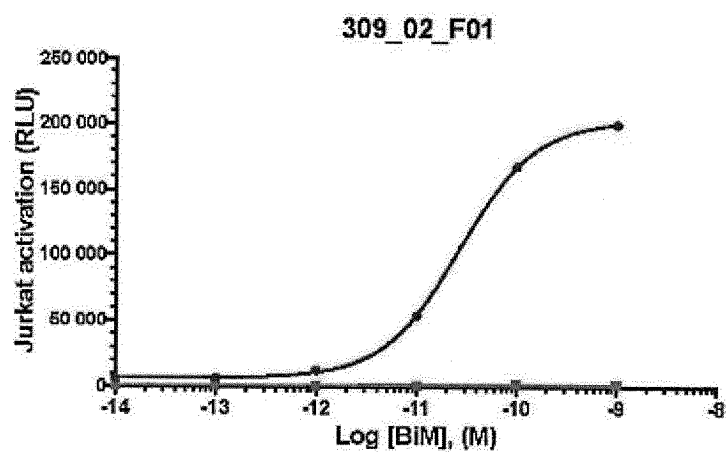
Фиг. 7 (В)



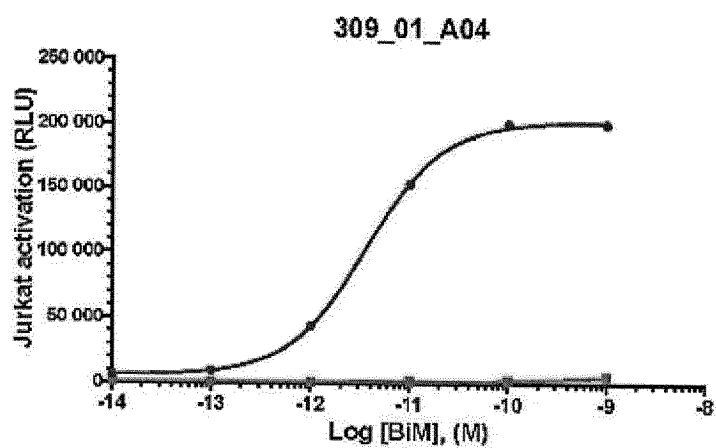
Фиг. 7 (C)



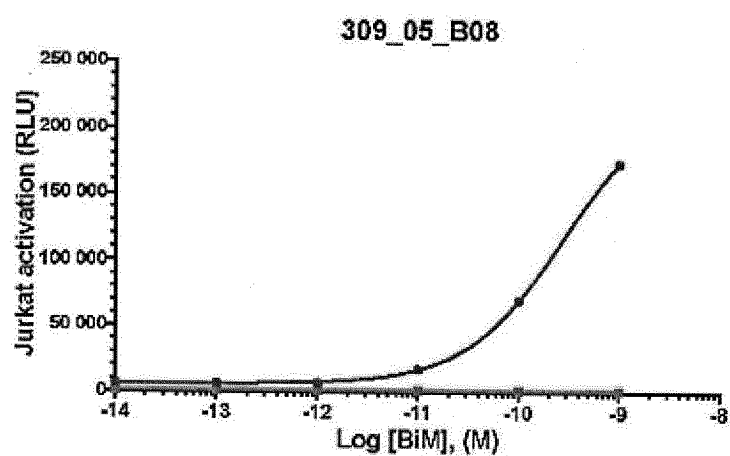
Фиг. 7 (D)



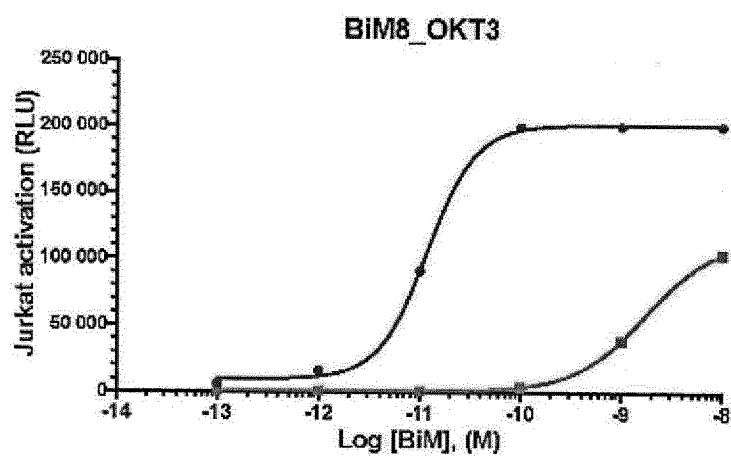
Фиг. 7 (E)



