

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092840 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.19

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(54) АНТИТЕЛА К CD33, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К CD33/CD3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/676,123; 62/825,846

(32) 2018.05.24; 2019.03.29

(33) US

(86) PCT/IB2019/054182

(87) WO 2019/224711 2019.11.28

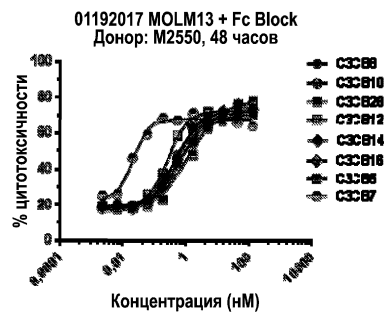
(88) 2020.01.02

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Дим Майкл, Года Франсуа (US),
Макдейд Ронан (GB), Наир-Гупта
Прианка (US)

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

(57) Описаны антитела к CD33 и их антигенсвязывающие фрагменты, а также биспецифические антитела к CD33/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты. Также описаны нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и способы применения антител для лечения или профилактики заболеваний, таких как злокачественное новообразование.



A1

202092840

202092840

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565790EA/060

АНТИТЕЛА К CD33, БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К CD33/CD3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Данное изобретение относится к моноклональным антителам к CD33, биспецифическим антителам к CD33, антителам к CD3, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественное новообразование.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) представляет собой генетически гетерогенное заболевание, характеризующееся клональным размножением лейкозных клеток. Несмотря на наличие возросшего понимания природы заболевания ОМЛ, стандартное лечение с помощью цитотоксической химиотерапии оставалось в основном неизменным на протяжении последних десятилетий, и общая пятилетняя выживаемость остается низкой - < 30% (Burnett, Wetzler, & Lowenberg, 2011; Cancer Genome Atlas Research et al., 2013). Следовательно, существует острая потребность в создании новых методов терапии с повышенной эффективностью и низкой токсичностью, в идеале, нацеленных на стволовые клетки ОМЛ, поскольку эти клетки считаются главными для патогенеза ОМЛ, а их неполное уничтожение при стандартной терапии определяет, согласно оценкам, высокую частоту рецидивов (Hope, Jin, & Dick, 2004; Ishikawa et al., 2007). Хотя терапевтические антитела, направленные на молекулы клеточной поверхности, доказали свою эффективность при лечении злокачественных заболеваний, таких как лимфомы и острый лимфобластный лейкоз, а также солидных опухолей (Hoelzer, 2013; Jackson & Chester, 2015), в настоящее время для ОМЛ одобрен только один вид терапии на основе антител (Godwin, Gale, & Walter, 2017).

[0003] CD33 представляет собой 67 кДа одноцепочечный трансмембранный гликопротеин и является членом семейства связывающих сиаловую кислоту иммуноглобулин-подобных лектинов (Siglecs). Хотя его точная биологическая функция неясна, у нормальных индивидуумов он в основном считается антигеном миелоидной дифференцировки, имеющим низкую экспрессию в миелоидных клетках-предшественниках, нейтрофилах и макрофагах и высокий уровень экспрессии в циркулирующих моноцитах и дендритных клетках. Важно отметить, что CD33 обнаружили на бластах и лейкозных стволовых клетках у 85-90% пациентов с ОМЛ. Интересно, что экспрессия CD33 ограничена гемопоэтическими клетками (Paul, Taylor, Stansbury, & McVicar, 2000; Ulyanova, Blasioli, Woodford-Thomas, & Thomas, 1999), но отсутствует на нормальных гемопоэтических стволовых клетках (Andrews, Torok-Storb, & Bernstein, 1983; Griffin, Linch, Sabbath, Larcom, & Schlossman, 1984; Jilani et al., 2002). Эти

данные свидетельствуют о том, что CD33 является подходящей мишенью для проведения терапии на основе антител для лечения ОМЛ.

[0004] Структура CD33 состоит из N-концевого Ig-подобного домена V-типа (кодируемого экзоном 2 CD33), который опосредует связывание сиаловой кислоты, и Ig-подобного домена C2-типа (кодируемого экзонами 3 и 4) во внеклеточном участке (Laszlo et al., 2016). Альтернативный сплайсинг РНК CD33 может приводить к более короткой изоформе, которая экспрессируется на клеточной поверхности, в которой отсутствует Ig-подобный домен V-типа, но которая сохраняет Ig-подобный домен C2-типа (Laszlo, Estey, & Walter, 2014; Laszlo et al., 2016). Биологическая значимость данного процесса сплайсинга была по существу неизвестной до тех пор, пока последние исследования не показали, что в ~ 50% популяции с ОМЛ присутствовал однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs12459419, что приводило к пропуску экзона 2 CD33, в результате которого возникала делеция V-домена CD33 (Lamba et al., 2017). Интересно, что несколько терапевтических средств на основе антител к CD33, включая Mylotarg, единственное одобренное антитело для ОМЛ, связывает и распознает V-домен CD33. Вышеупомянутое исследование фактически показало, что Mylotarg не имеет эффективности у пациентов, экспрессирующих SNP, и, следовательно, имеет эффективность только у ~ 50% популяции с ОМЛ (Lamba et al., 2017). Принимая во внимание данные о Mylotarg, разумно предположить, что другие антитела к CD33, которые связывают V-домен, будут также эффективны только в ограниченном пуле пациентов с ОМЛ, в частности, у тех, у которых отсутствует SNP-мутация rs12459419.

[0005] Действительно, при изучении клинического пространства CD33 дополнительные антитела к CD33 включают AMG330 и AMG673 от Amgen, AMV564 от AMIvena, IMGN779 от Immunogen, BI836858 от Boehringer Ingelheim, Actimab от Actinium Pharma и SGN33A от Seattle Genetic. AMG330 от Amgen представляет собой BiTE к CD33xCD3 и, как сообщается, «распознает линейный эпитоп, расположенный в домене CD33 V-типа с коровой последовательностью IPYYDKN». (Friedrich et al., 2014). Учитывая, что AMG673 представляет собой версию BiTE к CD33 с увеличенным периодом полужизни, считается, что оно связывается с тем же эпитопом, что и BiTE. AMV564 от Amphivena представляет собой четырехвалентное биспецифическое антитело к CD33/CD3; в соответствии с US9803029 антитело связывается с V-доменом CD33. IMGN779 от Immunogen представляет собой антитело CD33 (My9-6), конъюгированное с ДНК-алкилирующим агентом согласно Фиг. 1 в патенте США № US9359442, меченное ¹²⁵I антитело My9-6 конкурировало с антителом My9 за связывание с CD33-положительными клетками U-937. Антитело My9 связывается с V-доменом CD33 (Perez-Oliva et al., 2011). Вместе данные свидетельствуют о том, что IMGN779 связывается с V-доменом CD33. BI 836858 от Boehringer Ingelheim представляет собой Fc-сконструированное антитело к CD33, которое опосредует опосредованную NK-клетками АЗКЦ и связывается с V-доменом CD33 (Vasu et al., 2016). Кроме того, Vasu et al. демонстрируют доказательства картирования линтузумаба (HuM195) с V-доменом CD33

вместе с Malik et al. и Perez-Oliva et al. (Malik et al., 2015; Perez-Oliva et al., 2011). Антитело HuM195, которое в настоящее время проходит клинические испытания, конъюгировано с актинином компанией Actinium pharma для получения Actimab. Антитело HuM195 также было конъюгировано с ДНК-связывающим агентом компанией Seattle Genetics для получения SGN33A; однако получение этого лекарственного средства в настоящее время приостановлено из-за опасений по поводу токсичности. Соответственно, известные в данной области антитела к CD33 связываются с V-доменом CD33.

[0006] Учитывая эти данные, существует критическая неудовлетворенная медицинская потребность, если речь идет о терапевтических средств на основе антител к CD33 при ОМЛ и необходимости наличия антитела, которое связывается с C2-доменом CD33, для лечения злокачественных новообразований, экспрессирующих CD33.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В одном общем аспекте изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают CD33. В некоторых вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают C2-домен CD33. В некоторых вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают V-домен CD33.

[0008] В другом общем аспекте изобретение относится к выделенным биспецифическим антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают CD33 и CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают C2-домен CD33. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают V-область CD33.

[0009] Предлагаются выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают C2-домен CD33. В определенных вариантах осуществления моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;

k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;

l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;

m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;

n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно; или

o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, специфически связываться с CD33, предпочтительно с человеческим CD33.

[0010] В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 292, 291, 261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284, или 285, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 332, 331, 302, 310, 320, 300, 304, 305, 306, 307, 317, 319, 324 или 325.

[0011] В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 292, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 332;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 291, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 331;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 302;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 310;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 280, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 322;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 259, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 300;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 304;

h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 264, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 305;

i. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 265, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 306;

j. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 266, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307;

k. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 272, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307;

l. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 277, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 317;

m. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 279, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 319;

n. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 284, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 324; или

o. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 325.

[0012] В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) *in vitro* с EC_{50} менее около 2 нМ. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, содержать остов IgG1 с низким содержанием фукозы.

[0013] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD33 с константой диссоциации (KD) менее чем около 5×10^{-9} М.

[0014] В некоторых вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD33 и индуцирует интернализацию с EC_{50} менее около 2 нМ.

[0015] В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с терапевтическим агентом.

[0016] В определенных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным, частично гуманизированным или полностью гуманизированным.

[0017] Также в данном документе предложены биспецифические антитела к CD33/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие антитело к CD33 или его

антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно; или
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно;

и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- 1) SEQ ID NO: 342, 343, 344, 465, 466 и 467, соответственно; или
- 2) SEQ ID NO: 345, 346, 347, 468, 469 и 470, соответственно.

[0018] В определенных вариантах осуществления антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 292, 291, 261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284 или 285, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 332, 331, 302, 310, 320, 300, 304, 305, 306, 307, 317, 319, 324 или 325; и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 257 или 258, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 298 или 299.

[0019] В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность SEQ ID NO: 266, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

z. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 272, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

aa. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 277, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 317; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

bb. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 279, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 319; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

cc. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 284, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 324; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299; или

dd. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 325; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299.

[0020] В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела к CD33/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты индуцируют Т-клеточно-зависимую цитотоксичность в CD33-экспрессирующих клетках *in vitro* со значением EC₅₀ менее около 1 нМ.

[0021] В определенных вариантах осуществления биспецифические антитела к CD33/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты являются химерными, частично гуманизированными или полностью гуманизированными.

[0022] Также предложены выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные и/или биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению.

[0023] Также предложены векторы, содержащие выделенные нуклеиновые

кислоты, кодирующие моноклональные и/или биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению.

[0024] Также предложены клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные и/или биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно изобретению.

[0025] В определенных вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенное биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

[0026] Также предложены способы лечения злокачественного новообразования у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение субъекту фармацевтических композиций согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществление злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз. Гемобластоз может быть выбран, например, но не ограничивается ими, из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы или множественной миеломы. В определенных вариантах осуществления гемобластоз может представлять собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ОЛЛ, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), или опухоль из бластных плазматоидных дендритических клеток (ОБПДК).

[0027] Также предложены способы получения моноклонального или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению. Способы содержат культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное или биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях, обеспечивающих получение моноклонального или биспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и восстановление моноклонального или биспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[0028] Также предложены способы получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное и/или биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Способы включают объединение моноклонального и/или биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0029] Приведенное выше краткое описание, а также приведенное ниже подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, будут более понятны при изучении вместе с приложенными рисунками. Однако необходимо

понимать, что применение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

[0030] На Фиг. 1А-1В показаны анализы опосредованной CD33хCD3 Т-клетками цитотоксичности. Биспецифические антитела к CD33хCD3 с использованием плеча к CD3 CD3В219 инкубировали с человеческими пан Т-клетками и линией CD33⁺ клеток ОМЛ. Через 48 часов при 37 °С, 5% CO₂ общую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток измеряли с помощью проточной цитометрии. На Фиг. 1А показаны антителакандидаты, идентифицированные при помощи OMNIRat, а на Фиг. 1В показаны антителакандидаты, идентифицированные при помощи OMNIMUS.

[0031] На Фиг. 2А-2В показана оценка *ex vivo* биспецифических антител к CD33хCD3 с использованием цитотоксичности плеча к CD3 CD3В219 и CD3В376 бластов и активации Т-клеток в свежей цельной крови пациента с ОМЛ. На Фиг. 2А показан процент общей цитотоксичности в отношении клеток ОМЛ с использованием биспецифических антител к CD33 или контролей к CD3хnull. На Фиг. 2В показана активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами к CD33 или контролями к CD3хnull. При этом не было добавлено ни одного блокатора Fc.

[0032] На Фиг. 3А-3С показаны анализы опосредованной CD33хCD3 Т-клетками цитотоксичности. Биспецифические антитела к CD33хCD3 с использованием плеча к CD3 CD3В219 и анти-CD3В376 инкубировали с человеческими пан Т-клетками и линиями клеток ОМЛ, которые были или дикого типа (KG1, Фиг. 3А), или гетерозиготными (SH2, Фиг. 3В), или гомозиготными (OCIAML3, Фиг. 3С) по SNP-мутации CD33 rs12459419. Через 48 часов при 37 °С, 5% CO₂ общую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток измеряли с помощью проточной цитометрии.

[0033] На Фиг. 4А-4В показана оценка *ex vivo* антител С33В904 в комбинации с CD3В219 или CD3В376 на цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13, экзогенно добавленных к нормальной здоровой цельной крови человека (N=6 доноров): Процент цитотоксичности в отношении клеток MOLM-13 (Фиг. 4А) и CD33⁺ CD14⁺ моноцитов (Фиг. 4В) с использованием биспецифических антител к CD33хCD3 и соответствующих контролей к nullхCD3 через 48 ч.

[0034] На Фиг. 5А - 5В показана оценка *ex vivo* биспецифических антител к CD33хCD3 с применением плеча к CD3 CD3В219 и CD3В376 на цитотоксичность в отношении моноцитов и активацию Т-клеток в свежей цельной крови от шести нормальных доноров яванского макака. На Фиг. 5А показан процент общей клеточной цитотоксичности в отношении CD33⁺CD14⁺ моноцитов яванского макака при использовании биспецифических антител к CD33 или их контролей к CD3хnull. На Фиг. 5В показана активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами к CD33 или их контролями к CD3хnull. При этом не было добавлено ни одного блокатора Fc.

[0035] На Фиг. 6 показана противоопухолевая эффективность С3СВ189 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей линии NSG. Диссеминированные опухоли MOLM-13 визуализировали

на билюминесценцию (BLI) дважды в неделю, а результаты представляли в виде средней интенсивности излучения ($\text{ф/с/см}^2/\text{ср}$) \pm СОС ($n=8-10/\text{группа}$). $*p \leq 0,0001$ для лечения по сравнению с контролем, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

[0036] На Фиг. 7 показана выживаемость животных, получавших в качестве лечения СЗСВ189, в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей линии NSG. Выживаемость мышей, несущих MOLM-13, графически представлена с использованием кривой Каплана - Мейера и оценивается с помощью логрангового критерия (критерия Кокса-Мантеля). $*p \leq 0,0001$ для групп лечения в сравнении с контрольными группами.

[0037] На Фиг. 8 показана противоопухолевая эффективность СЗСВ88 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей линии NSG. Диссеминированные опухоли MOLM-13 визуализировали на билюминесценцию (BLI) дважды в неделю, а результаты представляли в виде средней интенсивности излучения ($\text{ф/с/см}^2/\text{ср}$) \pm СОС ($n=8-10/\text{группа}$). $*p \leq 0,0001$ для лечения по сравнению с контролем, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

[0038] На Фиг. 9 показана выживаемость животных, получавших лечение СЗСВ88, в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13, у гуманизированных Т-клетками мышей линии NSG. Выживаемость мышей, несущих MOLM-13, графически представлена с использованием кривой Каплана - Мейера и оценивается с помощью логрангового критерия (критерия Кокса-Мантеля). $*p \leq 0,05$ для групп лечения в сравнении с контрольными группами.

[0039] На Фиг. 10 показан анализ жизнеспособности клеток с конъюгатом лекарственное средство- белок A *in vitro* для обнаружения интернализации пяти антител к CD33 в клетках MOLM13. Все пять антител к CD33 демонстрировали цитотоксичность дозозависимым образом.

[0040] На Фиг. 11А-11В показаны мкАт к CD33 на основе IgG1 с низким содержанием фукозы, опосредующие активность АЗКЦ. АЗКЦ человеческих НК-клеток против целевых клеток MOLM-13 (Фиг. 11А) и MV4-11 (Фиг. 11В) в ответ на повышение концентраций мкАт к CD33 на основе IgG1.

[0041] На Фиг. 12 показаны CD33-положительные и CD33-отрицательные линии клеток, окрашенные в течение 4 ч различными концентрациями СЗСВ189 для характеристики поверхностных профилей связывания биспецифического антитела.

[0042] На Фиг. 13 показаны Т-клетки от шести здоровых доноров, которые исследовали в анализах перенаправления Т-клеток с указанными линиями клеток и определяли процент цитотоксичности с помощью проточной цитометрии. На графике представлено среднее \pm станд. откл.

[0043] Фиг. 14А и 14В. СЗСВ189 связывается с С2-доменом и опосредует цитотоксичность в отношении первичных образцов независимо от их статуса генотипа

SNP 12459419. Фиг. 14А) анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности и активации с использованием биспецифических антител к CD33хCD3 или к CD123хCD3 в линиях клеток CD33⁺ KG-1 и CD33⁻ KG1ΔCD33. Фиг. 14В) только Т-клетки инкубировали с возрастающими концентрациями СЗСВ189 в течение 48 часов и измеряли активацию Т-клеток посредством проточной цитометрии. На графике представлено среднее ± станд. откл.

[0044] Фиг. 15А-15С. На Фиг. 15А показаны медианные значения EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀ по показаниям цитотоксичности от шести здоровых доноров. Фиг. 15В аналогична Фиг. 13, но в данном случае измеряли активацию Т-клеток. Фиг. 15С аналогична фиг. 15А, но в данном случае показаны медианные значения EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀ для показаний активации Т-клеток от шести здоровых доноров.

[0045] Фиг. 16А-16Е: СЗСВ189 опосредует мощную опухолевую активность *in vivo* в двух мышинных моделях развившегося ОМЛ. На Фиг. 16 А показаны гуманизированные Т-клетками мыши линии NSG с развившимися опухолями KG-1, которым интраперитонеально вводили СЗСВ189 в дозе 0,1, 0,5 и 1 мг/кг. Подкожные опухоли измеряли два раза в неделю, а результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в мм³ ± СОС для каждой группы. На Фиг. 16В показаны гуманизированные Т-клетками мыши линии NSG, несущие диссеминированные клетки MOLM-13Luc, которым интраперитонеально вводили СЗСВ189 в дозе 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг. Выживаемость определяли с помощью анализа выживаемости Каплана - Мейера. Фиг. 16С аналогична Фиг. 16В, но в данном случае биолюминесценцию измеряли дважды в неделю, и показаны репрезентативные изображения биолюминесцентной визуализации живых животных (вид сверху и вид снизу для n=3-5 животных) на 9-е, 13-е и 16-е сутки (N=3 в контрольной группе на 16-е сутки из-за смертности). Фиг. 16D аналогична Фиг. 16В, но в данном случае мышам вводили 0,005 и 0,05 мг/кг СЗСВ189 в три дозы. Инфильтрацию Т-клеток в костном мозге измеряли методом проточной цитометрии, а результаты представляли в виде процентного содержания опухолевых клеток (верхняя панель) или процентного содержания CD3⁺ Т-клеток (нижняя панель). Фиг. 16Е аналогична фиг. 16D, но в данном случае инфильтрацию Т-клеток в костном мозге измеряли с помощью ИГХ окрашивания, и результаты представлены в виде CD33⁺ опухолевых клеток (верхняя панель) или CD8⁺ Т-клеток (нижняя панель).

[0046] На Фиг. 17 показано, что СЗСВ189 опосредует противоопухолевые ответы в мышинной модели диссеминированной ОМЛ. Опухолевые клетки имплантировали на 0-й день, Т-клетки имплантировали на 5-й день и вводили дозу, обозначенную столбцом ниже на оси X. Биолюминесценция по группам представлена в виде среднего значения ± СОС. * обозначает значимое различие на 13-й день ($p \leq 0,05$) между лечением СЗСВ189 и контролем к nullхCD3 (n=9-10/группа на 13-й день).