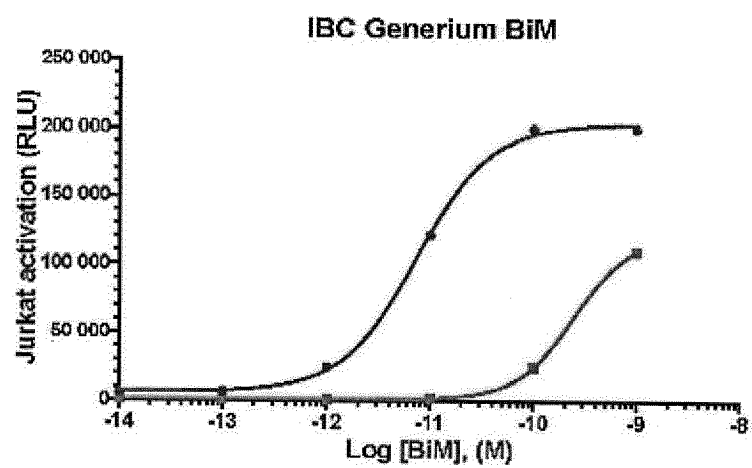
Фиг. 7 (F)



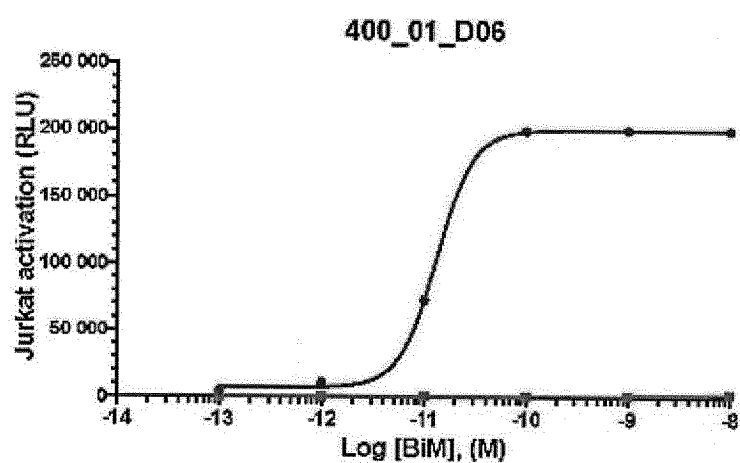
Фиг. 7 (G)



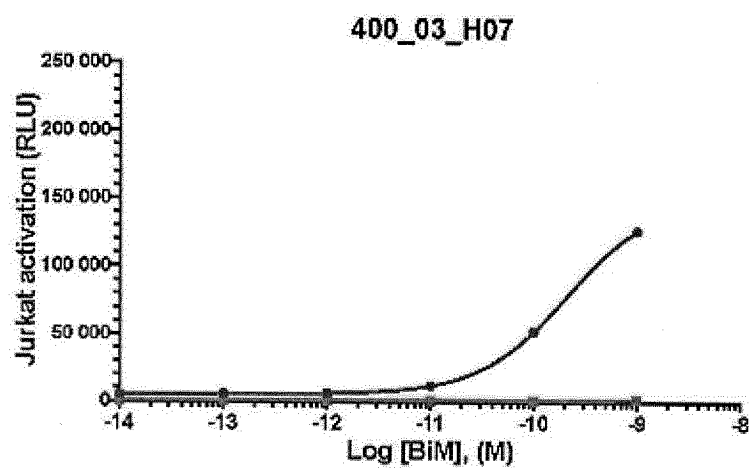
Фиг. 7 (H)