[0047] На Фиг. 18А и 18В показана индуцированная СЗСВ189 Т-клеточная цитотоксичность в отношении линий CD33⁺ клеток в цельной крови. На Фиг. 18 А показаны Т-клетки от десяти здоровых доноров (по одной точке на донора),

протестированные в анализах перенаправления Т-клеток с указанными линиями клеток. На графике представлено среднее \pm станд. откл. Фиг. 18В аналогична Фиг. 18А, но в данном случае показаны значения цитотоксичности и Т-клеточной активации EC₂₀, EC₅₀ и EC₉₀. N/O указывает на то, что нельзя определить, т. е. с помощью Prism, или если кривая была неоднозначной. Значения представляют собой медианы от 10 здоровых доноров.

[0048] На Фиг. 19А и 19В показано, что СЗСВ189 опосредует цитотоксичность в отношении бластов ОМЛ в образцах первичных пациентов. На Фиг. 19А показана оценка *ex vivo* опосредованной СЗСВ189 цитотоксичности в отношении CD33⁺ бластов в свежей цельной крови пациента с ОМЛ через 48 часов. Для каждого образца пациента приводятся отдельные значения EC₅₀. Фиг. 19В аналогична Фиг. 19А, но в данном случае измеряли активацию Т-клеток.

[0049] На Фиг. 20 показано, что CD33 экспрессируется в субпопуляциях иммунных клеток яванского макака. Цельную кровь от шести нормальных здоровых доноров яванского макака окрашивали моноклональным антителом к CD33 и анализировали с помощью проточной цитометрии. На графике представлено среднее \pm станд. откл.

[0050] На Фиг. 21 показано, что СЗСВ189 опосредует цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13, нормальных CD33⁺ моноцитов и нейтрофилов яванского макака, а также активацию Т-клеток яванского макака. Оценка *ex vivo* опосредованной СЗСВ189 цитотоксичности в отношении линии клеток ОМЛ MOLM-13, экзогенно добавленной к нормальной здоровой цельной крови яванского макака (n=6). Показан процент цитотоксичности в отношении клеток MOLM-13, активации Т-клеток, а также цитотоксичности в отношении CD33⁺ моноцитов и нейтрофилов с использованием биспецифических антител к СЗСВ189 и nullxCD3. Среднее \pm СОС показано на графике.

[0051] На Фиг. 22А-22D показано, что СЗСВ189 опосредует снижение CD33⁺ лейкоцитов у яванских макаков. Яванским макакам вводили однократную в/в дозу контроля (носителя), 0,05, 0,2 или 1 мг/кг СЗСВ189. На Фиг. 22 А показаны профили зависимости концентрации СЗСВ189 от времени. На Фиг. 22В показана активация Т-клеток (% CD25⁺ в CD8⁺) в периферической крови. На Фиг. 22С показано влияние СЗСВ189 на гранулоциты (нейтрофилы). На Фиг. 22D показано влияние СЗСВ189 на моноциты.

[0052] На Фиг. 23 показано высвобождение цитокинов после введения дозы СЗСВ189 яванским макакам. Средние уровни (станд. откл.) цитокинов у яванских макаков после однократной в/в дозы СЗСВ189. (А) ИФН- γ , (В) ИЛ-10, (С) ИЛ-2, (D) ИЛ-6, (Е) МСР, (F) ФНО- α . Все приведенные ниже значения НПКО (нижний предел количественного определения) рассматривали как половину НПКО для целей расчета на графике и средних значений.

[0053] На Фиг. 24А-24С показано, что СЗСВ189 связывается с С2-доменом и опосредует цитотоксичность в отношении первичных образцов независимо от их статуса генотипа SNP 12459419. На Фиг. 24 А показано картирование HDX и последующая иллюстрация эпитопных областей в домене IgC и IgV белка ВКД CD33 для мкАт, связывающих V- и С2-домены. Эпитопная область V-домена окрашена в синий цвет, а

эпитопная область С2-домена окрашена в красный цвет. На Фиг. 24В показана оценка *ex vivo* цитотоксичности в отношении CD33⁺ бластов в свежей цельной крови пациента с ОМЛ, которую проводили при концентрации биспецифического антитела 27 нМ. На графике представлено среднее \pm станд. откл. На Фиг. 24С показана опосредованная СЗСВ189 цитотоксичность в отношении замороженных очищенных моноцитов от 25 нормальных доноров при концентрации биспецифического антитела 0,27 нМ. На графике представлено среднее \pm станд. откл.

[0054] На Фиг. 25А-25С показаны результаты генотипирования для SNP rs12459419. На Фиг. 25А показаны результаты генотипирования в тестах Taqman на SNP rs12459419 в линиях клеток. Фиг. 25В аналогична Фиг. 25А, но в данном случае образцы первичных пациентов были генотипированы. Фиг. 25С аналогична Фиг. 25А, но в данном случае замороженные моноциты от здоровых доноров генотипировали с использованием анализов Taqman и секвенирования по Сэнгеру.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0055] В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; где каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое обсуждение не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего состояния знаний в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

[0056] Все технические и научные термины в настоящем документе, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае, определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в настоящем описании.

[0057] Следует отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

[0058] Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (мас/об) включает от 0,9% (мас/об) до 11% (мас/об). В контексте настоящего документа использование числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

[0059] Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду

элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что такие эквиваленты указаны в изобретении.

[0060] Используемые в настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий», или любая другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и являются не исключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано иное, термин «или» относится к включающему, а не к исключающему «или». Например, условие «А или В» выполняется в любой одной из следующих ситуаций: А истинно (или присутствует), а В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), а В истинно (или присутствует) и оба элемента А и В истинны (или присутствуют).

[0061] В контексте данного документа соединительный термин «и/или» между множеством перечисляемых элементов следует понимать как включающий, как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности применения первого и второго элементов вместе. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте данного документа. Также подразумевается, что одновременное применение более чем одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или».

[0062] В контексте данного документа термин «состоит из» или его варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемый в данном описании и формуле изобретения, указывает на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

[0063] В контексте данного документа термин «состоит по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», как они используются в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, а также на необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции.

См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

[0064] В настоящем документе термин «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человека. Используемый в настоящем документе термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, без ограничений, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, людей и т. п. и более предпочтительно человека.

[0065] Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «в основном», «главным образом» и подобные термины, используемые в данном документе при упоминании размера или характеристики компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанные размер/характеристика не являются строгой границей или параметром и не исключают незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или сходны, как будет понятно обычному специалисту в данной области техники. Как минимум, такие ссылки, содержащие числовой параметр, будут включать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области техники (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, производственные допуски и т. д.), не изменят наименьшую значащую цифру.

[0066] Термины «идентичный» или процентная «идентичность» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антитела к CD33 и кодирующие их полинуклеотиды, биспецифические антитела к CD33 и CD3 и кодирующие их полинуклеотиды, полипептиды CD33 и полинуклеотиды CD33, которые кодируют их), две или более последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют указанную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, при измерении с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или визуальной проверки.

[0067] Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытуемую последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводят испытуемую и эталонную последовательности, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма последовательности. Впоследствии алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательности для испытуемой (-ых) последовательности (-ей) по отношению к эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

[0068] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, Adv. Заявк. Math. 2:482 (1981), с использованием алгоритма выравнивания областей

гомологии по Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия по Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или путем визуальной проверки (см. в основном *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, совместное предприятие компаний Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

[0069] Примерами алгоритмов, приемлемых для определения процентной идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар высококачественных последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при совмещении со словом той же длины в последовательности базы данных. T называют пороговым показателем сходства соседних слов (Altschul et al. *выше*). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как образец для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Совпадения слов затем расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания можно увеличивать.

[0070] Совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M для нуклеотидных последовательностей (балл вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за не совпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей, матрица подсчета баллов используются для расчета совокупного балла. Расширение зачетов слов в каждом направлении прекращает, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от его максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже, вследствие накопления одного или более отрицательных баллов выравнивания остатков; или в конце каждой последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используют длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$, и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см., Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

[0071] В дополнение к процента идентичности последовательности, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см.,

например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в определении наименьшей суммарной вероятности ($P(N)$), которая указывает на вероятность при которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей будет происходить случайно. Например, нуклеиновая кислота считается сходной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше около 0,1 более предпочтительно меньше около 0,01, и наиболее предпочтительно меньше около 0,001.

[0072] Дополнительным показателем по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух полипептидов, является иммунологическое перекрестное реагирование полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком по существу идентичности двух последовательностей нуклеиновых кислот является гибридизация этих двух молекул друг с другом в строгих условиях, как описано ниже.

[0073] Антитела

[0074] Данное изобретение по существу относится к выделенным антителам к CD33 или их антигенсвязывающим фрагментам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим антитела. Данное изобретение дополнительно относится к выделенным биспецифическим антителам к CD33/CD3 или их антигенсвязывающим фрагментам, нуклеиновым кислотам и векторам экспрессии, кодирующим антитела, рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и композициям, содержащим биспецифические антитела. Также предложены способы получения антител и способы применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественное новообразование. Антитела согласно данному изобретению обладают одним или более желательными функциональными свойствами, включая, без ограничений, высокую аффинность связывания с CD33 и/или CD3, высокую специфичность к CD33 и/или CD3 и способность лечить или предотвращать злокачественное новообразование при введении отдельно или в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами.

[0075] В общем аспекте данное изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают CD33. В некоторых вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают C2-домен CD33. В некоторых вариантах осуществления выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты связывают V-домен CD33.

[0076] В контексте данного документа термин «антитело» используется в широком

смысле и включает иммуноглобулин или молекулы антител, включая человеческие, гуманизированные, составные и химерные антитела и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. В целом антитела представляют собой белки или пептидные цепи, которые демонстрируют специфичность связывания с конкретным антигеном. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам (т.е. I, IgA, IgD, IgE, IgG and IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела согласно данному изобретению могут быть из любого из пяти основных классов или соответствующих подклассов. Антитела изобретения предпочтительно представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно, каппа и лямбда. Соответственно, антитела изобретения могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антитела согласно изобретению содержат константные области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к константным доменам тяжелой и легкой цепей антитела содержат антигенсвязывающую область, которая состоит из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т. е. определяющие комплементарность области 1-3; CDR1, CDR2, и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи альтернативно называются LCDR1, LCDR2 и LCDR3, а домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно называются HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

[0077] В контексте данного документа термин «выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD33, по существу не содержит антител, которые не связываются с CD33). Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0078] В контексте данного документа термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела изобретения можно получать с использованием гибридного способа, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов одиночных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

[0079] При использовании в настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к фрагменту антитела, такому как, например, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv-фрагмент, стабилизированный дисульфидными связями Fv-фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидными связями диатело (ds-диатело), одноцепочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), scFv-димер (двухвалентное антитело), мультиспецифическое антитело, образованное из части антитела, содержащей одну или более CDR, верблюжье однодоменное антитело, нанотело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полной структуры антитела. Антигенсвязывающий фрагмент обладает возможностью связывания с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело или исходный фрагмент антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и Fd-сегмент тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

[0080] При использовании в настоящем документе термин «одноцепочечное антитело» относится к стандартному для данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом размером от около 15 до около 20 аминокислот. При использовании в настоящем документе термин «однодоменное антитело» относится к стандартному для данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

[0081] В контексте данного документа термин «человеческое антитело» относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, продуцируемому любым способом, известным в данной области техники. Данное определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один человеческий полипептид тяжелой и/или легкой цепи.

[0082] В контексте данного документа термин «гуманизированное антитело» относится к нечеловеческому антителу, которое модифицировано для увеличения гомологии последовательности по сравнению с антителом человека, так что антигенсвязывающие свойства антитела сохраняются, но его антигенность в человеческом теле уменьшается.

[0083] При использовании в настоящем документе термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. Переменная область легкой и тяжелой цепей часто соответствует переменной области антитела, полученного из

одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т. д.), имеющего желаемые специфичность, аффинность и способность, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, полученного из другого вида млекопитающего (например, человека), для предотвращения возникновения иммунного ответа у данного вида.

[0084] В контексте данного документа термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, которое содержит множество последовательностей переменного домена иммуноглобулина, где первая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, а вторая последовательность переменного домена иммуноглобулина из множества обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы не перекрываются или по существу не перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, триспецифического антитела или тетраспецифического антитела.

[0085] В контексте данного документа термин «биспецифическое антитело» относится к мультиспецифическому антителу, которое связывает не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется первой последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания к первому эпитопу, и второй последовательностью переменного домена иммуноглобулина, которая обладает специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на одном и том же антигене, например на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В варианте осуществления первый и второй эпитопы перекрываются или по существу перекрываются. В варианте осуществления первый и второй эпитопы расположены на различных антигенах, например на различных белках (или различных субъединицах мультимерного белка). В варианте осуществления биспецифическое антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи и последовательность переменного домена легкой цепи, которые обладают специфичностью связывания к первому эпитопу, а также последовательность переменного домена тяжелой цепи, и последовательность переменного домена легкой цепи, которая обладают специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент,

обладающий специфичностью связывания к первому эпитопу, и полуантитело или его фрагмент, обладающий специфичностью связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющий специфичность связывания к первому эпитопу, и scFv или его фрагмент, имеющий специфичность связывания ко второму эпитопу. В варианте осуществления первый эпитоп расположен на CD33, а второй эпитоп расположен на CD3. В одном варианте осуществления первый эпитоп расположен на CD33, а второй эпитоп расположен на PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD3 и/или других связанных с опухолью иммунных супрессорах или поверхностных антигенах.

[0086] В контексте данного документа термин «CD33» относится к одноцепочечному трансмембранному гликопротеину массой 67 кДа, являющемуся членом семейства связывающих сиаловую кислоту иммуноглобулин-подобных лектинов (Siglecs). CD33 также известен как Siglec-3, gp67, или p67. Структура CD33 состоит из N-концевого Ig-подобного домена V-типа (кодируемого экзоном 2 CD33), который опосредует связывание сиаловой кислоты, IG-подобного домена C2-типа (кодируемого экзоном 4) во внеклеточном участке (Laszlo et al., 2016). Альтернативный сплайсинг РНК CD33 может приводить к более короткой изоформе, которая экспрессируется на клеточной поверхности, в которой отсутствует Ig-подобный домен V-типа, но которая сохраняет Ig-подобный домен C2-типа (Laszlo, Estey, & Walter, 2014; Laszlo et al., 2016). Биологическая значимость данного процесса сплайсинга была по существу неизвестной до тех пор, пока последние исследования не показали, что в ~ 50% популяции с ОМЛ присутствовал однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs12459419, что приводило к пропуску экзона 2 CD33, в результате которого возникала делеция V-домена CD33 (Lamba et al., 2017). Полноразмерный человеческий CD33 представлен компанией Uniprot P20138 (SEQ ID NO: 1).

[0087] В контексте данного документа антитело, которое «специфически связывается с CD33», относится к антителу, которое связывается с CD33, предпочтительно с CD33 человека, предпочтительно с C2-доменом CD33, с KD 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 5×10^{-9} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 5×10^{-10} М или менее или 1×10^{-10} М или менее. Термин KD означает константу диссоциации, которая представляет собой отношение Kd к Ka (т. е. Kd/Ka) и выражается в молярной концентрации (M). Значения KD для антител можно определять с помощью способов данной области техники, относящихся к настоящему описанию. Например, KD антитела может быть определена с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с помощью системы биосенсоров, например, системы Biacore®, или с использованием технологии интерферометрии биослоев, например, системы Octet RED96.

[0088] Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с целевым антигеном.

[0089] Согласно конкретному аспекту, данное изобретение относится к

выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно;
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно;
- p. SEQ ID NO: 351, 352, 353, 474, 475 и 476, соответственно;
- q. SEQ ID NO: 357, 358, 359, 480, 481 и 482, соответственно;
- r. SEQ ID NO: 372, 373, 374, 495, 496 и 497, соответственно;
- s. SEQ ID NO: 375, 376, 377, 498, 499 и 500, соответственно;
- t. SEQ ID NO: 381, 382, 383, 504, 505 и 506, соответственно;
- u. SEQ ID NO: 384, 385, 386, 507, 508 и 509, соответственно;
- v. SEQ ID NO: 390, 391, 392, 510, 511 и 512, соответственно;
- w. SEQ ID NO: 393, 394, 395, 513, 514 и 515, соответственно;
- x. SEQ ID NO: 396, 397, 398, 516, 517 и 518, соответственно;
- y. SEQ ID NO: 399, 400, 401, 519, 520 и 521, соответственно;
- z. SEQ ID NO: 405, 406, 407, 525, 526 и 527, соответственно;
- aa. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 534, 535 и 536, соответственно;
- bb. SEQ ID NO: 417, 418, 419, 537, 538 и 539, соответственно;
- cc. SEQ ID NO: 420, 421, 422, 540, 541 и 542, соответственно;
- dd. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 549, 550 и 551, соответственно;
- ee. SEQ ID NO: 432, 433, 434, 552, 553 и 554, соответственно;
- ff. SEQ ID NO: 435, 436, 437, 555, 556 и 557, соответственно;
- gg. SEQ ID NO: 438, 439, 440, 558, 559 и 560, соответственно;
- hh. SEQ ID NO: 441, 442, 443, 561, 562 и 563, соответственно;
- ii. SEQ ID NO: 450, 451, 452, 570, 571 и 572, соответственно;
- jj. SEQ ID NO: 453, 454, 455, 573, 574 и 575, соответственно;

kk. SEQ ID NO: 456, 457, 458, 576, 577 и 578, соответственно;

ll. SEQ ID NO: 459, 460, 461, 579, 580, и 581, соответственно;

mm. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 582, 583 и 584, соответственно;

nn. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 585, 586 и 587, соответственно; или

oo. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 480, 481 и 482, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD33, предпочтительно человеческий CD33.

[0090] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из SEQ ID NO: 259-296, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из SEQ ID NO: 300-338. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент изобретения содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична одной из SEQ ID NO: 259-296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична одной из SEQ ID NO: 300-338, соответственно.

[0091] Согласно другому конкретному аспекту данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту согласно изобретению, содержащему:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 292, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 332;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 291, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 331;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 302;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 310;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

ff. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 288, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 328;

gg. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 289, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 329;

hh. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 290, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 330;

ii. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 293, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 333;

jj. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 294, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 334;

kk. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 295, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 335;

ll. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 296, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 336;

mm. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 337;

nn. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 281, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 338; или

oo. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 286, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303.

[0092] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:259, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно

90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 300. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 259; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 300.

[0093] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 351, 352, 353, 474, 475 и 476, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:260, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 301. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 260; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 301.

[0094] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:261, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 302. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 301.

[0095] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 357, 358, 359, 480, 481 и 482, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:262, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 303. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 262; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303.

[0096] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:263, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 304. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 304.

[0097] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:264, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 305. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 264; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 305.

[0098] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:265, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 306. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 265; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 306.

[0099] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:266, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 307. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 266; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307.

[00100] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 372, 373, 374, 495, 496 и 497, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:267, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно

90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 308. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 267; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 308.

[00101] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 375, 376, 377, 498, 499 и 500, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:268, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 309. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 268; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 309.

[00102] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:269, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 310. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 310.

[00103] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 381, 382, 383, 504, 505 и 506, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:270, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 311. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 270; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 311.

[00104] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 384, 385, 386, 507, 508 и 509, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:271, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 312. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 271; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 312.

[00105] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:272, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 307. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 272; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307.

[00106] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 390, 391, 392, 510, 511 и 512, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:273, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 313. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 273; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 313.

[00107] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 393, 394, 395, 513, 54, и 515, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:274, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 314. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 274; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 314.

[00108] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 396, 397, 398, 516, 517 и 518, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:275, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно

90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 315. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 275; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 315.

[00109] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 399, 400, 401, 519, 520 и 521, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:276, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 316. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 276; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 316.

[00110] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:277, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 317. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 277; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 317.

[00111] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 405, 406, 407, 525, 526 и 527, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:278, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 318. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 278; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 318.

[00112] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:279, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 319. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 279; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 319.

[00113] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:280, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 320. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 280; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 320.

[00114] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 414, 415, 416, 534, 535 и 536, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:281, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 321. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 281; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 321.

[00115] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 417, 418, 419, 537, 538 и 539, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:282, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 322. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 282; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 322.

[00116] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 420, 421, 422, 540, 541 и 542, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:283, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно

90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 323. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 283; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 323.

[00117] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 324. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 284; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 324.

[00118] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 325. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 325.

[00119] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 429, 430, 431, 549, 550 и 551, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 326. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 286; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 326.

[00120] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 432, 433, 434, 552, 553 и 554, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:287, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 327. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 287; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 327.

[00121] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 435, 436, 437, 555, 556 и 557, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:288, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 328. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 288; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 328.

[00122] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 438, 439, 440, 558, 559 и 560, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:289, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 329. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 289; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 329.

[00123] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 441, 442, 443, 561, 562 и 563, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:290, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 330. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 290; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 330.

[00124] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:291, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно

90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 331. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 291; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 331.

[00125] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:292, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 332. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 292; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 332.

[00126] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 450, 451, 452, 570, 571 и 572, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:293, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 333. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 293; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 333.

[00127] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 453, 454, 455, 573, 574 и 575, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:294, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 334. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 294; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 334.

[00128] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 456, 457, 458, 576, 577 и 578, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:295, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 335. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 295; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 335.

[00129] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 459, 460, 461, 579, 580 и 581, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 336. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 296; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 336.

[00130] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 378, 379, 380, 582, 583 и 584, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:269, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 337. Предпочтительно выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 337.

[00131] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 414, 415, 416, 585, 586 и 587, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:281, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 338. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 281; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 338.

[00132] В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO: 429, 430, 431, 480, 481 и 482, соответственно. В другом варианте осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO:286, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно

90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 303. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 286; и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303.

[00133] Также в данном документе предложены биспецифические антитела к CD33/CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент. В определенных вариантах осуществления антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению, а антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность (1) SEQ ID NO: 342, 343, 344, 465, 466 и 467, соответственно, или (2) SEQ ID NO: 345, 346, 347, 468, 469 и 470, соответственно.

[00134] Термин «CD3» относится к состоящему из множества субъединиц белковому комплексу CD3. CD3 также может называться «кластером дифференцировки 3». Состоящий из множества субъединиц белковый комплекс CD3 состоит из шести (6) отдельных полипептидных цепей, которые включают CD3 γ -цепь (SwissProt P09693) (SEQ ID NO: 588), CD3 δ -цепь (SwissProt P04234) (SEQ ID NO: 589), две CD3 ϵ -цепи (SwissProt P07766) (SEQ ID NO: 590) и один гомодимер CD3 ζ -цепи (SwissProt 20963) (SEQ ID NO: 591), связанный с α и β цепью T-клеточного рецептора. CD3 представляет собой T-клеточный корецептор, который функционирует с возможностью активации как цитотоксической T-клетки (интактных CD8⁺ T-клеток), так и T-хелперных клеток (интактных CD4⁺ T-клеток). Полипептидные CD3 γ -, CD3 δ -, и CD3 ϵ -цепи из множества субъединиц комплекса CD3 ассоциируются с T-клеточным рецептором (TCR) и CD3 ζ -цепью для генерации активирующего сигнала в T-лимфоцитах, а взаимодействие между CD3 и T-клеточным рецептором представляет собой комплекс TCR. Термин CD3 при отсутствии особых указаний включает в себя любой вариант, изоформу, и видовой гомолог CD3, который в природе экспрессируется клетками (включая T-клетки) или который может экспрессироваться на клетках, трансфицированных генами или кДНК, кодирующей эти полипептиды, предпочтительно «CD3» представляет собой человеческий белковый комплекс CD3, состоящий из множества субъединиц.

[00135] Перенаправление T-лимфоцитов к раковым клеткам, экспрессирующим CD33, посредством комплекса TCR/CD3 представляет собой привлекательный альтернативный подход к лечению. Комплекс T-лимфоцитов TCR/CD3 состоит из гетеродимера TCR альфа (α)/бета (β) или TCR гамма (γ)/дельта (δ), экспрессируемого на клеточной поверхности совместно с константными субъединицами CD3, обозначаемыми как гамма (γ), дельта (δ), эпсилон (ϵ), зета (ζ) и эта (η). Человеческий CD3 ϵ описан как

UniProt P07766 (CD3E_HUMAN). Антитело к CD3ε, описанное на современном уровне техники, представляет собой SP34 (Yang SJ, *The Journal of Immunology* (1986) 137; 1097-1100), который реагирует как с CD3 примата, так и с человеческим CD3, и доступен в продаже от компании Pharmingen. Дополнительные антитела к CD3, описанные в уровне техники, включают UCNT-1 (см. WO2000041474) и BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute; использованное в исследованиях GvHD фазы I/II, Anasetti et al., *Transplantation* 54: 844 (1992)). SP34 отличается от UCNT-1 и BC-3 тем, что SP-34 распознает эпитоп, присутствующий только на ε-цепи CD3 (см. Salmeron et al., (1991) *J. Immunol.* 147: 3047), а UCNT-1 и BC-3 распознает эпитоп, состоящий из ε- и γ-цепей. Последовательности антитела с той же последовательностью, что и SP34, описаны по меньшей мере в WO2008119565, WO2008119566, WO2008119567, WO2010037836, WO2010037837 и WO2010037838. Последовательность антитела, которая на 96% идентична VH SP34, описана в US8236308 (WO2007042261).

[00136] Были описаны разные форматы биспецифических антител, и обзор по ним недавно был представлен в публикации Chames and Baty (2009) *Curr Opin Drug Disc Dev* 12: 276.

[00137] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело настоящего изобретения представляет собой диатело, кросстело или биспецифическое антитело, полученное посредством контролируемого обмена Fab-плечами, например описанными в настоящем изобретении способами.

[00138] В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают в себя IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3 для усиления гетеродимеризации; рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, где каждая из двух сторон молекулы содержит Fab-фрагмент или часть Fab-фрагмента по меньшей мере двух разных антител; слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным Fab-фрагментом или частями Fab-фрагмента; слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; слитые молекулы Fab, в которых разные Fab-фрагменты слиты друг с другом; антитела из тяжелых цепей на основе ScFv и диател (например, доменные антитела, нанотела), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv, или разные диатела, или разные антитела из тяжелых цепей (например, доменные антитела, нанотела) слиты друг с другом, или с другим белком, или молекулой-носителем.

[00139] В некоторых вариантах осуществления IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами CH3 включают в себя молекулы Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotechthe), «выступы во впадины» (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически-спариваемые (Amgen), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и DuoBody (Genmab A/S).

[00140] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные

молекулы двойного нацеливания включают в себя молекулы (DT)-Ig двойного нацеливания (GSK/Domantis), антитело «два в одном» (Genentech), поперечносшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-body (CovX/Pfizer).

[00141] В некоторых вариантах осуществления слитые молекулы IgG включают в себя молекулы (DVD)-Ig с двойным варибельным доменом (DVD) (Abbott), IgG-подобную биспецифическую молекулу (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche).

[00142] В некоторых вариантах осуществления слитые Fc-молекулы включают в себя слияния ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и Dual(ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай).

[00143] В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела со слитыми Fab включают в себя F(ab)₂ (Medarex/AMGEN), «двойного действия» или Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентное биспецифическое антитело (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают в себя, без ограничений, биспецифический T-клеточный активатор (BiTE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь.

[00144] Полноразмерные биспецифические антитела изобретения можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, вводя в СНЗ-интерфейс тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, либо *in vitro* в бесклеточной среде, либо с использованием совместной экспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных участках исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй исходной молекулы моноспецифического антитела, и одновременно СНЗ-домены исходных антител высвобождаются и происходит переформирование путем диссоциации-ассоциации. СНЗ-домены Fab-плеч можно конструировать с возможностью обеспечения гетеродимеризации, а не гомодимеризации. Полученный продукт представляет собой биспецифическое антитело, имеющее два Fab-плеча, или полумолекулы, каждое из которых связывается с отдельным эпитопом, т.е. эпитопом на CD33 и эпитопом на CD3.

[00145] Термин «гомодимеризация» в настоящем документе обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В настоящем документе термин «гомодимер» обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

В настоящем документе термин «гетеродимеризация» обозначает взаимодействие двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. В настоящем документе термин «гетеродимер» обозначает антитело, имеющее две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

[00146] Для создания полноразмерных биспецифических антител можно использовать стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикация № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СНЗ в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СНЗ, способствуя образованию гетеродимера. Аминокислоту с короткой боковой цепью (впадина) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается с первым антигеном, а аминокислоту с длинной боковой цепью (выступ) вводят в тяжелую цепь антитела, которое специфически связывается со вторым антигеном. После совместной экспрессии двух антител в результате предпочтительного взаимодействия тяжелой цепи с «впадиной» и тяжелой цепи с «выступом» образуется гетеродимер. Примерами пар замен в СНЗ, образующих выступ и впадину, являются (указано как модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

[00147] Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СНЗ и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СНЗ, как описано в патентной публикации США № US2010/0015133; патентной публикации США № US2009/0182127; патентной публикации США № US2010/028637 или патентной публикации США № US2011/0123532. В других стратегиях гетеродимеризацию можно стимулировать путем следующих замен (указано модифицированное положение в первом домене СНЗ первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СНЗ второй тяжелой цепи): L351Y_F405AY407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V K409F Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в патентной публикации США № US2012/0149876 или патентной публикации США № US2013/0195849.

[00148] В дополнение к вышеописанным способам, биспецифические антитела изобретения можно создавать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные

мутации в СНЗ-областях двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстановительных условиях, что способствует изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № W02011/131746. В этих способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD33) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (например, антитело к CD3) конструируют так, чтобы они имели определенные замены в домене СНЗ, способствующие стабильность гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для обеспечения подверженности цистеинов в шарнирной области изомеризации дисульфидной связи; получая таким образом биспецифическое антитело в результате обмена плечами Fab. Условия инкубации можно оптимально вернуть к невозстановительным условиям. Примерами восстанавливающих агентов, которые можно использовать, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозеритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстанавливающий агент выбирают из группы, состоящей из: 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20 °С в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при уровне pH 5-8, например при pH=7,0 или при pH=7,4.

[00149] В определенных вариантах антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно;
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно;

p. SEQ ID NO: 357, 358, 359, 480, 481 и 482, соответственно;
 q. SEQ ID NO: 372, 373, 374, 495, 496 и 497, соответственно;
 r. SEQ ID NO: 375, 376, 377, 498, 499 и 500, соответственно;
 s. SEQ ID NO: 381, 382, 383, 504, 505 и 506, соответственно;
 t. SEQ ID NO: 384, 385, 386, 507, 508 и 509, соответственно;
 u. SEQ ID NO: 390, 391, 392, 510, 511 и 512, соответственно;
 v. SEQ ID NO: 393, 394, 395, 513, 514 и 515, соответственно;
 w. SEQ ID NO: 396, 397, 398, 516, 517 и 518, соответственно;
 x. SEQ ID NO: 399, 400, 401, 519, 520 и 521, соответственно;
 y. SEQ ID NO: 405, 406, 407, 525, 526 и 527, соответственно;
 z. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 534, 535 и 536, соответственно;
 aa. SEQ ID NO: 417, 418, 419, 537, 538 и 539, соответственно;
 bb. SEQ ID NO: 420, 421, 422, 540, 541 и 542, соответственно;
 cc. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 549, 550 и 551, соответственно;
 dd. SEQ ID NO: 432, 433, 434, 552, 553 и 554, соответственно;
 ee. SEQ ID NO: 435, 436, 437, 555, 556 и 557, соответственно;
 ff. SEQ ID NO: 438, 439, 440, 558, 559 и 560, соответственно;
 gg. SEQ ID NO: 441, 442, 443, 561, 562 и 563, соответственно;
 hh. SEQ ID NO: 450, 451, 452, 570, 571 и 572, соответственно;
 ii. SEQ ID NO: 453, 454, 455, 573, 574 и 575, соответственно;
 jj. SEQ ID NO: 456, 457, 458, 576, 577 и 578, соответственно;
 kk. SEQ ID NO: 459, 460, 461, 579, 580 и 581, соответственно;
 ll. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 582, 583, и 584, соответственно;
 mm. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 585, 586 и 587, соответственно; или
 nn. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 480, 481 и 482, соответственно;

и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- 1) SEQ ID NO: 342, 343, 344, 465, 466 и 467, соответственно; или
- 2) SEQ ID NO: 345, 346, 347, 468, 469 и 470, соответственно.

[00150] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из SEQ ID NO: 259-296, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из SEQ ID NO: 300-338; и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую

полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 257 или 258, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 85%, предпочтительно 90%, более предпочтительно 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентична SEQ ID NO: 298 или 299.

[00151] В определенных вариантах осуществления биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 292, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 332; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 291, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 331; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 302; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 310; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 280, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 322; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 259, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 300; и переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263, и переменную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 336; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

bbbb. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 337; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

сссс. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 281, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 338; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299; или

dddd. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299.

[00152] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к CD33 или его антигенсвязывающему фрагменту, которое индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ). Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может, например, индуцировать АЗКЦ *in vitro*. Моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может индуцировать АЗКЦ с EC_{50} менее чем около 2 нМ. В определенных вариантах осуществления EC_{50} составляет менее около 2,0 нМ, менее около 1,9 нМ, менее около 1,8 нМ, менее около 1,7 нМ, менее около 1,6 нМ, менее около 1,5 нМ, менее около 1,4 нМ, менее около 1,3 нМ, менее около 1,2 нМ, менее около 1,1 нМ, менее около 1,0 нМ, менее около 0,9 нМ, менее около 0,8 нМ, менее около 0,7 нМ, менее около 0,6 нМ, менее около 0,5 нМ, менее около 0,4 нМ, менее около 0,3 нМ, менее около 0,2 нМ или менее около 0,1 нМ. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит остов IgG1 с низким содержанием фукозы.

[00153] В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, иммуноэффекторные свойства CD33-специфических антител могут быть усилены или ослаблены за счет модификаций Fc с помощью методик, известных специалистам в данной области техники. Например, эффекторные функции Fc-фрагмента, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC), антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (ADCP), понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клетки; BCR) и т. п., могут обеспечиваться и/или

управляться модифицирующими остатками в Fc-фрагменте, ответственными за эти действия.

[00154] «Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность», или ADCC, представляет собой клеточно-опосредованную реакцию, при которой неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRc) (например, естественные киллерные (ЕК) клетки, нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени и впоследствии вызывают лизис клетки-мишени.

[00155] Способность моноклональных антител индуцировать ADCC можно усилить путем конструирования их олигосахаридного компонента. IgG1 или IgG3 человека претерпевают N-гликозилирование по Asn297 большинством гликанов в хорошо известных 2-антенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Антитела, продуцируемые несконструированными клетками CHO, как правило, имеют содержание фукозы в гликанах по меньшей мере около 85%. Удаление центральной фукозы из олигосахаридов типа 2-антенарного комплекса, присоединенных к областям Fc, усиливает ADCC антител посредством улучшенного связывания Fc.гамма.RIIIa без изменения связывания с антигеном или CDC-активности. Такие mAb можно получать с помощью различных способов, которые, по имеющимся данным, приводят к успешной экспрессии антител с относительно высокой степенью дефукозилирования, несущих Fc-олигосахариды типа 2-антенарного комплекса, такими способами, как контроль осмоляльности культуральной среды (Konno et al., *Cytotechnology* 64:249-65, 2012), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии CHO Lec13 (Shields et al., *J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), применение в качестве линии клеток-хозяев вариантной линии клеток CHO EB66 (Olivier et al., *MAbs*; 2(4), 2010; электронное издание до печатного издания; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы крыс YB2/0 в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa et al., *J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфической к гену α -1,6-фукозилтрансферазы (FUT8) (Mori et al., *Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α -маннозидазы II комплекса Гольджи, или применение сильного ингибитора альфа-маннозидазы I, кифунензина (Ferrara et al., *J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara et al., *Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou et al., *Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

[00156] В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, ADCC, вызванную антителами к CD33, также можно усилить путем введения некоторых замен в Fc-область антитела. Примерами замен являются, например, замены в аминокислотных позициях 256, 290, 298, 312, 356, 330, 333, 334, 360, 378 или 430 (нумерация остатков в соответствии с индексом ЕС), как описано в патенте США № 6,737,056.

[00157] В соответствии с другим конкретным аспектом данное изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к CD33 или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связываться с CD33 с константой

диссоциации (KD) менее около 5×10^{-8} М. В определенных вариантах осуществления константа диссоциации составляет менее около 5×10^{-8} М, менее 1×10^{-8} М, менее 5×10^{-9} М, менее 1×10^{-9} М, менее 5×10^{-10} М, менее 1×10^{-10} М, менее 5×10^{-11} М или менее 1×10^{-11} М.

[00158] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к CD33 или его антигенсвязывающему фрагменту, которое способно связываться с CD33 и индуцировать интернализацию CD33 с EC_{50} менее около 2 нМ. В определенных вариантах осуществления EC_{50} составляет менее около 2,0 нМ, менее около 1,9 нМ, менее около 1,8 нМ, менее около 1,7 нМ, менее около 1,6 нМ, менее около 1,5 нМ, менее около 1,4 нМ, менее около 1,3 нМ, менее около 1,2 нМ, менее около 1,1 нМ, менее около 1,0 нМ, менее около 0,9 нМ, менее около 0,8 нМ, менее около 0,7 нМ, менее около 0,6 нМ, менее около 0,5 нМ, менее около 0,4 нМ, менее около 0,3 нМ, менее около 0,2 нМ и менее около 0,1 нМ.

[00159] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному биспецифическому антителу к CD33/CD3 или его антигенсвязывающему фрагменту, способному индуцировать Т-клеточно-зависимую цитотоксичность в CD33-экспрессирующих клетках. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут, например, индуцировать Т-клеточно-зависимую цитотоксичность в CD33-экспрессирующих клетках *in vitro* со значением EC_{50} менее около 2 нМ. В определенных вариантах осуществления EC_{50} составляет менее около 2,0 нМ, менее около 1,9 нМ, менее около 1,8 нМ, менее около 1,7 нМ, менее около 1,6 нМ, менее около 1,5 нМ, менее около 1,4 нМ, менее около 1,3 нМ, менее около 1,2 нМ, менее около 1,1 нМ, менее около 1,0 нМ, менее около 0,9 нМ, менее около 0,8 нМ, менее около 0,7 нМ, менее около 0,6 нМ, менее около 0,5 нМ, менее около 0,4 нМ, менее около 0,3 нМ, менее около 0,2 нМ и менее около 0,1 нМ.

[00160] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к CD33 и/или выделенному биспецифическому антителу к CD33/CD3 или его антигенсвязывающему фрагменту, где моноклональное антитело к CD33 или биспецифическое антитело к CD33/CD3, или их антигенсвязывающий фрагмент являются химерными.

[00161] В соответствии с другим конкретным аспектом изобретение относится к выделенному моноклональному антителу к CD33 и/или выделенному биспецифическому антителу к CD33/CD3 или его антигенсвязывающему фрагменту, где моноклональное антитело к CD33 или биспецифическое антитело к CD33/CD3, или их антигенсвязывающий фрагмент являются человеческими или гуманизированными.

[00162] В другом общем аспекте данное изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. В другом общем аспекте данное изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что кодирующая

последовательность белка может быть изменена (например, путем замены, делеции, вставки и т. п.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалистам в данной области техники будет понятно, что последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие моноклональные антитела и/или биспецифические антитела согласно данному изобретению, могут быть изменены без изменения аминокислотных последовательностей белков.

[00163] В другом общем аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. В другом общем аспекте данное изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плаزمид, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой рекомбинантный экспрессионный вектор, такой как плазмид. Вектор может включать любой элемент для обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессионных векторов, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем изобретении для получения в клетке антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Для генерации рекомбинантного экспрессионного вектора по вариантам осуществления изобретения можно использовать традиционные клональные методы или синтез искусственных генов. Такие методики хорошо известны специалистам в данной области техники в контексте данного описания.

[00164] В другом общем аспекте изобретение данное относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело и/или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно изобретению. В контексте настоящего описания для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов настоящего описания можно применять любую клетку-хозяин, известную специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab-антитела), клетки CHO-DG44, или CHO-K1, или клетки HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления рекомбинантный вектор экспрессии трансформируют в клетки-хозяева традиционными способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрируется в геном клетки-хозяина так, что рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессируется.

[00165] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу

получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента согласно изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или клеточной культуры (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми методиками, известными в данной области техники и как описано в данном документе.

Фармацевтические композиции

[00166] В другом общем аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. В другом общем аспекте данное изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Термин «фармацевтическая композиция» в контексте настоящего документа означает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и содержащие их композиции также используют при производстве лекарственного препарата для терапевтических целей, упомянутых в данном документе.