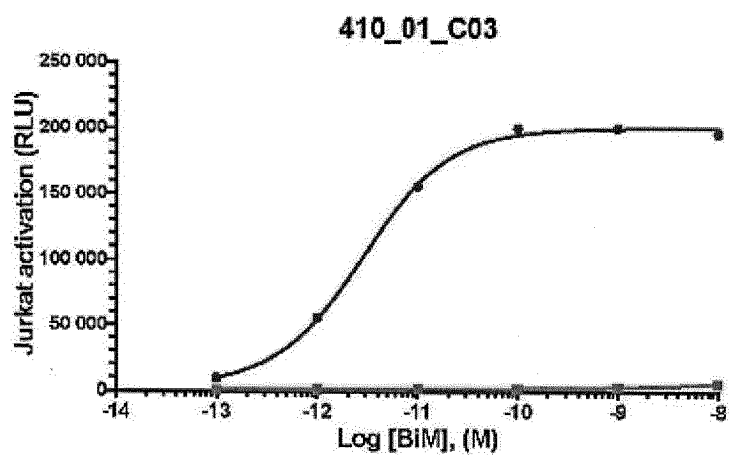
Фиг. 7 (I)



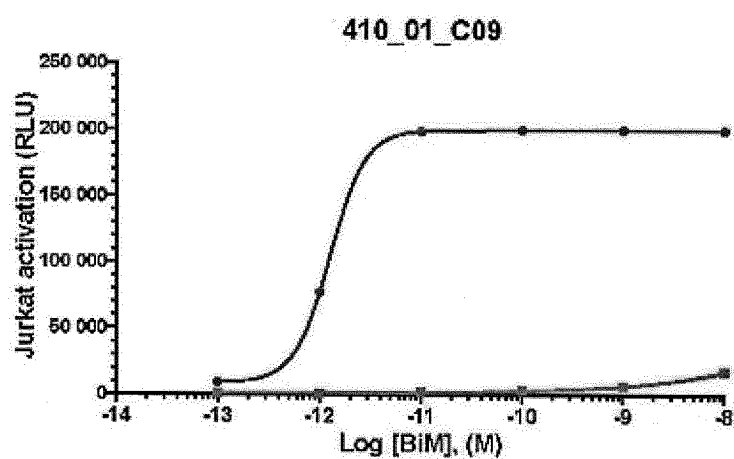
Фиг. 7 (J)



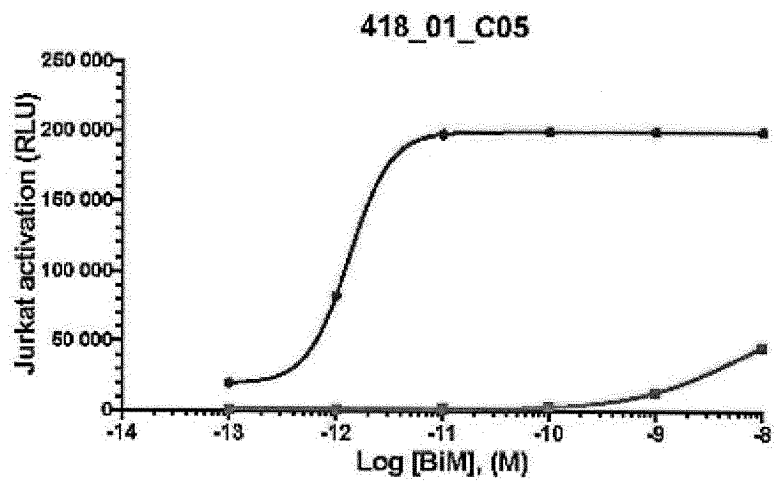
Фиг. 7 (К)



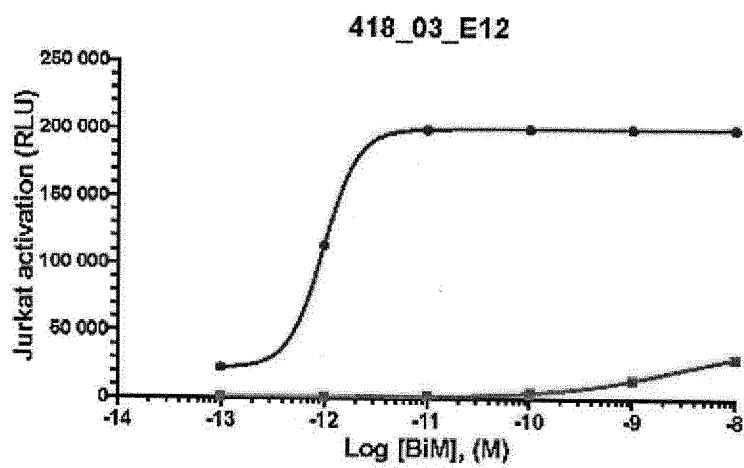
Фиг. 7 (L)



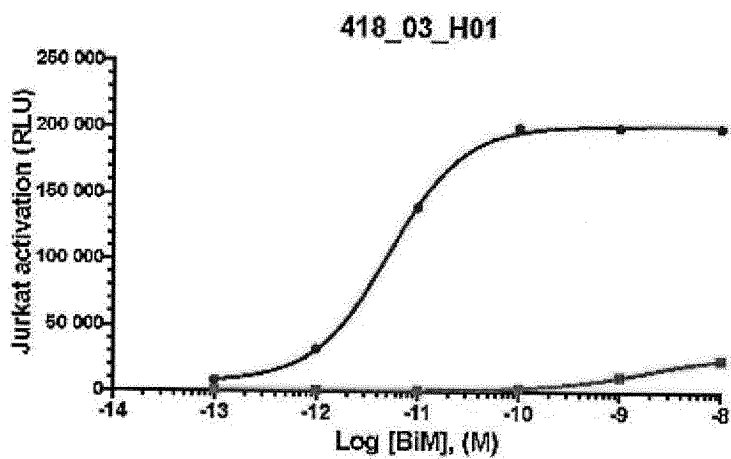
Фиг. 7 (M)



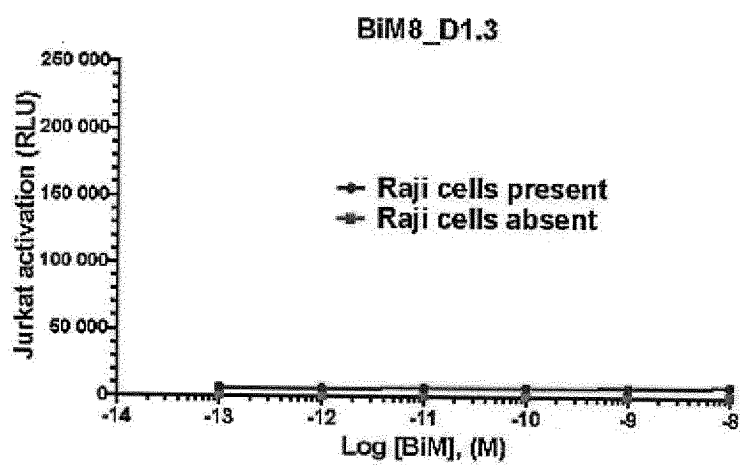
Фиг. 7 (N)