[00167] В контексте настоящего документа термин «носитель» относится к любому эксципиенту, разбавителю, наполнителю, соли, буферному раствору, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, везикуле, содержащей липид, микросфере, липосомальной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области техники, для применения в фармацевтических составах. Следует понимать, что характеристики носителя, эксципиента или разбавителя будут зависеть от способа введения для конкретного применения. Используемый в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному материалу, который не оказывает негативное влияние на эффективность композиции в соответствии с настоящим изобретением или биологической активности композиции в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с конкретными вариантами осуществления в свете настоящего описания в настоящем изобретении можно использовать любой

фармацевтически приемлемый носитель, приемлемый для применения в фармацевтической композиции на основе антитела.

[00168] Состав, содержащий фармацевтически активные ингредиенты с фармацевтически приемлемыми носителями известен в данной области техники, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, издание 21 (2005) и любые последующие издания). Не имеющие ограничительного характера примеры дополнительных ингредиентов включают буферные растворы, разбавители, растворители, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или более фармацевтически приемлемых носителей можно применять при составлении фармацевтических композиций изобретения.

[00169] В одном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т. е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т. п. Водный состав обычно содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды, или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

[00170] В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию можно готовить в виде инъекционного препарата, который можно вводить, например, посредством инъекционного устройства (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекция может быть, например, доставлена подкожно, внутримышечно, внутривенно, интравитреально или внутривенно.

[00171] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно применять в состоянии как есть или к которой врач или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед применением. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или таблетки, покрытые оболочкой, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также быть в форме, например, пакетов саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для растворения.

[00172] Лекарственные формы могут представлять собой формы с немедленным высвобождением, где в этом случае они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут быть с отсроченным высвобождением, с замедленным высвобождением или с модифицированным высвобождением, и в этом случае они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

[00173] В других вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, внутривенно или сублингвально.

[00174] Значение pH в водном составе может находиться в диапазоне от pH 3 до pH 10. В одном варианте осуществления изобретения pH состава равен от около 7,0 до около

9,5. В другом варианте осуществления изобретения рН состава равен от около 3,0 до около 7,0.

[00175] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буферный раствор. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают: аргинин, аспарагиновую кислоту, бичин, цитрат, двузамещенный гидрофосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, винную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)-аминометан и их смеси. Буферный раствор может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических буферных растворов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00176] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Не имеющие ограничительного характера примеры буферных растворов включают хлорид бензетония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенезин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидомочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксietанол, 2-фенилэтанол, пропил-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомерсал и их смеси. Консервант может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических консервантов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00177] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит изотонический агент. Неограничивающие примеры данного варианта осуществления включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновую кислоту, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол, пропиленгликоль, 1,3-пропандиол, 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического агента включает сахар. Не имеющие ограничительного характера примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды или водорастворимые глюканы, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа- и бета-ГПЦД, растворимый крахмал, гидроксиэтилкрахмал и натрий карбоксиметилцеллюлозу. Другим примером изотонического агента является сахарный спирт, где термин «сахарный спирт» определяют как C(4-8) углеводород, имеющий по меньшей мере одну гидроксильную группу. Не имеющие ограничительного характера примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозит, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Фармацевтические композиции, содержащие каждый

изотонический агент, указанный в данном параграфе, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения. Изотонический агент может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических изотонических агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00178] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Не имеющие ограничительного характера примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих специфических хелатирующих агентов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00179] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Не имеющие ограничительного характера примеры стабилизаторов включают один или более ингибиторов агрегации, один или более ингибиторов окисления, одно или более поверхностно-активных веществ и/или один или более ингибиторов протеазы.

[00180] В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как ГПЦ, ГПЦ-SL, ГПЦ-L и ГПМЦ), циклодекстрины, 2-метилтиозанол, полиэтиленгликоль (такой как PEG 3350), поливиниловый спирт (ПВС), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), серосодержащие соединения, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевую кислоту. Стабилизатор может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,01 мг/мл до около 50 мг/мл, например от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00181] В дополнительных вариантах осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит одно или более поверхностно-активных веществ, предпочтительно одно поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин «поверхностно-активное вещество» относится к любым молекулам или ионам, которые образованы из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерионных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может

присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00182] В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит один или более ингибиторов протеазы, таких как, например, ЭДТА и/или гидрохлорид бензамидина (HCl). Ингибитор протеазы может присутствовать отдельно или в составе агрегата в концентрации от около 0,1 мг/мл до около 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеазы, представляют собой альтернативные варианты осуществления изобретения.

[00183] В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции. В другом общем аспекте данное изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение биспецифического антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Способы применения изобретения

[00184] В еще одном общем аспекте данное изобретение относится к способу нацеливания на CD33 на поверхности раковых клеток у субъекта, где способ содержит стадии, на которых: вводят субъекту выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает CD33, или биспецифическое антитело к CD33/CD3, или его антигенсвязывающий фрагмент, или фармацевтическую композицию по изобретению.

[00185] В данном документе также предусмотрен иммуноконъюгат терапевтического антитела к CD33, содержащий терапевтический агент, который выбран из группы, состоящей из атомов радионуклида, бора, гадолиния или урана, иммуномодулятора, например, цитокина, фактора роста стволовых клеток, лимфотоксина, например, фактора некроза опухоли (ФНО), гемопоэтического фактора, например, интерлейкина (ИЛ), колониестимулирующего фактора (КСФ), например, гранулоцитарно-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) или гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ), интерферона (ИФН), например, интерферона- α , - β или - γ , и фактора роста стволовых клеток, например, «фактора S1», гемопоэтического фактора, эритропоэтина, тромбопоэтина, антитела, гормона, антагониста гормона, фермента, ингибитора фермента, фотоактивного терапевтического агента, цитотоксического лекарственного средства, например, антимиотических агентов, алкилирующих агентов, антиметаболических агентов, агентов, ингибирующих ангиогенез,

апоптозных агентов, алкалоидных агентов, агентов, ингибирующих ЦОГ-2, и антибиотических агентов, цитотоксического токсина, например, растительных токсинов, микробных токсинов и токсинов животных, их синтетических вариантов, ингибитора ангиогенеза, другого антитела и их комбинации. В предпочтительном варианте осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-18, ИЛ-21, интерферона- γ , ФНО- α и их комбинации, радионуклид выбран из группы, состоящей из омега-излучателя, бета-излучателя и альфа-излучателя, например, P-32, P-33, Sc-47, Fe-59, Cu-64, Cu-67, Se-75, As-77, Sr-89, Y-90, Mo-99, Rh-105, Pd-109, Ag-111, I-125, I-131, Pr-142, Pr-143, Pm-149, Sm-153, Tb-161, Ho-166, Er-169, Lu-177, Re-186, Re-188, Re-189, Ir-194, Au-198, Au-199, Pb-211, Pb-212, and Bi-213, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m, Ir-192, Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213, Fm-255, B-10, Gd-157, U-235, и их комбинации. Предпочтительно радионуклид имеет энергию от 20 до 10000 кэВ.

[00186] Функциональная активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD33, может быть охарактеризована способами, известными в данной области техники и описанными в данном документе. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD33, включают, но не ограничиваются ими, анализы аффинности и специфичности, включая анализ Вiascore, ИФА и проточную цитометрию; анализы связывания для обнаружения связывания антител с CD33 на раковых клетках с помощью проточной цитометрии. В соответствии с конкретными вариантами осуществления способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с CD33, включают способы, описанные ниже.

[00187] В другом общем аспекте изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое специфически связывает CD33, или фармацевтической композиции согласно данному изобретению. Злокачественное новообразование может представлять собой, например, злокачественное новообразование, экспрессирующее CD33. Злокачественное новообразование, например, может быть выбрано, но не ограничиваясь этим, из рака легкого, рака желудка, рака толстой кишки, гепатоцеллюлярной карциномы, почечно-клеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастатической меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, а также неходжкинской лимфомы (НХЛ), острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы (ММ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) и других опухолей крови и костного мозга. Злокачественное новообразование может представлять собой, например, злокачественное новообразование, гемобластоз.

Гемобластоз может, например, представлять собой лейкоз, лимфому и миелому. В определенных вариантах осуществления гемобластоз может представлять собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС, низкого или высокого риска), острый лимфолейкоз (ОЛЛ, включая все подтипы), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), или опухоль из бластных плазматоидных дендритических клеток (ОБПДК).

[00188] Согласно вариантам осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела к CD33 или его антигенсвязывающего фрагмента. Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к некоторому количеству активного ингредиента или компонента, которые индуцируют желаемый биологический или медицинский ответ у пациента. Терапевтически эффективное количество может быть определено эмпирически и обычным образом в зависимости от заявленной цели.

[00189] Используемое в данном документе со ссылкой на антитела к CD33 или их антигенсвязывающих фрагментов терапевтически эффективное количество означает количество антитела к CD33 или его антигенсвязывающего фрагмента, которое модулирует иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта.

[00190] В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтически эффективное количество относится к количеству препарата, которого достаточно для обеспечения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) снижение или облегчение серьезности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (ii) сокращение продолжительности заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iii) профилактика прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (iv) провоцирование регрессии заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (v) профилактика развития или появления заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vi) профилактика повторения заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома; (vii) уменьшение вероятности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (viii) снижение продолжительности госпитализации пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние, подлежащее лечению, или связанный с ним симптом; (ix) повышение выживаемости пациента с заболеванием, расстройством или состоянием, подлежащим лечению, или связанным с ним симптомом; (xi) торможение или подавление заболевания, расстройства или состояния, подлежащего лечению, или связанного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического (-их) или терапевтического (-их) эффекта (-ов) другой терапии.

[00191] Терапевтически эффективное количество или дозировка может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как заболевание, расстройство

или состояние, подлежащее лечению, средства введения, участка-мишени, физиологического состояния субъекта (включая, например, возраст, массу тела, здоровье), является ли субъект человеком или животным, других введенных лекарственных средств и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозировки лечения подбирали оптимальным образом для оптимизации безопасности и эффективности.

[00192] В соответствии с конкретными вариантами осуществления композиции, описанные в данном документе, составлены с обеспечением их приемлемости для предполагаемого способа введения пациенту. Например, композиции, описанные в данном документе, могут быть составлены так, чтобы быть приемлемыми для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

[00193] В контексте данного документа термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению или возврату в исходное состояние по меньшей мере одного измеряемого физического параметра, относящегося к злокачественному новообразованию, который не обязательно очевиден у пациента, но может быть видимым у пациента. Термины «лечить», «лечащий» и «лечение» могут также обозначать индуцирование регрессии, профилактику прогрессирования или по меньшей мере замедление прогрессирования заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к облегчению, профилактике развития или появления или уменьшения продолжительности одного или более симптомов, связанных с заболеванием, расстройством или патологическим состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно рак. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к профилактике рецидива заболевания, расстройства или состояния. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к повышению выживаемости пациента, имеющего заболевание, расстройство или состояние. В конкретном варианте осуществления термины «лечить», «лечащий» и «лечение» относятся к устранению заболевания, расстройства или состояния у пациента.

[00194] В соответствии с конкретными вариантами осуществления предложены композиции, используемые в лечении злокачественного. Для терапии злокачественного новообразования композиции можно применять в комбинации с другим лечением, включая, без ограничений, химиотерапию, мкАт к CD20, мкАт к TIM-3, антитело к CTLA-4, антитело к PD-L1, антитело к PD-1, терапевтический препарат к PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенный агент, лучевую терапию, конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC), таргетную терапию или другие противораковые лекарственные средства.

[00195] Используемый в настоящем документе термин «в комбинации» в контексте введения пациенту двух или более лекарственных средств относится к применению более одной терапии. Использование термина «в комбинации» не ограничивает порядок введения лекарственных средств субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, описанную в настоящем документе композицию) можно вводить до

(например, за 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель), после (например, через 5 минут, 15 минут, 30 минут, 45 минут, 1 час, 2 часа, 4 часа, 6 часов, 12 часов, 16 часов, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель) введения второго терапевтического средства пациенту или одновременно с таким введением.

ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[00196] В данном изобретении предложены следующие не имеющие ограничительного характера варианты осуществления.

[00197] Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает С2-домен CD33.

[00198] Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарную область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарную область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно; или
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD33, предпочтительно человеческий CD33.

[00199] Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1 или 2, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 292, 291,

261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284 или 285, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 332, 331, 302, 310, 320, 300, 304, 305, 306, 307, 317, 319, 324 или 325.

[00200] Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-3, содержащее:

a. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 292, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 332;

b. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 291, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 331;

c. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 302;

d. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 310;

e. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 280, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 322;

f. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 259, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 300;

g. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 304;

h. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 264, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 305;

i. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 265, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 306;

j. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 266, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307;

k. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 272, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307;

l. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 277, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 317;

m. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 279, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 319;

n. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 284, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 324; или

o. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 325.

[00201] Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности SEQ ID NO:

- a. SEQ ID NO: 357, 358, 359, 480, 481 и 482, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 372, 373, 374, 495, 496 и 497, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 375, 376, 377, 498, 499 и 500, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 381, 382, 383, 504, 505 и 506, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 384, 385, 386, 507, 508 и 509, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 390, 391, 392, 510, 511 и 512, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 393, 394, 395, 513, 514 и 515, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 396, 397, 398, 516, 517 и 518, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 399, 400, 401, 519, 520 и 521, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 405, 406, 407, 525, 526 и 527, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 534, 535 и 536, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 417, 418, 419, 537, 538 и 539, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 420, 421, 422, 540, 541 и 542, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 549, 550 и 551, соответственно;
- o. SEQ ID NO: 432, 433, 434, 552, 553 и 554, соответственно;
- p. SEQ ID NO: 435, 436, 437, 555, 556 и 557, соответственно;
- q. SEQ ID NO: 438, 439, 440, 558, 559 и 560, соответственно;
- r. SEQ ID NO: 441, 442, 443, 561, 562 и 563, соответственно;
- s. SEQ ID NO: 450, 451, 452, 570, 571 и 572, соответственно;
- t. SEQ ID NO: 453, 454, 455, 573, 574 и 575, соответственно;
- u. SEQ ID NO: 456, 457, 458, 576, 577 и 578, соответственно;
- v. SEQ ID NO: 459, 460, 461, 579, 580 и 581, соответственно;
- w. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 582, 583 и 584, соответственно;

х. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 585, 586 и 587, соответственно; или

у. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 480, 481 и 482, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD33, предпочтительно человеческий CD33.

[00202] Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 5, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична одной из SEQ ID NO: 260, 262, 267, 268, 270, 271, 273, 274, 275, 276, 278, 281, 282, 283, 286, 287, 288, 289, 290, 293, 294, 295 или 296, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична одной из SEQ ID No: 301, 303, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 333, 334, 335, 336, 337 или 338.

[00203] Вариант осуществления 7 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент согласно варианту осуществления 5 или 6, содержащее:

а. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 260, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 301;

б. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 262, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303;

в. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 267, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 308;

г. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 268, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 309;

д. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 270, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 311;

е. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 271, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 312;

ж. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 273, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 313;

з. переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 274, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 314;

последовательность SEQ ID NO: 295, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 335;

w. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 336;

x. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 337;

y. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 281, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 338; или

z. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303.

[00204] Вариант осуществления 8 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-4, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) *in vitro* с EC₅₀ менее около 2 нМ.

[00205] Вариант осуществления 9 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 8, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит остов IgG1 с низким содержанием фукозы.

[00206] Вариант осуществления 10 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-7, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD33 с константой диссоциации (KD) менее чем около 5×10^{-9} М.

[00207] Вариант осуществления 11 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-7, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD33 и индуцирует интернализацию с EC₅₀ менее около 2 нМ.

[00208] Вариант осуществления 12 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-11, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент ингибирует активность CD33.

[00209] Вариант осуществления 13 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент любого из вариантов осуществления 1-12, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

[00210] Вариант осуществления 14 представляет собой выделенное

моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

[00211] Вариант осуществления 15 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с терапевтическим агентом.

[00212] Вариант осуществления 16 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-14.

[00213] Вариант осуществления 17 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 16.

[00214] Вариант осуществления 18 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор по варианту осуществления 17.

[00215] Вариант осуществления 19 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00216] Вариант осуществления 20 представляет собой способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 19.

[00217] Вариант осуществления 21 представляет собой способ варианта осуществления 20, в котором злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз.

[00218] Вариант осуществления 22 представляет собой способ по варианту осуществления 21, в котором гемобластоз выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы или множественной миеломы.

[00219] Вариант осуществления 23 представляет собой способ по варианту осуществления 22, в котором гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритических клеток (ОБПДК).

[00220] Вариант осуществления 24 представляет собой способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-14, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения моноклонального антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[00221] Вариант осуществления 25 представляет собой способ получения

фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-14, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

[00222] Вариант осуществления 26 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3, содержащее антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно; или
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно;

и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- 1) SEQ ID NO: 342, 343, 344, 465, 466 и 467, соответственно; или
- 2) SEQ ID NO: 345, 346, 347, 468, 469 и 470, соответственно.

[00223] Вариант осуществления 27 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 25, где антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 292, 291, 261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284 или 285, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 332, 331, 302, 310, 320, 300, 304, 305, 306, 307, 317, 319, 324 или 325; и антитело к CD3 или его

[00226] Вариант осуществления 30 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3, содержащее антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- a. SEQ ID NO: 357, 358, 359, 480, 481 и 482, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 372, 373, 374, 495, 496 и 497, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 375, 376, 377, 498, 499 и 500, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 381, 382, 383, 504, 505 и 506, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 384, 385, 386, 507, 508 и 509, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 390, 391, 392, 510, 511 и 512, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 393, 394, 395, 513, 514 и 515, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 396, 397, 398, 516, 517 и 518, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 399, 400, 401, 519, 520 и 521, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 405, 406, 407, 525, 526 и 527, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 534, 535 и 536, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 417, 418, 419, 537, 538 и 539, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 420, 421, 422, 540, 541 и 542, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 549, 550 и 551, соответственно;
- o. SEQ ID NO: 432, 433, 434, 552, 553 и 554, соответственно;
- p. SEQ ID NO: 435, 436, 437, 555, 556 и 557, соответственно;
- q. SEQ ID NO: 438, 439, 440, 558, 559 и 560, соответственно;
- r. SEQ ID NO: 441, 442, 443, 561, 562 и 563, соответственно;
- s. SEQ ID NO: 450, 451, 452, 570, 571 и 572, соответственно;
- t. SEQ ID NO: 453, 454, 455, 573, 574 и 575, соответственно;
- u. SEQ ID NO: 456, 457, 458, 576, 577 и 578, соответственно;
- v. SEQ ID NO: 459, 460, 461, 579, 580 и 581, соответственно;
- w. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 582, 583 и 584, соответственно;
- x. SEQ ID NO: 414, 415, 416, 585, 586 и 587, соответственно; или
- y. SEQ ID NO: 429, 430, 431, 480, 481 и 482, соответственно;

и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- 1) SEQ ID NO: 342, 343, 344, 465, 466 и 467, соответственно; или
- 2) SEQ ID NO: 345, 346, 347, 468, 469 и 470, соответственно.

[00227] Вариант осуществления 31 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 29, которое содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную

последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична одной из SEQ ID NO: 260, 262, 267, 268, 270, 271, 273, 274, 275, 276, 278, 281, 282, 283, 286, 287, 288, 289, 290, 293, 294, 295 или 296, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична одной из SEQ ID NO: 301, 303, 308, 309, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 318, 321, 322, 323, 326, 327, 328, 329, 330, 333, 334, 335, 336, 337 или 338; и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 257 или 258, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 298 или 299.

[00228] Вариант осуществления 32 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 29 или 30, содержащее:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 260, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 301; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 262, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 267, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 308; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 268, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 309; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 270, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 311; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 257, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 298;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 271, и вариабельную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 333; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

uu. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 294, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 334; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

vv. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 295, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 335; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

ww. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 296, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 336; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

xx. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 337; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299;

аминокислотную последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 281 и аминокислотную последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 338; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299; или

zz. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 286, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 303; и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 258, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 299.

[00229] Вариант осуществления 33 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 26-32, которое индуцирует Т-клеточно-зависимую цитотоксичность в CD33-экспрессирующих клетках *in vitro* со значением EC_{50} менее около 1 нМ.

[00230] Вариант осуществления 34 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 26-33, который является химерным.

[00231] Вариант осуществления 35 представляет собой биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 26-34, которое является человеческим или гуманизированным.

[00232] Вариант осуществления 36 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 26-35.

[00233] Вариант осуществления 37 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 36.

[00234] Вариант осуществления 38 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор по варианту осуществления 37.

[00235] Вариант осуществления 39 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 26-35 и фармацевтически приемлемый носитель.

[00236] Вариант осуществления 40 представляет собой способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по варианту осуществления 39.

[00237] Вариант осуществления 41 представляет собой способ по варианту осуществления 40, в котором злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз.

[00238] Вариант осуществления 42 представляет собой способ по варианту осуществления 41, в котором гемобластоз выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы или множественной миеломы.

[00239] Вариант осуществления 43 представляет собой способ по варианту осуществления 42, в котором гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритических клеток (ОБПДК).

[00240] Вариант осуществления 44 представляет собой способ получения биспецифического антитела к CD33/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 26-35, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело к CD33/CD3 или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения биспецифического антитела к CD33/CD3 или антигенсвязывающего фрагмента, и выделения биспецифического антитела CD33/CD3 или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

[00241] Вариант осуществления 45 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело к CD33/CD3 или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 26-35, включающий объединение биспецифического антитела к CD33/CD3 или его

антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

ПРИМЕРЫ

[00242] Реагенты

[00243] Генерация антигенов

[00244] Белки CD33 человека и яванского макака получали с или без мутированной мономерной формы человеческого сывороточного альбумина (HSA), Uniprot P02768 с мутацией C58S, слитой на С-конце для иммунизаций и анализов. кДНК, кодирующие антигены белка CD33 с шестигистидиновой меткой, синтезировали и клонировали в вектор экспрессии для секреции у млекопитающих под действием промотора актина с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

[00245] Внеклеточный домен (ВКД) полноразмерного CD33 человека, полученный из Uniprot P20138 (SEQ ID NO: 1) (ВКД CD33 человека), сливали на N-конце с сигнальной последовательностью и с HSA или без нее, после чего следовали шесть гистидиновых меток на С-конце, ВКД hCD33 с HSA и только ВКД hCD33). Конструкт, экспрессирующий CD33 человека, транзientно трансфицировали в клетки, полученные из HEK293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific; г. Уолтем, штат Массачусетс, США) с использованием Expiectamine в соответствии с протоколом производителя. Перед сбором клетки инкубировали в течение 5 дней при 37 °C в атмосфере с 8% CO₂ на орбитальном шейкере. Экспрессирующие клетки удаляли центрифугированием и растворимый CD33 очищали из среды с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованных ионах металла с использованием смолы Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare; г. Масс-Чалфонт, Великобритания) с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) Superdex 200 (GE Healthcare) в фосфатно-солевом буфере Дульбекко, pH 7,2 (1x DPBS). Элюированные фракции SEC, за исключением любых дисульфидных агрегатов, объединяли и стерилизовали фильтрованием, чтобы получить конечный белок для иммунизации и анализов CD33. Концентрацию белка определяли путем измерения при длине волны A280, а качество очищенного белка оценивали методом ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической эксклюзионной хроматографии (Phenomenex; г. Торранс, штат Калифорния). Измерения эндотоксинов проводили с использованием кассет EndoSafe-PTS, хромогенного теста с лизатом амебоцитов мечехвоста (Charles River; г. Уилмингтон, штат Массачусетс).

[00246] Человеческие белки субдомена ВКД CD33, V-домен hCD33 с HSA, V-домен hCD33 с His, C2-домен hCD33 с HSA и C2-домен hCD33 с His сконструировали, экспрессировали и очищали в виде ВКД полноразмерного человеческого CD33.

[00247] Конструкты CD33 яванского макака для анализов иммунизации и перекрестной селективности, ВКД CD33 яванского макака с HSA, CD33 яванского макака с His, также были созданы на основе последовательности Genbank XP_005590138.1. Экспрессия и очистка белка CD33 яванского макака были такими же, как и для белков CD33 человека.

[00248] Антигены CD33 для скрининга биотинилировали в 50 мМ натрий фосфата при pH 7,2 с использованием набора SureLink Chromagenic Biotin Labeling (SeraCare KPL) в соответствии с условиями производителями. Вкратце, к белку CD33 добавляли исходный раствор биотина с концентрацией 25 мМ в молярном соотношении 4:1 биотина к белку и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут при осторожном вращении, а затем переводили его на температуру 4 °С и инкубировали в течение еще 2 часов. Невключенный биотин удаляли путем замены буфера на 1x ФСБД. Концентрацию белка и включение биотина определяли путем измерения при длине волны A280 нм и A354 нм с использованием прибора NanoDrop. Последовательности каждого из антигенов, описанных выше, приведены в таблице 1.

[00249] Таблица 1. Последовательности антигена

Название белка	ID белка	SEQ ID NO
ВКД CD33 яванского макака с HSA	C33W1	2
ВКД CD33 человека с HSA	C33W2	3
V-домен CD33 человека с HSA	C33W3	4
C2-домен CD33 человека с HSA	C33W4	5
V-домен CD33 человека с His	C33W8	6
C2-домен CD33 человека с His	C33W9	7
ВКД CD33 человека с His	C33W49	8
ВКД CD33 яванского макака с His	C33W50	9
CD33 человека, полноразмерный		10
CD33 яванского макака, полноразмерный		11

[00250] Создание изогенных линий клеток, экспрессирующих CD33

[00251] Линии клеток, экспрессирующие CD33 человека и яванского макака, получали с использованием лентивируса (Genescopeia; г. Роквилл, штат Мэриленд, США), содержащие полноразмерный человеческий CD33 или CD33 яванского макака и пурамицин для селекции CD33-положительных клеток. Клетки HEK293F (ATCC), отрицательные по CD33, трансдуцировали лентивирусными частицами для сверхэкспрессии CD33 человека и CD33 яванского макака. После трансдукции клетки, положительно экспрессирующие CD33 и маркер устойчивости, отбирали путем обработки объединенных клеток, выращенных в DMEM+10% HI FBS (Life Technologies; г. Карлсбад, штат Калифорния) с добавлением различных концентраций пурамицина (Life Technologies).

[00252] Кроме полученных с помощью HEK линий клеток, для анализов связывания и клеточной токсичности использовали несколько коммерческих линий клеток. Они включали MOLM13, KG1, SH2, OCIAML3 и MV411 и были получены или из Американской коллекции типовых культур, или из Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, и культивировались при 37 °С, 5% CO₂ в полной культуральной среде RPMI с 10% FBS.

[00253] Пример 1. Кампании иммунизации

[00254] Omnirat

[00255] Линию трансгенных крыс, синтезирующих человеческий иммуноглобулин (OmniRat ®; Ligand Pharmaceuticals; г. Сан-Диего, штат Калифорния), использовали для создания клеток гибридомы, экспрессирующих моноклональное антитело к CD33 человека. Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_{Hs}, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V_{ks}, связанных с J_k-C_k, и 16 V_{ls}, связанных с J_l-C_l). (см. например, Osborn, et al. (2013) J Immunol 190(4): 1481-1490). Соответственно, крысы демонстрируют сниженную экспрессию крысиного иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими переменными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в публикации PCT WO 2014/093908, составленной Bruggemann et al.

[00256] При иммунизации рекомбинантным CD33 человека и яванского макака (ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA, соответственно) эта трансгенная крыса продуцирует химерные крысиные/человеческие антитела IgG к человеческому CD33, некоторые из которых также связываются с CD33 яванского макака.

[00257] Восемь крыс OmniRat иммунизировали попеременно ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. После 46-дневного режима иммунизации лимфатические узлы всех восьми OmniRat собирали и использовали для создания гибридом. Восемьдесят один 96-луночный планшет с супернатантами гибридом подвергали скринингу посредством ИФА связывания и AlphaLISA с использованием стандартных методик, из которых отбирали супернатанты 128 гибридом на специфическое связывание с ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. Большинство из 128 супернатантов также были положительными в отношении связывания с клетками, сверхэкспрессирующими huCD33 или суCD33.

[00258] Шесть дополнительных OmniRat иммунизировали только rhuCD33. После 31-дневного режима иммунизации лимфатические узлы всех шести OmniRat собирали и использовали для создания гибридом. Тридцать 96-луночных планшетов с супернатантами гибридом подвергали скринингу посредством ИФА связывания и AlphaLISA с использованием стандартных методик, из которых отбирали 94 супернатанта гибридом на специфическое связывание с ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. Лизаты гибридом получали из положительных клонов и готовили к клонированию V-области, как описано ниже.

[00259] OmniMouse

[00260] Линию трансгенных мышей, синтезирующих человеческий иммуноглобулин (OmniMouse ®; Ligand Pharmaceuticals), использовали для создания гибридомных клеток, экспрессирующих моноклональное антитело к CD33 человека.

OmniMouse® содержит химерные человеческие/крысиные локусы IgH вместе с полностью человеческими локусами IgL. Мыши демонстрируют сниженную экспрессию мышинового иммуноглобулина, и в ответ на иммунизацию внедренные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепей переключаются на экспрессию другого класса и подвергаются соматической мутации для создания высокоаффинных химерных человеческих/крысиных моноклональных антител IgG с полностью человеческими переменными областями.

[00261] При иммунизации рекомбинантным CD33 человека и яванского макака (ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA, соответственно) эта трансгенная мышь продуцирует химерные крысиные/человеческие антитела IgG к человеческому CD33, некоторые из которых также связываются с CD33 яванского макака.

[00262] Четыре OmniMouse иммунизировали попеременно ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. После 53-дневного режима иммунизации собирали селезенки и лимфатические узлы от всех четырех OmniMouse и использовали их для создания гибридом. Сорок восемь 96-луночных планшетов с супернатантами гибридом подвергали скринингу посредством ИФА связывания и AlphaLISA, из которых отбирали 8 супернатантов гибридом на специфическое связывание с ВКД huCD33 с HSA и ВКД CD33 яванского макака с HSA. Лизаты гибридом получали из положительных клонов и готовили к клонированию V-области, как описано ниже.

[00263] Клонирование V-области

[00264] Общую РНК из лизатов клеток гибридомы очищали с помощью набора RNeasy 96 (Qiagen; г. Хилден, Германия) в соответствии с протоколом производителя, и полученную РНК количественно определяли с помощью системы Drop Sense и хранили при -80 °C, или кДНК синтезировали с использованием SuperScript III First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР (Invitrogen; г. Карлсбад, штат Калифорния). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием ген-специфических праймеров, отождествленных с константными областями тяжелых, каппа-и лямбда-цепей, соответственно. Реакционная смесь для ОТ-ПЦР содержит до 3 мкг очищенной РНК, ген-специфического праймера, смеси dNTP, реакционного буфера, 25 mM MgCl₂, DTT, RNaseOUT™ (40 Ед/мл, Invitrogen) и SuperScript™ III RT (200 Ед/мл, Invitrogen, кат. № 18080-051) и инкубируется при 50 °C в течение 50 минут и 85 °C в течение 5 минут. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при -20 °C или одноцепочечную ДНК амплифицировали с помощью ПЦР. Реакцию ПЦР проводили с использованием полимеразы Platinum Pfx (Invitrogen). Фрагменты V-области амплифицировали путем отжига прямого и обратного праймеров с лидерными последовательностями и константными областями тяжелой, каппа-и лямбда-цепей соответственно с использованием оптимизированных условий ПЦР. Полученные ПЦР-фрагменты прогоняли в геле и секвенировали в GENEWIZ с использованием предварительно разработанных праймеров для получения последовательностей V-области. Полученные файлы в формате abi для последовательностей V-образных областей собирали и анализировали с помощью

программы анализа последовательностей V-областей по Сэнгеру, созданной в Janssen Biologics Discovery. Последовательности аминокислот выделенных v-областей записывали во внутренней базе данных, оптимизировали кодоны и клонировали в вектор экспрессии на основе pUnderm, несущий соответствующую константную область желаемого изотипа человеческого антитела: IgG1 F405L и IgG4 PAA. В общей сложности 76 антител OMNIRat и 8 антител OMNIMouse были успешно клонированы и отправлены для дальнейшей характеристики. В таблицах ниже приведены последовательности из 42 первых, идентифицированных в процедурах с OMNIRat (см. Таблицу 2), и 16 последовательностей, идентифицированных в процедуре OMNIMouse (см. Таблицу 3) с несколькими антителами OMNIRat, клонированными в IgG1, а также в IgG4 PAA, а все из процедур с OMNIMouse клонировали как в IgG1, так и в IgG4 PAA.

[00265] Таблица 2. Последовательности антител, идентифицированные посредством иммунизации CD33 у крыс OMNIRat

мкАт	Ид. номер HC	Изотип HC	Белок, SEQ ID NO	Нуклеот . послед., SEQ ID NO	Ид. номер LC	Белок, SEQ ID NO	Нуклеот . послед., SEQ ID NO
C33B46	C33H108	hulgG1F405L	12	54	C33L74	96	138
C33B48	C33H80	hulgG1F405L	13	55	C33L73	97	139
C33B52	C33H42	hulgG1F405L	14	56	C33L8	98	140
C33B54	C33H44	hulgG1F405L	15	57	C33L10	99	141
C33B55	C33H45	hulgG1F405L	16	58	C33L11	100	142
C33B56	C33H46	hulgG1F405L	17	59	IAPL24	101	143
C33B61	C33H48	hulgG1F405L	18	60	C33L58	102	144
C33B62	C33H49	hulgG1F405L	19	61	C33L59	103	145
C33B63	C33H51	hulgG1F405L	20	62	C33L34	104	146
C33B64	C33H52	hulgG1F405L	21	63	N46L109	105	147
C33B66	C33H55	hulgG1F405L	22	64	C33L42	106	148
C33B72	C33H65	hulgG1F405L	23	65	C33L47	107	149
C33B73	C33H66	hulgG1F405L	24	66	C33L60	108	150
C33B75	C33H70	hulgG1F405L	25	67	N46L109	109	151
C33B77	C33H72	hulgG1F405L	26	68	C33L40	110	152
C33B79	C33H74	hulgG1F405L	27	69	C33L38	111	153
C33B80	C33H76	hulgG1F405L	28	70	C33L39	112	154
C33B82	C33H78	hulgG1F405L	29	71	C33L57	113	155
C33B83	C33H81	hulgG1F405L	30	72	C33L53	114	156
C33B87	C33H87	hulgG1F405L	31	73	C33L35	115	157

C33B88	C33H88	hulgG1F405L	32	74	C33L61	116	158
C33B89	C33H90	hulgG1F405L	33	75	C33L51	117	159
C33B94	C33H98	hulgG1F405L	34	76	C33L69	118	160
C33B95	C33H98	hulgG1F405L	35	77	IAPL24	119	161
C33B96	C33H99	hulgG1F405L	36	78	C33L37	120	162
C33B10 1	C33H69	hulgG1F405L	37	79	C4LL152	121	163
C33B10 7	C33H68	hulgG1F405L	38	80	C33L17	122	164
C33B12 0	C33H87	hulgG1F405L	39	81	C33L41	123	165
C33B12 2	C33H92	hulgG1F405L	40	82	C33L30	124	166
C33B12 3	C33H91	hulgG1F405L	41	83	C33L44	125	167
C33B12 4	C33H73	hulgG1F405L	42	84	C33L32	126	168
C33B12 5	C33H84	hulgG1F405L	43	85	C33L66	127	169
C33B76 0	C33H45	huIgG4 PAA	44	86	C33L11	128	170
C33B77 7	C33H65	huIgG4 PAA	45	87	C33L47	129	171
C33B77 8	C33H66	huIgG4 PAA	46	88	C33L60	130	172
C33B78 2	C33H72	huIgG4 PAA	47	89	C33L40	131	173
C33B79 2	C33H87	huIgG4 PAA	48	90	C33L35	132	174
C33B79 9	C33H98	huIgG4 PAA	49	91	C33L69	133	175
C33B80 6	C33H69	huIgG4 PAA	50	92	C4LL152	134	176
C33B83	C33H84	huIgG4 PAA	51	93	C33L66	135	177

0							
C33B83			52	94		136	178
6	C33H80	huIgG4 PAA			C33L73		
C33B93			53	95		137	179
7	C33H66	huIGG4 PAA			C33L132		

HC: Тяжелая цепь; LC: Легкая цепь

[00266] Таблица 3. Последовательности антител, идентифицированные посредством иммунизации CD33 у OMNIMouse

мкАт	Ид. номер HC	Белок, SEQ ID NO	Нуклеот. послед., SEQ ID NO	Ид. номер LC	Белок, SEQ ID NO	Нуклеот. послед., SEQ ID NO
C33B901	C33H249	180	196	C33L115	212	228
C33B902	C33H250	181	197	C33L116	213	229
C33B903	C33H251	182	198	C33L117	214	230
C33B904	C33H252	183	199	C33L118	215	231
C33B905	C33H253	184	200	C33L119	216	232
C33B906	C33H254	185	201	C33L120	217	233
C33B907	C33H255	186	202	C33L121	218	234
C33B908	C33H256	187	203	C33L122	219	235
C33B909	C33H249	188	204	C33L115	220	236
C33B910	C33H250	189	205	C33L116	221	237
C33B911	C33H251	190	206	C33L117	222	238
C33B912	C33H252	191	207	C33L118	223	239
C33B913	C33H253	192	208	C33L119	224	240
C33B914	C33H254	193	209	C33L120	225	241
C33B915	C33H255	194	210	C33L121	226	242
C33B916	C33H256	195	211	C33L122	227	243

HC: Тяжелая цепь; LC: Легкая цепь

[00267] Трансфекция Expi293 и очистка в малых масштабах

[00268] Антитела, идентифицированные в кампаниях иммунизации и последующем клонировании ν -области (в IgG1 F405L и IgG4 PAA), экспрессировали и очищали в небольшом масштабе 2 мл. Клетки Expi293™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среду для экспрессии Expi293™ и культивировали в поликарбонатных, одноразовых, стерильных, вентилируемых, встряхиваемых колбах Эрленмейера без дефлекторов в шейкере-инкубаторе при 37°C, 7% CO₂(INFORS HT Multitron Pro). Для стандартного роста клеток

во встряхиваемых колбах объемом 125 мл - 2 л, скорость встряхивания устанавливали на 130 об/мин для шейкеров с диаметром встряхивания 19 мм. Клетки пересевали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при $3 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

[00269] В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл. Для оптимальной трансфекции используют стерильную плазмидную ДНК тяжелой и легкой цепей в концентрации 0,1 мг/мл в буфере TE (10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТК, pH 8,0).

[00270] Клетки Expi293™ трансфицировали в соответствии с протоколом трансфекции производителя (публикация ThermoFisher № MAN0007814). Трансфекцию проводили в 24-луночных планшетах с глубокими лунками (GE Healthcare). Вкратце, плазмидную ДНК разводили 0,1 мл среды OptiMEM™ (ThermoFisher Scientific) в следующем соотношении: 0,250 µг ДНК тяжелой цепи: 0,750 µг ДНК легкой цепи: 0,5 µг рAdvantage. 5 µл реагента для трансфекции ExpiFectamine™ 293 разбавляли и осторожно перемешивали с 95 µл среды OptiMEM™ и инкубировали в течение 1 мин. Разбавленный реагент ExpiFectamine™ 293 добавляли к разбавленной ДНК, осторожно перемешивали, а комплексы ExpiFectamine™ 293/плазмидная ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 40 минут. После инкубации к комплексам, инкубированным в течение ночи в шейкере-инкубаторе при 37 °С и при 7% CO₂ добавляли 1,8 мл клеток Expi293™.

[00271] На 1 день после трансфекции добавляли 10 µл реагента ExpiFectamine™ 293 Enhancer 1 и 100 µл реагента ExpiFectamine 293™ Enhancer 2 и возвращали планшеты в инкубатор еще на 5 дней. Культуру собирали на 6 день после трансфекции путем центрифугирования при 850 x g в течение 15 минут перед очисткой.