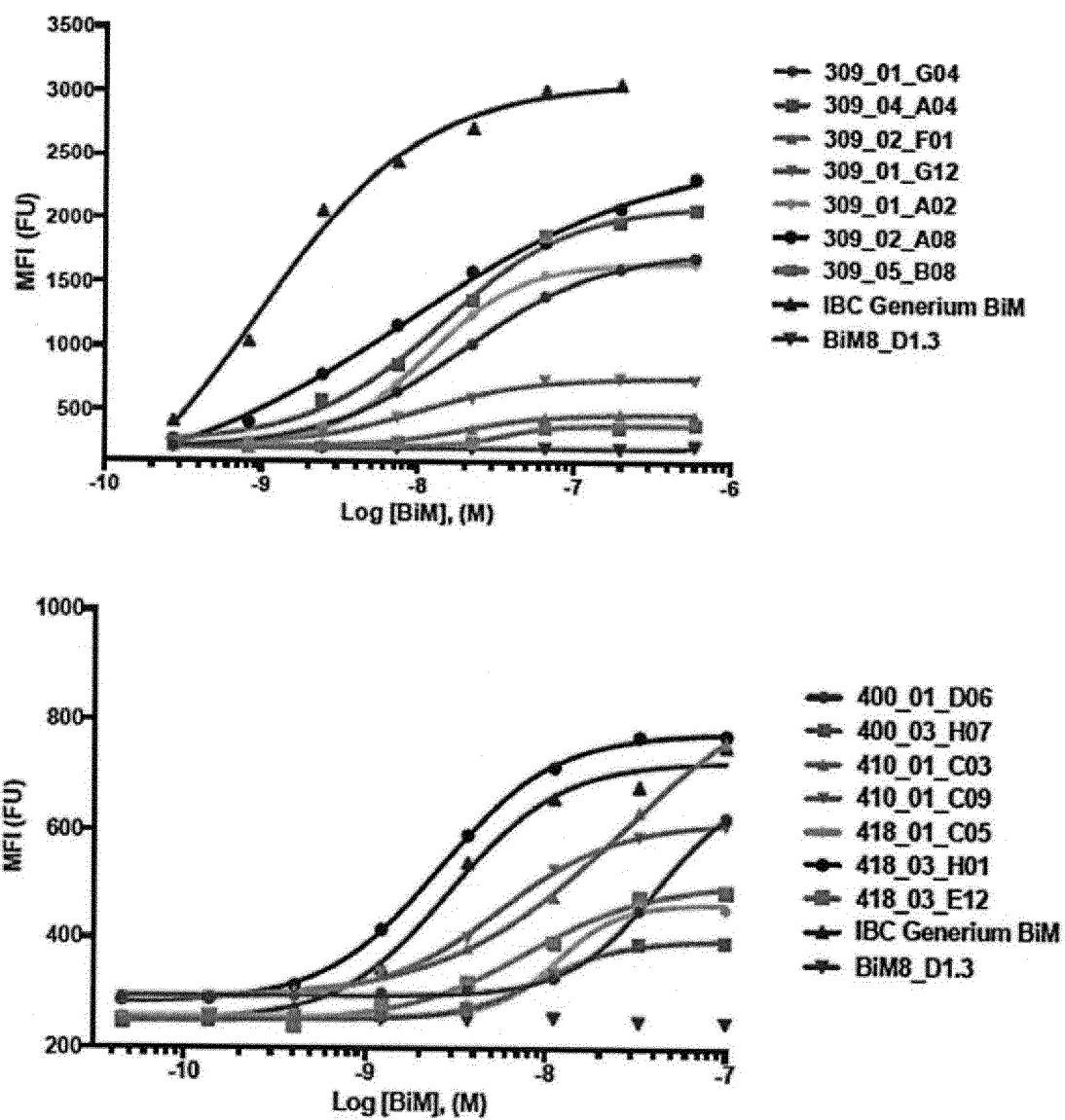
Фиг. 7 (O)



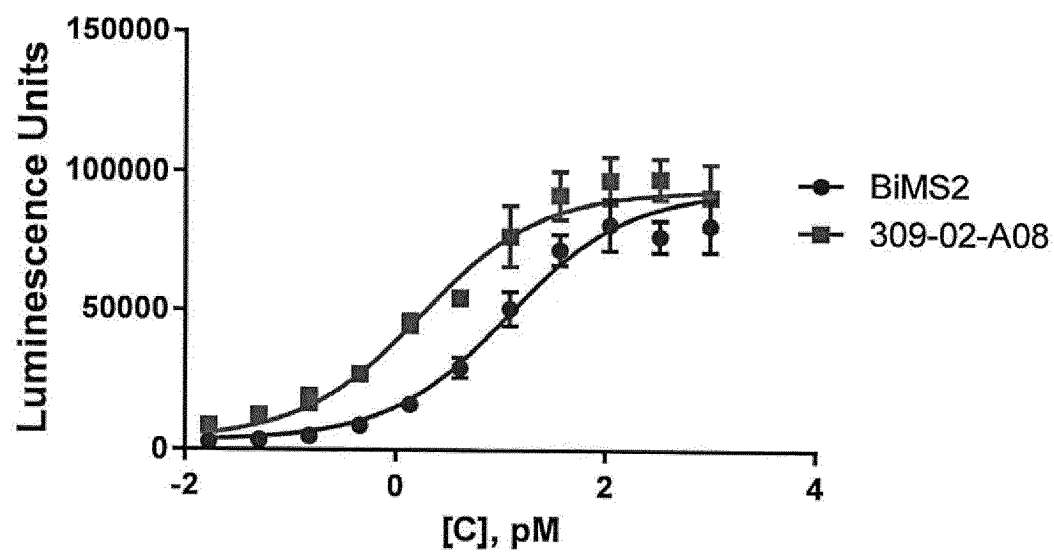
Фиг. 7 (P)