[00272] 1,7 мл осветленных экспрессионных супернатантов, приготовленных, как описано выше, переносили в новый 96-луночный планшет с глубокими лунками объемом 2 мл. Планшеты для очистки получали путем внесения пипеткой 800 µл смеси 1: 4 смолы mAb Select Sure (GE Healthcare) и DPBS-/- суспензии в каждую лунку 96-луночного стеклянного фильтровального планшета с 1 µм порами Acroprep Advance (Pall). К планшету прикладывали вакуумное давление 200 мбар для удаления избытка PBS и затем промывали 800 µл свежего PBS. Для удаления промывочного буфера применяли вакуумное давление 200 мбар. Затем осветленные супернатанты переносили на смолу, промытую PBS, осторожно перемешивали и инкубировали в течение 15 минут. После инкубации применяли вакуумное давление 200 мбар для удаления супернатанта. Смолу mAb Select Sure трижды промывали PBS и один раз 25 mM натрий ацетата, pH 5 (TEKNOVA; г. Холлистер, штат Калифорния) при давлении вакуума 200 мбар между промывками для удаления избыточного буфера. Связанные со смолой мкАт элюировали 0,1 M натрий ацетатом, pH 3,5, и инкубировали в течение 10 минут для эффективной диссоциации. Планшет с фильтром помещали на 96-луночный планшет и элюированные

мкАт собирали в нижнем планшете путем центрифугирования при 1000 g в течение 2 минут. Для нейтрализации мкАт добавляли 80 μ л 2,5 М трис-ацетата, pH 7,2. мкАт диализировали в PBS в течение ночи в 96-луночном планшете DispoDIALYZER (Harvard Apparatus; г. Холлистон, штат Массачусетс), переносили в 96-луночный фильтровальный планшет с 0,2 μ м порами Supor Acroprep Advance (Pall; г. Порт Вашингтон, штат Нью-Йорк), помещали на 96-луночный планшет с глубокими лунками, и растворы белков фильтровали путем центрифугирования при 1500 g в течение 15 минут в настольной центрифуге. Концентрации белка определяли путем измерения при длине волны A280 на фильтрате с помощью прибора DropSense (Trinean).

[00273] Пример 2. Характеризация антител к CD33

[00274] Антитела OMNIRat, идентифицированные посредством иммунизации, клонированные в ν -области, а затем экспрессированные и очищенные, были дополнительно охарактеризованы на связывание с экспрессирующими CD33 клетками и на связывание с рекомбинантными антигенами. Очищенные антитела оценивали на связывание со стабильно трансфицированными клетками HEK293F, экспрессирующими CD33 человека или CD33 яванского макака (получение описано выше), вместе с исходным HEK293F в качестве отрицательного контроля. Клетки собирали из колб для тканевых культур с использованием неферментативного буфера для диссоциации (Thermo Scientific). Колбы дважды промывали PBS и в колбу добавляли буфер для диссоциации и инкубировали колбу в течение 10 минут при 37 °C до тех пор, пока клетки не становились неприлипающими. Клетки центрифугировали при 300 g в течение 5 минут и ресуспендировали при $1,0 \times 10^6$ клеток/мл в буфере для окрашивания (Becton Dickinson; г. Франклин-Лейкс, штат Нью-Джерси, США). Клетки каждого типа высевали в количестве 50000 клеток на лунку в 50 μ л буферного раствора для окрашивания на круглодонные планшеты (Becton Dickinson). Добавляли 50 μ л исследуемого мкАт или изотипического контроля в разведениях 3 и нуль (120 нМ, 12 нМ, 1,2 нМ и 0 нМ), и полученный раствор инкубировали в течение 30 минут при 4 °C. 100 μ л буфера для окрашивания добавляли во все лунки каждого планшета, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, буфер удаляли, 200 μ л буфера для окрашивания добавляли во все лунки каждого планшета, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и удаляли буфер. 50 μ л 2 μ г/мл вторичного антитела козы к человеческому Fc AF647 (Jackson Immunoresearch; г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 4 °C. Во все лунки планшетов добавляли 100 μ л буферного раствора для окрашивания, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и удаляли буферный раствор. 200 μ л рабочего буфера (рабочий буфер представляет собой буфер для окрашивания, 1 мМ ЭДТК, 0,1% плурониловой кислоты) добавляли во все лунки планшетов, планшеты вращали при 300 g в течение 5 минут и буфер удаляли. Во все лунки с клетками добавляли 30 мкл рабочего буфера, содержащего краситель Sytox Green Live/Dead (ThermoFisher), и планшеты считывали на проточном цитометре iQue IntelliCyt. Клетки гейтировали по прямому и боковому рассеянию для удаления остатков клеток, затем по синглетам, а затем

по живым клеткам, в которых было исключено окрашивание Sytox. Связывание антитела оценивали по средней интенсивности флуоресценции в канале AF647.

[00275] Для начала оценки биофизических свойств связывания очищенных мкАт проводили скрининг на скорость диссоциации. 76 мкАт OMNIRat к CD33 тестировали на связывание с рекомбинантными белками ВКД CD33 человека с HSA (C33W2) и ВКД CD33 яванского макака с HSA (C33W1) (продукция Janssen) человека, и скорость диссоциации измеряли с помощью платформы IBIS MX96 SPRi (Carterra; г. Ньютон, штат Пенсильвания). Козы антитела к человеческому Fc IgG (Jackson Immunoresearch, кат. № 109-005-098) были непосредственно иммобилизованы по аминокислотной группе в концентрации 100 µг/мл в ацетатном буфере, pH 4,5, с использованием сенсорного чипа CMD50m (Xantec, партия CMD50m0415.a) с временем ассоциации 10 минут в приборе IBIS. Был достигнут средний уровень иммобилизации GAN-Fc~ 9000 RU. Сенсорный чип переносили в устройство Continuous Flow Microspotter (CFM) для захвата каждого мкАт к CD33 в концентрации 10 µг/мл в течение 10 минут. Связывание измеряли на IBIS SPRi по кинетике одного цикла без регенерации. Каждую серию концентраций антигена (3 µM в серии 3-кратных разведений) последовательно вводили от низких (0,46 нМ) до высоких концентраций (3 µM) для связывания с захваченными мкАт со временем ассоциации 5 минут и временем диссоциации 15 минут с использованием PBST (PBS с 0,005% Tween) в качестве рабочего буфера. Необработанные данные о связывании (формат файла.trix) были привязаны и выровнены с помощью программного обеспечения SprintX (Wasatch, версия 1.9.3.2), а затем экспортированы (формат файла.ibmх) в программу Scrubber (вер. 2.0) для кинетического анализа связывания 1:1 (Wasatch, версия 2.0.0.33) с получением k_{off} .

[00276] В Таблице 4 ниже приведены 32 лучших клон, оцененных по связыванию с линиями клеток, экспрессирующими CD33 человека и яванского макака, а также с рекомбинантным антигеном (скорость диссоциации по меньшей мере $>10e-3$ для одного из антигенов). Из этих 32 все, кроме 4, продемонстрировали заметное связывание с экспрессирующими клетками или человека, или яванского макака. Для всех 32 выполняли дальнейшую характеристику с помощью эпитоп-специфической сортировки и полного кинетического анализа.

[00277] Таблица 4. Анализ связывания клеток и скорости диссоциации антител к CD33, полученных из OMNIRat

Идентификатор белка по аминокислотам	% Mon	60 нМ CD33	6 нМ CD33	0,6 нМ CD33	0 нМ CD33	kD
C33B48	91,96	400995,84	428948,75	391157,69	91,12	5,47E-05
C33B73	100,00	201493,02	33443,28	4034,64	93,98	9,12E-05
C33B125	98,48	258779,13	79728,78	9203,75	78,26	1,54E-04
C33B55	96,39	188278,42	59155,10	7625,56	105,39	2,15E-04

C33B96	98,75	476040,28	475653,41	187925,80	55,23	2,28E-04
C33B124	100,00	798,33	126,37	90,26	172,03	2,38E-04
C33B72	96,94	328194,72	105474,59	12506,85	93,32	2,84E-04
C33B79	100,00	236644,03	41925,89	4988,81	77,78	3,28E-04
C33B77	92,11	241787,16	88691,05	11484,97	69,46	3,37E-04
C33B82	96,21	188508,56	41264,92	5033,60	73,44	3,41E-04
C33B87	100,00	242185,48	79532,87	12547,05	73,65	3,52E-04
C33B80	98,33	5799,64	409,97	114,93	88,88	3,84E-04
C33B101	96,91	268805,28	204984,16	35513,63	70,07	3,98E-04
C33B83	98,07	92956,55	7856,70	1020,48	87,37	4,61E-04
C33B46	95,81	509865,97	447627,97	418017,22	134,53	4,67E-04
C33B94	98,31	200142,00	93852,22	13274,87	89,59	5,38E-04
C33B88	98,36	393148,13	481100,91	274293,53	94,81	8,25E-04
C33B66	98,71	444680,31	313288,41	56628,04	129,73	8,59E-04
C33B120	97,63	190036,14	60357,11	7054,28	92,94	1,40E-03
C33B64	98,13	200158,36	54138,77	7556,04	114,85	1,71E-03
C33B52	96,76	196557,09	46286,13	6751,01	82,46	3,13E-03
C33B56	95,59	143,73	79,73	111,95	138,04	4,02E-03
C33B75	98,68	163795,25	29603,57	4517,81	95,94	4,16E-03
C33B107	96,90	375388,25	339798,53	161369,64	86,54	4,44E-03
C33B63	98,79	247758,77	62221,71	9671,48	86,34	4,57E-03
C33B95	97,77	154556,58	44354,07	6402,00	87,38	5,99E-03
C33B61	98,87	198777,34	38699,10	5308,45	79,84	6,71E-03
C33B89	100,00	315,38	119,12	65,61	70,94	8,11E-03
C33B122	98,49	259183,69	84281,03	14291,17	65,01	8,74E-03
C33B62	99,05	157786,36	37359,44	6092,03	75,00	1,00E-02
C33B123	95,08	224078,95	88155,99	8864,39	71,05	1,03E-02
C33B54	100,00	147753,30	27461,06	3766,69	61,26	2,48E-02

Идентификатор белка по аминокислотам	60 нМ CD33 яванского макака	6 нМ CD33 яванского макака	0,6 нМ CD33 яванского макака	0 нМ CD33 яванского макака	kD связывания CD33 яванского макака
C33B48	56491,32	47326,85	43351,12	94,01	1,20E -04
C33B73	14799,14	6987,92	795,57	72,51	4,08E-04

C33B125	15603,45	11526,47	3458,27	70,22	3,51E +04
C33B55	16020,78	9994,42	2433,94	69,38	1,16E-04
C33B96	37273,19	20087,29	11574,59	86,31	8,19E-04
C33B124	593,00	132,19	77,26	98,41	4,77E-04
C33B72	19422,07	13975,14	3894,84	90,81	7,63E-04
C33B79	15538,97	6427,73	1082,85	63,59	6,82E-03
C33B77	17516,20	11665,49	3601,76	85,23	4,18E-04
C33B82	14269,38	6622,07	1540,09	84,24	6,70E-04
C33B87	19597,18	12652,44	3266,36	103,07	2,28E-04
C33B80	4612,58	248,60	108,93	82,38	2,66E-04
C33B101	48016,75	46115,96	17989,37	79,69	1,06E-04
C33B83	5304,40	687,44	159,37	87,35	2,17E-03
C33B46	49840,14	49816,36	49729,78	92,05	1,48E-04
C33B94	16126,84	10782,54	3183,70	87,82	5,37E-04
C33B88	50388,18	43928,95	43940,23	90,13	3,89E-04
C33B66	48905,04	49076,39	42160,22	77,96	9,33E-05
C33B120	13211,32	7865,37	2726,18	75,77	8,54E-04
C33B64	21109,59	9685,04	3102,56	99,82	1,21E-03
C33B52	12582,90	8444,39	2063,44	75,24	1,20E-03
C33B56	104,27	85,94	78,56	83,31	8,46E-04
C33B75	12194,41	5577,80	1709,40	124,32	1,20E-03
C33B107	50325,07	47810,05	36786,69	55,11	1,35E-04
C33B63	18322,71	11642,38	2879,89	87,94	9,47E-04
C33B95	14774,34	9594,12	1637,99	80,81	6,98E-03
C33B61	13552,71	8211,09	1595,90	106,84	1,83E-03
C33B89	47301,14	34193,78	23334,20	112,80	4,65E-05
C33B122	19740,29	13907,32	5838,25	82,53	1,45E-03
C33B62	12737,71	5620,17	1922,97	934,44	1,32E-03
C33B123	10665,93	10404,03	3232,18	61,08	2,74E-03
C33B54	50466,68	43011,75	38091,89	28785,80	1,35E-04

[00278] Затем панель мкАт была дополнительно охарактеризована в полном анализе аффинности, а также в эпитоп-специфической сортировке. Связывание мкАт к CD33 с рекомбинантным ВКД CD33 человека с HSA (C33W2) и ВКД CD33 яванского макака с HSA (C33W1) измеряли при помощи ProteOn SPR (Bio-Rad). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-098) напрямую

иммобилизованы по amino-группе в концентрации 30 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 5,0, во всех 6 вертикально ориентированных лигандных каналах на чипе GLC Sensor (Bio-Rad, кат. № 176-5011) при скорости потока 30 мкл/мин в PBS, содержащем 0,005% Tween-20. Значения плотности иммобилизации в среднем составляли около 5000 единиц ответа (RU) с менее чем 5% разбросом между разными каналами. Различные мкАт захватывали на поверхности антитела к человеческому Fc IgG в концентрации 0,25 или 0,5 мкг/мл (160~300 RU) в вертикальной ориентации лиганда, с отсутствием 6-го лигандного канала в качестве контроля поверхности лиганда. Белки CD33 человека и яванского макака с HSA при концентрации 0,3 мМ в серии 3-кратных разведений из 5 концентраций применяли в качестве аналита для связывания с захваченными мкАт в горизонтальной ориентации. Образец буфера также вводили в 6-й канал для контроля диссоциации захваченного мкАт и стабильности базовой линии. Фазу диссоциации для всех концентраций CD33-HSA человека и яванского макака контролировали при скорости потока 100 мкл/мин в течение 15 минут на связывание с C33B782, 60 минут на связывание с C33B912 (идентично C33B904 с hIgG4) с последующей регенерацией с использованием 18-секундного импульса 0,85% фосфорной кислоты для удаления антигена и связанного мкАт. Необработанные данные о связывании сравнивали с двойным контролем после вычитания данных ответа из: 1) сигналов между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) канала буфера для коррекции смещения базовой линии из-за диссоциации со временем захваченного мкАт с поверхности. Обработанные данные для всех концентраций антигена для каждого мкАт в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения кинетических констант (k_{on} , k_{off}) и константы аффинности (KD).

[00279] Чтобы определить, связывает ли все мкАт панели с 1 отдельным эпитопом или имеется широкий охват эпитопов, был проведен эксперимент по эпитоп-специфической сортировке. Конкурентную эпитоп-специфическую сортировку мкАт к CD33 выполняли на приборе IBIS SPRi (Carterra) с использованием сенсорного чипа с призмным возбуждением CMD-200 M. Каждое антитело к CD33 напрямую иммобилизовали по amino-группе на чипе в концентрации 10 мкг/мл в ацетатном буфере (pH 4,5) с использованием отдельной Continuous Flow Microspotter (CFM). Затем напечатанный сенсорный чип переносили в инструмент IBIS для анализов сортировки с использованием классического формата или «сэндвич» формата. Сортировку выполняли последовательной инъекцией ВКД CD33 человека с HSA (C33W2) в концентрации 50 нМ с последующей однократной инъекцией мкАт к CD33 в качестве конкурирующего аналита в растворе при 133 нМ для связывания иммобилизованных мкАт к CD33 с поверхностной регенерацией после каждого последовательного цикла введения антигена и антитела.

[00280] Для отслеживания активности иммобилизованных мкАт перед регенерацией и после нее в начале и в конце эксперимента выполняли инъекцию буфера без какого-либо конкурирующего мкАт с целью измерения активности связывания только с антигеном. Реакция связывания конкурирующего мкАт относительно связывания буфера

(только антиген) является показателем того, блокирует ли антитело в растворе связывание антигена с иммобилизованными мкАт или ограничивает его. Необработанные данные о сортировке (формат файла.trix) были привязаны и установлены на нуль с помощью программного обеспечения SprintX (Wasatch, версия 1.9.3.2), а затем экспортированы (формат файла.ibmх) в программу для сортировки HtTools.exe (Wasatch, версия 2.0.0.33) для анализов. Данные обрабатывали путем удаления антител с ответами на антигены ниже 20 RU и антител, которые не блокировали себя. Ответы конкурирующих мкАт нормализовали относительно связывания только с антигеном. Антитела с нормализованными ответами $<0,25$ обозначали как блокаторы, антитела с нормализованными ответами $\geq 0,25$ обозначали как неблокаторы/ «сэндвичи». Различные группы были спрогнозированы с использованием отсечения по высоте 2,5 на графике комбинированных дендрограмм.

[00281] В приведенной ниже таблице обобщены полный кинетический анализ и эпитоп-специфическая сортировка для 32 выбранных мкАт. Всего имеется 8 мкАт к CD33, которые обладают субнаномолярной аффинностью к CD33 как человека, так и к яванского макака, и эти мкАт соответствуют 3 отдельным группам эпитопов, в то время как большая панель имеет диапазон аффинностей и 7 отдельных групп эпитопов.

[00282] Таблица 5. Полный кинетический анализ и эпитоп-специфическая сортировка мкАт, полученных из OMNIRat

ВКД CD33 человека с HSA					
Идентификатор белка по аминокислотам	Ин. номер V-области	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)	Эпитопная группа
C33B48	C33F53	1,62E+06	1,82E-05	1,12E-11	1
C33B46	C33F51	1,45E+06	1,99E-03	1,38E-09	1
C33B66	C33F71	3,85E+04	2,03E-03	5,29E-08	1
C33B107	C33F112	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	1
C33B88	C33F93	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	1
C33B96	C33F101	2,26E+05	4,36E-04	1,92E-09	3
C33B101	C33F106	1,62E+05	1,08E-03	6,64E-09	3
C33B73	C33F78	5,59E+05	5,59E-05	1,00E-10	4
C33B125	C33F130	9,92E+05	1,34E-04	1,40E-10	4
C33B55	C33F60	9,85E+05	2,53E-04	2,60E-10	4

C33B82	C33F87	4,45E+05	2,70E-04	6,10E-10	4
C33B83	C33F88	2,70E+05	5,21E-04	1,93E-09	4
C33B75	C33F80	3,85E+05	4,41E-03	1,14E-08	4
C33B123	C33F128	1,02E+06	1,52E-02	1,48E-08	4
C33B52	C33F57	2,06E+05	3,96E-03	1,92E-08	4
C33B61	C33F66	4,89E+05	1,05E-02	2,14E-08	4
C33B62	C33F67	5,07E+05	1,26E-02	2,49E-08	4
C33B64	C33F69	4,33E+05	2,21E-03	5,10E-09	4
C33B63	C33F68	5,33E+05	3,74E-03	7,01E-09	4
C33B122	C33F127	7,47E+05	7,12E-03	9,53E-09	4
C33B72	C33F77	8,71E+05	2,00E-04	2,30E-10	5
C33B79	C33F84	5,15E+05	3,90E-04	7,60E-10	5
C33B77	C33F82	8,28E+05	2,62E-04	3,20E-10	6
C33B87	C33F92	7,20E+05	4,32E-04	6,00E-10	6
C33B94	C33F99	9,22E+05	5,85E-04	6,30E-10	6
C33B95	C33F100	4,82E+05	7,40E-03	1,54E-08	6
C33B120	C33F125	5,75E+05	1,68E-03	2,93E-09	6
C33B89	C33F94	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	8
C33B54	C33F59	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	9
C33B124	C33F129	3,57E+05	1,24E-04	3,50E-10	НС
C33B80	C33F85	3,23E+05	4,25E-04	1,32E-09	НС
C33B56	C33F61	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	НС

ВКД CD33 яванского макака с HSA					
Идентификатор белка по аминокислотам	Ин. номер V- области	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)	Эпитопная группа
C33B48	C33F53	4,31E+06	1,58E-04	3,66E-11	1
C33B46	C33F51	2,97E+06	3,75E-04	1,26E-10	1
C33B66	C33F71	1,22E+06	2,66E-04	2,17E-10	1

C33B107	C33F112	3,31E+05	7,01E-05	2,12E-10	1
C33B88	C33F93	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	1
C33B96	C33F101	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	3
C33B101	C33F106	2,25E+05	2,69E-04	1,20E-09	3
C33B73	C33F78	6,00E+05	5,08E-04	8,46E-10	4
C33B125	C33F130	1,12E+06	3,39E-04	3,04E-10	4
C33B55	C33F60	1,16E+06	8,37E-05	7,23E-11	4
C33B82	C33F87	5,45E+05	7,51E-04	1,38E-09	4
C33B83	C33F88	2,47E+05	2,88E-03	1,17E-08	4
C33B75	C33F80	6,16E+05	1,32E-03	2,15E-09	4
C33B123	C33F128	1,26E+06	3,39E-03	2,69E-09	4
C33B52	C33F57	3,13E+05	1,48E-03	4,74E-09	4
C33B61	C33F66	7,34E+05	1,62E - 03	2,21E-09	4
C33B62	C33F67	8,05E+05	1,49E-03	1,85E-09	4
C33B64	C33F69	5,90E+05	1,01E-03	1,71E-09	4
C33B63	C33F68	7,23E+05	8,80E-04	1,22E-09	4
C33B122	C33F127	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	связывание/ отсутствие соответствия	4
C33B72	C33F77	9,19E+05	5,40E-04	5,87E-10	5
C33B79	C33F84	5,48E+05	2,20E-03	4,01E-09	5
C33B77	C33F82	1,08E+06	2,66E-04	2,47E-10	6
C33B87	C33F92	1,12E+06	2,64E-04	2,36E-10	6
C33B94	C33F99	1,10E+06	5,20E-04	4,73E-10	6
C33B95	C33F100	8,44E+05	8,06E-03	9,56E-09	6
C33B120	C33F125	8,76E+05	9,02E-04	1,03E-09	6
C33B89	C33F94	2,65E+05	2,01E-04	7,60E-10	8
C33B54	C33F59	1,32E+06	6,37E-04	4,84E-10	9
C33B124	C33F129	4,67E+05	4,72E-04	1,01E-09	НС
C33B80	C33F85	4,92E+05	2,59E-04	5,27E-10	НС

C33B56	C33F61	низкое связывание	низкое связывание	низкое связывание	НС
--------	--------	----------------------	----------------------	----------------------	----

[00283] Панель OmniMouse (всего 8 мкАт) создавали отдельно и дополнительно характеризовали на связывание с клетками. Связывание с клетками проводили, как описано выше, и оно обобщено в таблице ниже. Из 8 протестированных мкАт 6 напрямую связывались с CD33-экспрессирующими клетками, тогда как 2 мкАт не связывались.