Фиг. 7 (Q)

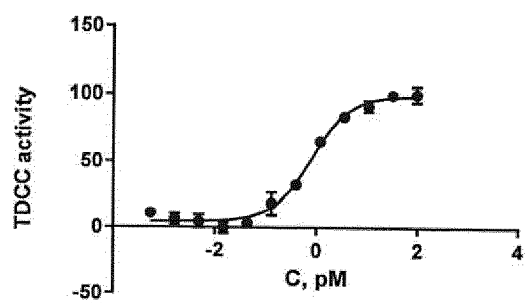


Фиг. 8.



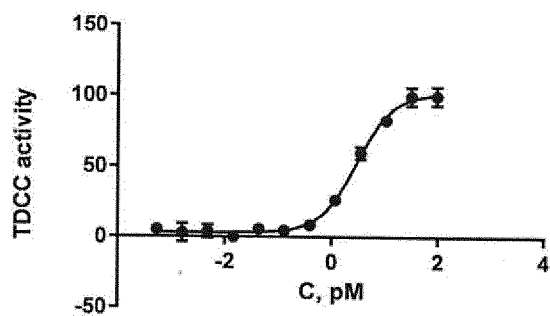
	BiMS2	309-02-A08
Bottom	3344	3344
Top	93279	93279
LogEC50	1.076	0.2445
HillSlope	0.7529	0.7529
EC50	11.92	1.756
	BiMS2	309-02-A08
R square	0.9599	0.9552

Фиг.9.



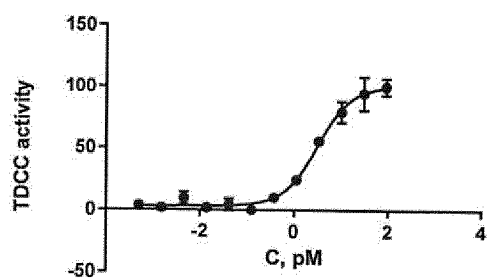
	G04
EC50	0.7918
	G04
R square	0.9857

Фиг. 10 (А)



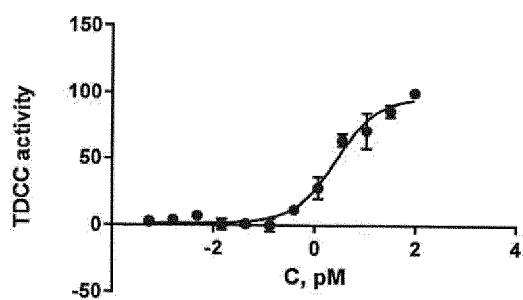
	A02	Global (shared)
EC50	2.961	
	A02	Global (shared)
R square	0.9896	0.9896

Фиг. 10 (Б)



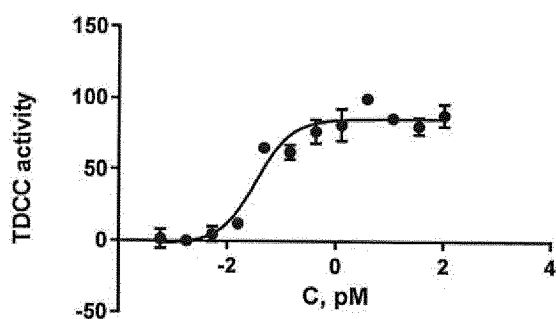
	F01	Global (shared)
EC50	3.196	
	F01	Global (shared)
R square	0.9796	0.9796

Фиг. 10 (В)



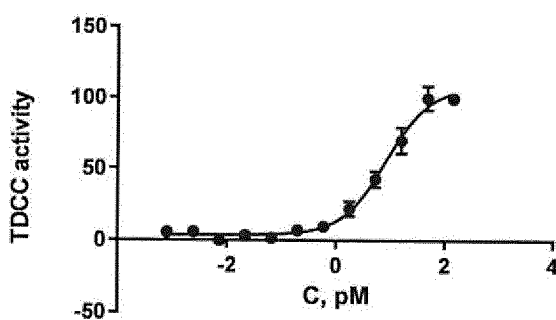
	G12	Global (shared)
EC50	2.692	
	G12	Global (shared)
R square	0.9685	0.9685