[00284] Таблица 6. Клеточное связывание полученных из OMNIMouse мкАт с линиями экспрессирующих клеток человека и яванского макака

мкАт	Исходное				CD33 человека			
	60 нМ	6 нМ	0,6 нМ	0 нМ	60 нМ	6 нМ	0,6 нМ	0 нМ
C33B9 09	253,50	206,04	169,77	119,51	176,49	170,25	154,00	191,28
C33B9 10	193,52	176,14	108,46	190,17	213,55	183,33	151,25	155,29
C33B9 11	1466,02	389,41	186,22	113,30	237954,27	100333,48	13501,02	114,07
C33B9 12	977,91	273,07	140,62	124,53	237140,86	101295,70	15726,96	149,54
C33B9 13	174,49	118,08	123,26	129,07	518952,00	409071,06	204694,14	127,82
C33B9 14	181,37	142,74	139,10	113,48	304350,88	315129,56	153252,58	185,45
C33B9 15	101,28	147,65	143,51	100,00	390477,25	362902,66	138398,56	112,22
C33B9 16	416,08	145,16	115,70	91,75	447815,47	404033,19	192941,55	167,07

мкАт	CD33 яванского макака			
	60 нМ	6 нМ	0,6 нМ	0 нМ
C33B9 09	180,33	135,33	115,73	124,03
C33B9 10	202,42	135,18	116,71	175,97
C33B9	17036,56	7729,14	1935,16	97,94

11				
C33B9				
12	15070,88	7271,38	1726,03	124,69
C33B9				
13	40661,90	36920,95	35224,10	106,19
C33B9				
14	44964,85	33368,26	22086,01	86,76
C33B9				
15	37495,34	35692,21	36165,59	113,92
C33B9				
16	41004,43	33294,78	22790,61	104,43

[00285] 6 мкАт, связывающихся с CD33 на клетках, дополнительно характеризовали биофизическими методами полного кинетического анализа с рекомбинантным антигеном с применением способов, описанных выше и приведенных в таблице ниже. Из 6 протестированных мкАт 1 связывалось с CD33 человека с пикомолярной аффинностью (C33B912) и субмолярной аффинностью с CD33 яванского макака, тогда как 1 обладало очень высокой аффинностью к CD33 человека, но только наномолярной аффинностью к CD33 яванского макака (C33B911). Еще два клона были субнаномолярными в отношении CD33 как человека, так и яванского макака (C33B913 и C33B916), но ни один из них не находился в диапазоне C33B912.

[00286] Таблица 7. Полный кинетический анализ полученных из OMNIMouse мкАт

мкАт	ВКД CD33 человека с HSA			ВКД CD33 яванского макака с HSA		
	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)	Ka (1/Мс)	Kd (1/с)	KD (M)
C33B911	1,10E+06	4,14E-05	3,78E-11	1,15E+06	1,15E-03	1,00E-09
C33B912	1,42E+06	4,29E-05	3,02E-11	1,50E+06	6,50E-04	4,33E-10
C33B913	6,60E+05	6,40E-04	9,69E-10	2,56E+06	3,08E-04	1,20E-10
C33B914	4,44E+05	9,80E-03	2,21E-08	5,29E+05	2,33E-04	4,40E-10
C33B915	2,18E+05	9,89E-04	4,53E-09	3,81E+06	8,93E-05	2,34E-11
C33B916	6,27E+05	4,11E-04	6,55E-10	4,73E+05	4,03E-04	8,52E-10

[00287] Эксперимент по эпителио-специфической сортировке проводили на 6 связывающихся с клетками мкАт, полученных из OMNIMouse, а также на нескольких контрольных мкАт, ранее идентифицированных в предшествующей кампании OMNIRat. Контрольные мкАт выбирали на основе их субнаномолярной аффинности к человеческому CD33 и количества отдельных групп эпителио. Программное обеспечение HtTools для сортировки назначает номера групп эпителио в каждом эксперименте, и поэтому наличие нескольких контролей для уже определенных групп эпителио играло

решающую роль в перекрестном сравнении. Оба полученных из OMNIMouse клона с высокой аффинностью к CD33 человека (С33В911 и С33В912) были отсортированы с клонами из вышеуказанной группы 4 (группа 4 в данном эксперименте), а субнаномолярный клон (С33В916) был отсортирован в 2 в данном случае вместе с С33В836 (группа 1 в вышеуказанном эксперименте).

[00288] Таблица 8. Группы эпитопов OMNIMouse мкАт к CD33

мкАт	Ин. номер V-области	Эпитопная группа
С33В915	С33F553	1
С33В916	С33F554	2
С33В836	С33F53	2
С33В914	С33F552	2
С33В913	С33F551	3
С33В806	С33F106	3
С33В911	С33F549	4
С33В912	С33F550	4
С33В778	С33F78	4
С33В830	С33F130	4
С33В782	С33F82	5
С33В792	С33F92	5
С33В799	С33F99	5
С33В760	С33F60	6
С33В777	С33F77	7

[00289] CD33 состоит из 2 доменов IgG, дистального по отношению к мембране V-домена и проксимального по отношению к мембране C2-домена. SNP rs12459419 могут вызывать селективный альтернативный сплайсинг транскрипта пре-мРНК CD33 для получения только C2-формы, экспрессированной на клетках, и поэтому нацеливание на этот домен может обеспечить благоприятный клинический эффект. Для подтверждения того, какой из двух доменов мкАт был способен связываться, проводили скрининг скорости диссоциации согласно вышеописанному протоколу для 6 мкАт с самой высокой способностью связывания, которая охватывала 4 различных группы эпитопов, используя в качестве связывающих антигенов ВКД CD33 человека с HSA, V-домен CD33 человека с HSA, и C2-домен CD33 человека с HSA. Как показано в таблице ниже, оба клона были ранее сгруппированы в группу 4, которые связывались с доменом C2 huCD33, но не с V-доменом huCD33, тогда как клоны в группе 2 и 3 связывались с V-доменом, но не с C2-доменом. Два клона, сгруппированных в группу 5, не связывались ни с одним из доменов, и, следовательно, их точное положение связывания может охватывать два домена. В этот эксперимент включали три (3) доступных в продаже мкАт (WM53 (EMD Millipore; г.

Дармштадт, Германия), P67.7 (Biolegend, г. Сан-Диего, штат Калифорния, США) и клон LSBio 906 (LifeSpan Biosciences, г. Сатт, штат Вашингтон, США)), и все они продемонстрировали связывание с V-доменом, но не с C2-доменом. Из данных о группах эпитопов в Таблицах 5 и 8 по отношению к данным о связывании C2-домена в Таблице 9 всего имеется 15 мкАт, которые могут потенциально связываться с C2-доменом в диапазоне аффинности от ~ 25 нМ до ~ 30 пМ на человеческом полноразмерном белке.

[00290] Таблица 9. Константы диссоциации для связывания доменов

	БКД huCD33 с HSA	V-домен huCD33 с HSA	C2-домен huCD33 с HSA	Эпитопная группа
ID белка	Kd (1/с)	Kd (1/с)	Kd (1/с)	
C33B912	1,29E-05	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	6,68E-05	4
C33B778	4,72E-05	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	2,57E-03	4
C33B782	2,58E-04	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	5
C33B792	4,27E-04	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	5
C33B836	5,52E-05	3,71E-05	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	2
C33B806	1,36E-03	3,18E-03	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	3
WM53	2,37E-03	3,78E-02	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	
P67.7	1,05E-03	2,43E-03	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	
Клон 906	2,45E-03	4,34E-02	Ответ отсутствует/ ответ с низким уровнем связывания	

LSBio			ответ с низким уровнем связывания	
-------	--	--	-----------------------------------	--

[00291] Для дополнительного подтверждения исследований *in vivo* и *in vitro* выбранные клоны (C33B836, C33B782, C33B778, C33B904, C33B806, C33B830, C33B937, C33B792, C33B760 и C33B777) были выбраны для масштабирования и обмена Fab-плечами, чтобы получить биспецифические молекулы DuoBody с антителами к CD3. Клетки ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среду для экспрессии ExpiCHO™ и культивировали в поликарбонатных, одноразовых, стерильных, вентилируемых, встряхиваемых колбах Эрленмейера без дефлекторов в шейкере-инкубаторе при 37°C, 7% CO₂ (INFORS HT Multitron Pro). Для стандартного роста клеток во встряхиваемых колбах объемом 125 мл - 2 л, скорость встряхивания устанавливали на 130 об/мин для шейкеров с диаметром встряхивания 19 мм. Клетки пересевали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при 4×10^6 - 6×10^6 жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

[00292] За два дня до трансфекции клетки ExpiCHO-S™ высевали в концентрации $1,5 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл для получения требуемого объема культуры. В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью 6×10^6 жизнеспособных клеток/мл. Для оптимальной трансфекции использовали стерильную плазмидную ДНК тяжелой и легкой цепей в концентрации ≥ 1 мг/мл в буфере TE (10 mM трис-HCl, 1 mM ЭДТК, pH 8,0).

[00293] Клетки ExpiCHO-S™ трансфицировали в соответствии с протоколом производителя Max Titer Transfection (публикация ThermoFisher № MAN0014337). Все количества и объемы, указанные ниже, указаны в миллилитрах конечного объема трансфицированной культуры. Вкратце, плазмидную ДНК разводили 0,04 мл холодной среды OptiPRO™ (ThermoFisher Scientific) в следующем соотношении: 0,125 µг ДНК тяжелой цепи: 0,375 µг ДНК легкой цепи: 0,5 µг pAdvantage. 6,4 µл реагента для трансфекции ExpiFectamine™ CHO разбавляли и осторожно перемешивали с 0,04 мл холодной среды OptiPRO™ и инкубировали в течение 1 мин. Разбавленный реагент ExpiFectamine™ CHO добавляли к разбавленной ДНК, осторожно перемешивали, а комплексы ExpiFectamine™ CHO/плазмидная ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. После инкубации комплексы добавляли к клеткам ExpiCHO-S™ в шейкерной колбе и инкубировали в течение ночи в шейкере-инкубаторе при 37 °C, 7% CO₂.

[00294] Что касается протокола максимального титра, то в 1 день после трансфекции добавляли 6 µл реагента ExpiFectamine™ CHO и 160 µл питательного раствора ExpiCHO™, после чего колбу переносили в шейкере-инкубаторе при 32 °C в атмосфере 7% CO₂. На 5 день после трансфекции в колбу снова добавляли 160 µл питательного раствора ExpiCHO™ и возвращали в инкубатор с температурой 32 °C при встряхивании. Культуру собирали на 12 день после трансфекции, центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин и очищали с помощью фильтрующей капсулы с размером

пор 0,2 мкм Acropak 1500 (Pall).

[00295] Экспрессированные антитела очищали из осветленных супернатантов с помощью смолы mAbSelect Sure (GE Healthcare). Колонки MabSelect SuRe Protein A уравнивали 1x D-PBS, pH 7,2, перед загрузкой отдельных супернатантов культуры. Несвязанные белки удаляли интенсивной промывкой 1x D-PBS, pH 7,2. Связанные белки элюировали 0,1 М Na-ацетатом, pH 3,5. Фракции пика нейтрализовали 2,5 М Tris pH 7,2 и объединяли. Пулы нейтрализованных фракций или диализовали в 1xDPBS для анализов и биофизических характеристик, или использовали для сборки биспецифического DuoBody.

[00296] Концентрацию белка в каждом пуле элюирования определяли путем измерения поглощения при 280 нм и рассчитывали с использованием коэффициента экстинкции на основе аминокислотной последовательности.

[00297] Пример 3. Обмен Fab-плечами с использованием очищенных исходных мкАт

[00298] Для получения биспецифических антител к CD33 X CD3 требуются два исходных мкАт, одно - специфическое к нацеливающему плечу (например, CD33), а другое - специфическое к эффекторному плечу (например, CD3). мкАт к CD33 рекомбинировали с высокоаффинными (CD3B219) или низкоаффинными плечами к CD3 (CD3B376). Эти исходные мкАт находятся в формате PAA IgG4 (Labrijn et al, 2013), где нацеливающее исходное мкАт (CD33) содержит мутацию K409R (нативная аминокислота для IgG4), уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L и R409K. Моноспецифическое антитело к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в областях Fc. Моноспецифические антитела экспрессировали и очищали так, как описано выше. После очистки исходные антитела к CD33 смешивали с желаемым исходным антителом к CD3 в восстанавливающих условиях в 75 mM цистеамин-HCl и инкубировали при 31 °C в течение 5 часов. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, в которых установленное количество антитела к CD33 (например, 10 мг или ~ 74,6 наномоль) объединяли с антителом к CD3 (например, ~ 67,8 наномоль), где антитело к CD33 добавляли при 6% избытке антитела к CD3. Концентрации маточных растворов антител к CD33 варьировались от 0,8 до 6 мг/мл, а объемы реакционной смеси для рекомбинации изменялись для каждого спаривания. Затем реакционные смеси для рекомбинации диализовали в течение ночи против PBS для удаления восстановителя. Реакции с биспецифическим антителом к CD33xCD3 выполняли с избытком антитела к CD33 (соотношение) для сведения к минимуму количества непрореагировавшего исходного антитела к CD3, оставшегося после рекомбинации.

[00299] Полученные конечные биспецифические антитела к CD33 X CD3 вместе с исходными мкАт (т. е. CD33, CD3 или «Null» (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в Таблице 10.

[00300] Отобранные подходящие антитела к CD33 также объединяли с неуничтожающим плечом («Null») для получения отрицательных контролей в целях

тестирования. Для контрольных биспецифических антител, В2М1, получали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA и в комбинации с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3xNull) и CD3B510 (CD3B376xNull) или плечами к CD33, C33B836, C33B806, C33B782, C33B792, C33B760, C33B830, C33B799, C33B778, C33B777 для получения C33B941, C33B943, C33B946, C33B945, C33B949, C33B942, C33B944, C33B947, C33B948, соответственно (CD33xNull).

[00301] Таблица 10. Биспецифические антитела к CD33 x CD3

Биспецифическое антитело	Исходное	Ид. номер пептид. послед. HC	Пептид. послед. HC, SEQ ID NO	Нуклеот. послед. HC, SEQ ID NO	Ид. номер пептид. послед. LC	Пептид. послед. LC, SEQ ID NO	Нуклеот. послед. LC, SEQ ID NO
C3CB7	C33B836	C33H80	52	94	C33L73	136	178
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB5	C33B830	C33H84	51	93	C33L66	135	177
	CD3B219	CD3H141	244	147	CD3L66	250	253
C3CB4	C33B806	C33H69	50	92	C4LL152	134	176
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB16	C33B799	C33H98	49	91	C33L69	133	175
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB14	C33B792	C33H87	48	90	C33L35	132	174
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB12	C33B782	C33H72	47	89	C33L40	131	173
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB11	C33B778	C33H66	46	88	C33L60	130	172
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB10	C33B777	C33H65	45	86	C33L47	129	171
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB8	C33B760	C33H45	44	85	C33L11	128	170
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB97	C33B836	C33H80	52	94	C33L73	136	178
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB98	C33B830	C33H84	51	93	C33L66	135	177
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB99	C33B806	C33H69	50	92	C4LL152	134	176
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB100	C33B799	C33H98	49	91	C33L69	133	175

	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB101	C33B792	C33H87	48	90	C33L35	132	174
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB102	C33B782	C33H72	47	89	C33L40	131	173
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB103	C33B778	C33H66	46	88	C33L60	130	172
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB104	C33B777	C33H65	45	86	C33L47	129	171
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB105	C33B760	C33H45	44	85	C33L11	128	170
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C33B941	C33B836	C33H80	52	94	C33L73	136	178
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B942	C33B830	C33H84	51	93	C33L66	135	177
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B943	C33B806	C33H69	50	92	C4LL152	134	176
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B944	C33B799	C33H98	49	91	C33L69	133	175
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B945	C33B792	C33H87	48	90	C33L35	132	174
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B946	C33B782	C33H72	47	89	C33L40	131	173
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B947	C33B778	C33H66	46	88	C33L60	130	172
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B948	C33B777	C33H65	45	86	C33L47	129	171
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
C33B949	C33B760	C33H45	44	85	C33L11	128	170
	B23B49	B23H1	246	249	B23L3	252	255
CD3B288	B23B39	B23H1	246	249	B23L3	252	255
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
CD3B510	B23B39	B23H1	246	249	B23L3	252	255
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254
C3CB87	C33B903	C33H251	182	198	C33L117	214	230

	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB88	C33B904	C33H252	183	199	C33L118	215	231
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB89	C33B905	C33H253	184	200	C33L119	216	232
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB90	C33B907	C33H255	186	202	C33L121	218	234
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB91	C33B908	C33H256	187	203	C33L122	219	235
	CD3B219	CD3H141	244	247	CD3L66	250	253
C3CB189	C33B904	C33H252	183	199	C33L118	215	231
	CD3B376	CD3H219	245	248	CD3L150	251	254

Пептид. послед.: Пептидная последовательность; Нуклеот. послед.: Нуклеотидная последовательность; SEQ ID: SEQ ID NO

[00302] Пример 4. Анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro* с использованием биспецифических антител к CD33xCD3

[00303] Проводили анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro*, чтобы оценить, опосредуют ли подходящие антитела к CD33 с плечом к CD3 (CD3B219) уничтожение линии CD33-экспрессирующих клеток ОМЛ OCI-AML5. Вкратце, эффекторные клетки (пан Т-клетки, приобретенные у компании Biological Speciality) собирали, подсчитывали, промывали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% FBS (Invitrogen) для культуральных сред. Клетки-мишени (MOLM13) метили CFSE (Invitrogen) и ресуспендировали до концентрации 2×10^5 клеток/мл в RPMI с добавлением 10% FBS. Эффекторные клетки (Е) и меченные CFSE клетки-мишени (Т) смешивали в соотношении Е : Т=5 : 1 в стерильных 96-луночных круглодонных планшетах. В каждую лунку добавляли по 10 μ л Fc Block (Fc-фрагмент РеоПро) вместе с аликвотой биспецифического антитела объемом 5 мкл в различных концентрациях. Культуры инкубировали при 37 °С в течение 48 часов в атмосфере с 5% CO₂. Через 48 ч к образцам добавляли буфер для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies), культуры инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, промывали и ресуспендировали в 100-200 мкл буфера для FACS. Индуцированную лекарственным средством цитотоксичность определяли с помощью проточного цитометра CANTO II (BD Biosciences; Franklin Lakes, штат Нью-Джерси, США) и анализировали с использованием программного обеспечения FlowJo или Dive (BD Biosciences). Интерес представляет популяция дважды позитивных клеток CFSE+/живые/мертвые+. Как показано на Фиг. 1, все мультиспецифические антитела к CD33xCD3 индуцировали клеточную цитотоксичность с перенаправлением Т-клеток для CD33⁺ клеток MOLM-13 через 48 часов. В Таблице 11 приведены значения EC₅₀, полученные для мультиспецифических антител к CD33xCD3. Четыре лучших

антитела, C3CB10, C3CB12, C3CB7 и C3CB88, были взяты для дальнейшей характеристики.