Фиг. 10 (Г)



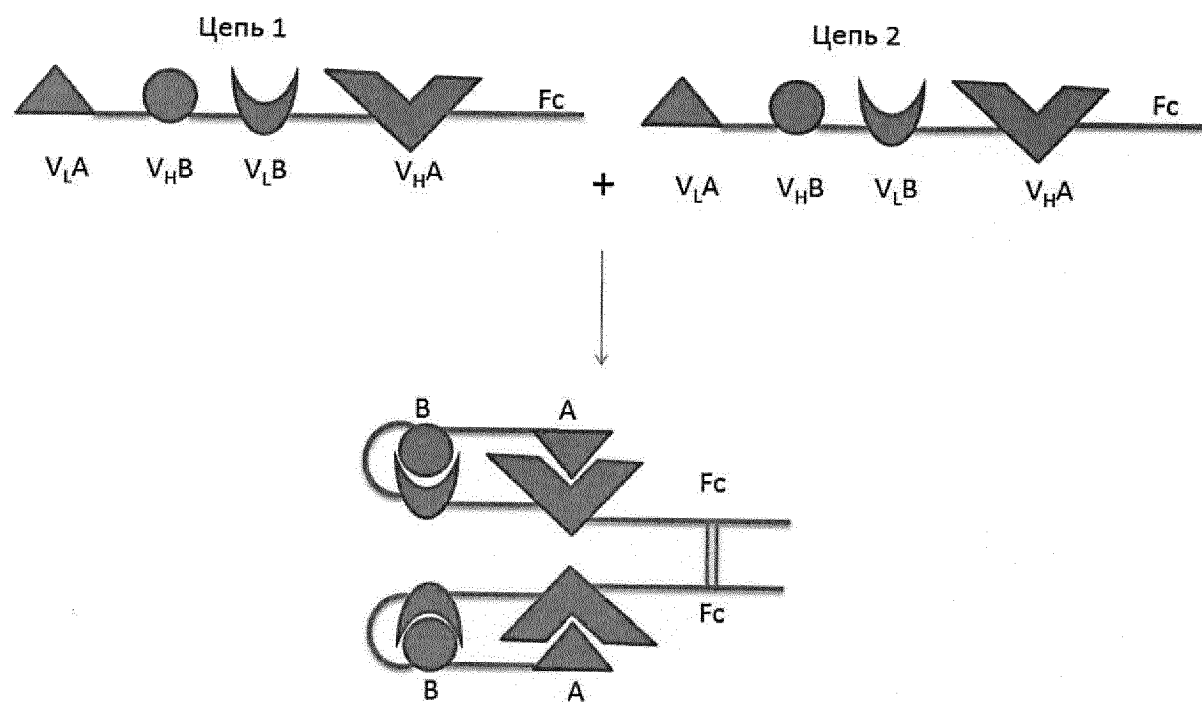
	A08	Global (shared)
EC50	0.03454	
	A08	Global (shared)
R square	0.9395	0.9395

Фиг. 10 (Д)



	B08	Global (shared)
EC50	8.390	
	B08	Global (shared)
R square	0.9835	0.9835

Фиг. 10 (Е)



Фиг. 11

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900389

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C07K 16/28, A61P 35/00, 35/02

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	US 7728114 B2 (NOVIMMUNE S.A.) 01.06.2010, формула	1-14
A	RU 2651776 C2 (ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "МЕЖДУНАРОДНЫЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР "ГЕНЕРИУМ" ("МБЦ "ГЕНЕРИУМ")) 23.04.2018, формула	1-14
A	WO 2004/106381 A1 (MICROMET AG et al.) 09.12.2004, формула	1-14

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

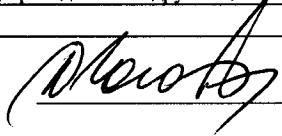
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **27/10/2020**

Уполномоченное лицо:

Начальник Управления экспертизы

 Д.Ю. Рогожин