[00304] Таблица 11. Анализы опосредованной CD33xCD3 Т-клетками цитотоксичности. Сводная информация по значениям EC₅₀ для 13 биспецифических антител к CD33xCD3

Лидеры	C3CB8	C3CB10	C3CB28	C3CB12	C3CB14	C3CB16	C3CB5	C3CB7
EC ₅₀ цитотоксичност и (нМ)	0,513	0,4728	0,6041	0,2677	0,538	0,6669	1,262	0,02129
Лидеры	C3CB87	C3CB88	C3CB89	C3CB90	C3CB91			
EC ₅₀ цитотоксичност и (нМ)	0,067	0,11	0,41	10,56	0,35			

[00305] Пример 5. Опосредованное CD33xCD3 снижение ex vivo бластов ОМЛ и активации Т-клеток в первичном образце ОМЛ

[00306] Для дальнейшей оценки потенциала цитотоксичности биспецифических антител к CD33xCD3 был проведен анализ цитотоксичности ex vivo с использованием цельной крови пациента с ОМЛ с использованием четырех лучших антител (Фиг. 2). В этом анализе различные биспецифические антитела (антитела к CD33, объединенные с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376) были добавлены к разведенной цельной крови пациентов с ОМЛ на период в 48 часов без добавления дополнительных Т-клеток, поскольку этот анализ основан на присутствии аутологичных Т-клеток в крови пациента. Через 48 часов образцы окрашивали CD3 PerCPy5.5, CD25 PE, CD33 FITC и CD38 APC (все антитела были приобретены у Biolegend; г. Сан-Диего, штат Калифорния). Затем образцы промывали по меньшей мере 3 раза в 1x буфере для лизиса эритроцитов Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience). Затем образцы окрашивали буфером для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies). Степень противоопухолевой цитотоксичности определяли путем первоначального количественного определения живых CD33⁺ клеток в доле раковых клеток пациента с ОМЛ (определяемых как CD3⁻CD38⁺ клетки) в присутствии биспецифических антител. Цитотоксичность рассчитывали в процентах по отношению к PBS/необработанному контролю с использованием следующего уравнения: (% CD33⁺ в PBS/необработанный контроль-% CD33⁺ в обработанном образце)/(% CD33⁺ в PBS/необработанный контроль). Активацию Т-клеток рассчитывали как процентную долю CD25⁺ событий в CD3⁺ фракции.

[00307] Как показано на Фиг. 2, все антитела-лидеры к CD33, объединенные с любым из плеч к CD3 (CD3B376 и CD3B219), способствовали дозозависимому снижению общей цитотоксичности, которое коррелировало с активацией Т-клеток через 48 часов. Контрольные антитела с нулевым плечом (NullxCD3B219 и nullxCD3B376) не продемонстрировали цитотоксичность в отношении опухолевых клеток или активацию Т-клеток. Этот результат также продемонстрировал, что биспецифические антитела

CD33xCD3 действуют в аутологичных условиях. Эти результаты отражают данные для 4 других образцов доноров с ОМЛ (данные не показаны). В Таблице 12 приводится краткая информация по значениям EC_{50} , полученным с помощью мультиспецифических антител к CD33xCD3. Как видно из значений EC_{50} , C33B904, объединенное с любым из плечей к CD3 (C3CB88, C3CB189), а также C33B836, объединенное с любым из плечей CD3 (C3CB7, C3CB97), были наиболее мощными и эффективными антителами. Таким образом, эти 4 антитела были предметом дальнейших исследований.

[00308] Таблица 12. Анализы опосредованной CD33xCD3 Т-клетками цитотоксичности ex vivo. Сводка значений EC_{50} для 8 биспецифических антител к CD33xCD3

Ид. номер биспецифического Ат	EC_{50} уничтожения первичных клеток ОМЛ (нМ)
C3CB11	3,958
C3CB12	2,635
C3CB7	0,3315
C3CB88	0,6722
C3CB103	4,186
C3CB102	4,973
C3CB97	0,2316
C3CB189	0,5782

[00309] Пример 6. Демонстрация того, что биспецифические антитела к CD33xCD3 связываются с C2-доменами CD33 и индуцируют цитотоксичность в отношении линий клеток, экспрессирующих однонуклеотидный полиморфизм (SNP) CD33

[00310] Анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности in vitro с использованием биспецифических антител к CD33xCD3

[00311] Последние исследования продемонстрировали, что в ~ 50% популяции с ОМЛ присутствовал однонуклеотидный полиморфизм (SNP) rs12459419, что приводило к пропуску экзона 2 CD33, в результате которого возникала делеция V-домена CD33. Это исследование также продемонстрировало, что Mylotarg, который связывается с V-доменом CD33, не эффективен у пациентов, экспрессирующих SNP, и, следовательно, снижает риск рецидива и улучшает выживаемость примерно у 50% популяции с ОМЛ (Lamba et al 2017, JCO, CD33 Splitting Polymorphism Determines Gemtuzумаб Ozogamicin Response in De Novo Acute Myeloid Leukemia: Report From Randomized Phase III Children's Oncology Group Trial AAML0531). Принимая во внимание данные о Mylotarg в вышеупомянутом исследовании, были проведены анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности in vitro, чтобы оценить, опосредуют ли подходящие антитела к CD33 (V-домен-связывающий C33B836 и C2-домен-связывающий C33B904) с плечами к CD3 (CD3B219 или CD3B376) уничтожение линий клеток, экспрессирующих SNP rs12459419. Вкратце, эффекторные клетки (пан Т-клетки, приобретенные у компании Biological Speciality) собирали, подсчитывали, промывали и ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в RPMI (Invitrogen) с добавлением 10% FBS (Invitrogen) для культуральных сред. Клетки-мишени (KG1, SH2 и OCIAML3) метили CFSE (Invitrogen) и

ресуспендировали в концентрации 2×10^5 клеток/мл в RPMI с 10% FBS. KG1, SH2 и OCIAML3 выбирали таким образом, чтобы они представляли собой дикий тип, гетерозиготный и гомозиготный по мутации CD33 SNP rs12459419, соответственно. Эффекторные клетки (E) и меченные CFSE клетки-мишени (T) смешивали в соотношении эффектор: мишень (E: T) = 5:1 в стерильных 96-луночных круглодонных планшетах. В каждую лунку добавляли по 10 μ л Fc Block (Fc-фрагмент РеоПро) вместе с аликвотой биспецифического антитела объемом 5 μ л в различных концентрациях. Культуры инкубировали при 37 °C в течение 48 часов в атмосфере с 5% CO₂. Через 48 часов к образцам добавляли буфер для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies), культуры инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре, промывали и ресуспендировали в 100-200 μ л буфера для FACS. Вызванную препаратом цитотоксичность определяли, используя проточный цитометр CANTO II (BD Biosciences), и анализировали, используя программное обеспечение FlowJo или Dive (BD Biosciences). Интерес представляет популяция дважды позитивных клеток CFSE+/живые/мертвые+. Как показано на Фиг. 3, в отличие от контролей с нулевым плечом (nullxCD3B219 и nullxCD3B376), V-домен-связывающие и C2-домен-связывающие CD33xCD3 мультиспецифические антитела индуцировали клеточную цитотоксичность с перенаправлением T-клеток для CD33+ДТ для линии клеток KG1 с мутацией SNP rs12459419 через 48 часов. Напротив, в отличие от V-домен-связывающего C33B836 (C3CB97, C3CB7), только C2-домен-связывающие спаренные биспецифические антитела C33B904 (C3CB189, C3CB88) опосредовали цитотоксичность в отношении линий клеток SH2 и OCIAML3, которые были гетерозиготными или гомозиготными по мутациям rs12459419 SNP, соответственно. По этой причине для дальнейшего анализа и определения характеристик использовали спаренные биспецифические антитела C33B904 (C3CB189, C3CB88). В совокупности эти данные демонстрируют, что биспецифические антитела, связывающие C2-домен CD33, такие как спаренные биспецифические антитела C33B904, обладают потенциалом к демонстрации эффективности в более широкой группе пациентов с ОМЛ, чем конкурентные связывающие V-домен антитела к CD33.

[00312] Пример 7. Ex vivo CD33xCD3-опосредованное снижение введенных MOLM-13 и моноцитов в анализе цитотоксичности в отношении MOLM-13 в цельной крови ex vivo

[00313] Для оценки потенциала цитотоксичности биспецифических антител к CD33xCD3 при устранении введенных клеток MOLM-13 и нормальных человеческих моноцитов был использован анализ цитотоксичности ex vivo с использованием нормальной цельной крови здорового человека с экзогенно добавленными MOLM-13 линии CD33⁺ клеток ОМЛ. Подобно описанному выше эксперименту, различные биспецифические антитела (антитела к CD33, объединенные с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376) были добавлены к разведенной цельной крови от 6 различных здоровых доноров-людей на период 48 часов без добавления дополнительных T-клеток, поскольку этот анализ основан на присутствии аутологических T-клеток в крови донора. Перед

разведением определяли содержание Т-клеток в крови каждого донора. Затем кровь разводили мечеными CFSE (Invitrogen) клетками MOLM-13 таким образом, чтобы соотношение эффектор: мишень (Е: Т) составляло 1:5, чтобы имитировать соотношение эффектор: мишень в образцах, полученных от пациентов с ОМЛ. Через 48 часов образцы окрашивали CD3 PerCPy5.5, CD25 PE, CD33 FITC и CD14 Pacific Blue (все антитела были приобретены у Biolegend). Затем образцы промывали по меньшей мере 3 раза в 1х буфере для лизиса эритроцитов Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience). Затем образцы окрашивали буфером для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies). Степень противоопухолевой цитотоксичности определяли путем первого количественного определения живых CD33⁺ клеток во фракции CD14⁺ моноцитов в присутствии биспецифических антител. Цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13 определяли путем подсчета процентного содержания мертвых CFSE⁺ клеток. Цитотоксичность моноцитов рассчитывали в процентах по отношению к PBS/необработанному контролю с использованием следующего уравнения: (% CD33⁺ CD14⁺ в PBS/необработанный контроль-% CD33⁺ CD14⁺ в обработанном образце)/(% CD33⁺ CD14⁺ в PBS/необработанный контроль). Данные на Фиг. 4 демонстрируют, что оба биспецифических антитела к CD33xCD3 (одно и то же лидерное С33В904 к CD33, спаренное с любым плечом к CD3, CD3В376 и CD3В219) специфически индуцируют цитотоксичность в отношении клеток MOLM-13 и CD33⁺ моноцитов через 48 часов. В качестве отрицательных контролей биспецифических антител использовали контрольные антитела с нулевым плечом. Контроль с нулевым плечом продемонстрировал незначительную цитотоксическую активность в отношении MOLM-13 и CD33⁺ моноцитов или ее отсутствие. Эти данные демонстрируют средние значения для 6 разных здоровых доноров. Средние значения ЭК₅₀ для цитотоксичности в отношении MOLM-13 и CD14⁺ моноцитов приведены в Таблице 13.

[00314] Таблица 13. Анализы опосредованной CD33xCD3 Т-клетками цитотоксичности ex vivo. Сводная информация по значениям EC₅₀ для 2 биспецифических антител к CD33xCD3.

Ид. номер биспецифического Ат	EC ₅₀ уничтожения MOLM13 (нМ)	EC ₅₀ уничтожения CD33 ⁺ CD14 ⁺ (нМ)
С3СВ189	0,1677	1,156
С3СВ88	0,671	0,506

[00315] Пример 8. Демонстрация видовой перекрестной реактивности биспецифических антител к CD33xCD3 в отношении яванского макака

[00316] Опосредованное CD33xCD3 снижение ex vivo моноцитов в анализе цитотоксичности ex vivo с использованием цельной крови яванского макака

[00317] Для демонстрации функциональной перекрестной реактивности и оценки цитотоксического потенциала биспецифических антител к CD33xCD3 при уничтожении нормальных моноцитов яванского макака использовали анализ цитотоксичности ex vivo с

использованием цельной крови здорового яванского макака. Подобно описанному выше эксперименту, различные биспецифические антитела (антитела к CD33, объединенные с плечами к CD3 CD3B219 и CD3B376) были добавлены к разведенной цельной крови от 6 различных здоровых доноров-яванских макаков на период 48 часов без добавления дополнительных Т-клеток, поскольку этот анализ основан на присутствии аутологичных Т-клеток в крови донора. Через 48 часов образцы окрашивали CD3 PerCPCy5.5, CD25 PE, CD33 FITC и CD14 Pacific Blue (все антитела были приобретены у Biolegend, за исключением антитела к CD33, которое было приобретено у Miltenyi; Бергиш-Гладбах, Германия). Затем образцы промывали по меньшей мере 3 раза в 1x буфере для лизиса Lyse RBC Lysis Buffer (eBioscience) перед окрашиванием буфером для окрашивания мертвых клеток LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain (Life Technologies). Степень цитотоксичности в отношении моноцитов определяли путем первого количественного определения живых CD33⁺ клеток во фракции CD14⁺ моноцитов в присутствии биспецифических антител. Цитотоксичность рассчитывали в процентах по отношению к PBS/необработанному контролю с использованием следующего уравнения: (% CD33⁺ CD14⁺ в PBS/необработанный контроль-% CD33⁺ CD14⁺ в обработанном образце)/(% CD33⁺ CD14⁺ в PBS/необработанный контроль). Активацию Т-клеток рассчитывали как процентную долю CD25⁺ событий в CD3⁺ фракции. Данные на Фиг. 5 демонстрируют, что оба биспецифических антитела к CD33xCD3 (одно и то же лидерное C33B904 к CD33, объединенное с плечом к CD3, CD3B376 или CD3B219) специфически индуцируют клеточную цитотоксичность в отношении CD33⁺ моноцитов, а также активацию Т-клеток через 48 часов. Контрольные антитела с нулевым плечом использовали в качестве отрицательных контрольных биспецифических антител, и они демонстрировали незначительную цитотоксичность или активность Т-клеток или ее отсутствие. В Таблице 14 приведены средние значения 6 различных доноров-яванских макаков.

[00318] Таблица 14. Анализы опосредованной CD33xCD3 Т-клетками цитотоксичности ex vivo. Сводка значений EC₅₀ для 2 биспецифических антител к CD33xCD3.

Идентификатор белка по аминокислотам	EC ₅₀ уничтожения CD33 ⁺ CD14 ⁺ (нМ)	EC ₅₀ активации Т-клеток (нМ)
C3CB189	3,60	0,02
C3CB88	0,89	0,02

[00319] Пример 9. Эффективность C3CB189 и C3CB88 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей линии NSG

[00320] Эффективность C3CB189 и C3CB88 оценивали на стандартных ксенотрансплантатах человеческих клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) MOLM-13, трансфицированных люциферазой, у самок мышей линии NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), гуманизированных 20 миллионами Т-клеток. Животных рандомизировали в n=10/группу с помощью биолюминесцентной визуализации в реальном времени (BLI) на 5-й день после в/в имплантации опухоли. C3CB189 и C3CB88

в концентрации 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг или контрольное антитело к NullxCD3 в концентрации 0,5 мг/кг вводили и/п каждые 3-4 дня в течение 6 недель.

[00321] На 13 день после имплантации опухоли, когда в каждой группе оставалось по меньшей мере восемь животных, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI), определяемое по результатам биолюминесценции. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для СЗСВ189 (Фиг. 6) и СЗСВ88 (Фиг. 8) во всех концентрациях по сравнению с контролем к NullxCD3. СЗСВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг вызывал ингибирование роста опухоли на 76%, 100% и 82%, соответственно, а СЗСВ88 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг вызывало ингибирование роста опухоли на 100%, 100% и 91%, соответственно, по сравнению с контролями, обработанными NullxCD3.

[00322] Лечение СЗСВ189 и СЗСВ88 привело к снижению опухолевой нагрузки и увеличению продолжительности жизни (ILS) по сравнению с 16-дневной медианой выживаемости в контрольной группе NullxCD3. В зависимости от доз медиана выживаемости животных, получавших лечение СЗСВ189, составила 19-27,5 дней (Фиг. 7), а у животных, получавших лечение СЗСВ88, медиана выживаемости составила 26-28,5 (Фиг. 9) дней СЗСВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг привел к увеличению продолжительности жизни на 19%, 72% и 50%, соответственно, а СЗСВ88 привел к увеличению продолжительности жизни на 63%, 78% и 72%, соответственно, по сравнению с контрольной группой.

[00323] Пример 10. Демонстрация интернализации антител к CD33 в анализ жизнеспособности клеток с конъюгатом лекарственное средство- белок А in vitro

[00324] Для обнаружения интернализации связанных с лигандом антител-мишеней выполняли анализ жизнеспособности клеток in vitro с использованием предварительно загруженного конъюгата лекарственное средство - белок А А-ММАF. Этот клеточный функциональный анализ проводили с помощью панели антител к CD33, СЗЗВ782, СЗЗВ806, СЗЗВ836, СЗЗВ904, СЗЗВ937 и изотипического контрольного антитела CNTO9412 в линии клеток ОМЛ MOLM13. В данном анализе только антитело-мишень тестировали в качестве контроля для дифференциации цитотоксичности, обусловленной интернализацией антител, и цитотоксичности, обусловленной активностью исследуемых антител самих по себе. На Фиг. 10 показана цитотоксичность антител, связанных с белком А - ММАF, в MOLM13 после 72 часов инкубации при 37 °C, 5% CO₂. Зависимую от концентрации цитотоксичность наблюдали для всех пяти антител CD33 в отношении клеток MOLM13, что указывает на интернализацию всех пяти антител в этой линии клеток. Изотипическое контрольное антитело CNTO9412 не демонстрировало существенной зависимой от концентрации цитотоксичности, что указывает на специфическую интернализацию этих антител к CD33 в клетках MOLM13. В Таблице 15 приведены значения EC₅₀ для пяти (5) биспецифических антител к CD33xCD3.

[00325] Результаты также продемонстрировали, что антитело СЗЗВ836 обладает лучшей интернализацией в клетках MOLM13, чем другие.

[00326] Таблица 14. Анализы интернализации CD33. Сводка значений EC₅₀

для пяти антител к CD33.

	C33B782	C33B806	C33B836	C33B904	C33B937	CNT09412
EC ₅₀ (нМ)	0,88	0,22	0,04	0,96	1,92	

[00327] Пример 11. Демонстрация того, что антитела к CD33 могут опосредовать активность АЗКЦ

[00328] Чтобы охарактеризовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) мкАт к CD33, были проведены анализы АЗКЦ *in vitro* с использованием эффекторных NK-клеток здоровых доноров и клеток-мишеней ОМЛ MOLM-13 и MV4-11. NK-клетки здорового донора (Biological Specialty Corporation, донор CC00061 и M7015; г. Колмар, штат Пенсильвания) высевали в ростовую среду MyeloCult H5100 (Stem Cell Technologies; г. Ванкувер, штат Калифорния, США) с добавлением 1×10^6 М гидрокортизона (Stem Cell), 7,5 нг/мл рекомбинантного человеческого ИЛ-2 (R&D Systems; г. Миннеаполис, штат Миннесота), 1% натрий пирувата (Life Technologies), 1% заменимых аминокислот (Life Technologies), 1% пенициллин-стрептомицина (Life Technologies) за 16-24 часа до начала анализа АЗКЦ. В день анализа 1×10^6 клеток/мл клеток MOLM-13 и MV4-11 метили 10 мкМ ацетооксиметилового эфира кальцеина при 37 °С в течение 30 минут. После мечения клетки трижды промывали для удаления избытка ацетооксиметилового эфира кальцеина. Впоследствии меченные 1×10^5 ацетооксиметиловым эфиром кальцеина клетки-мишени MOLM-13 или MV4-11 инкубировали в течение 1,5 часов при 37 °С с NK-клетками здорового донора (3×10^5) в присутствии различных концентраций антител к CD33. Контрольные образцы с максимальным лизисом получали путем добавления Triton X100 в обозначенные лунки с контрольными образцами с конечной концентрацией 0,5%. Высвобождение ацетооксиметилового эфира кальцеина измеряли посредством флуоресценции при 485-535 нм с помощью многорежимного планшет-ридера SpectraMax® M5 (Molecular Devices, LLC; Саннивейл, штат Калифорния, США). Процент лизиса клеток определяли путем нормализации данных по максимальному (опосредованному Triton X100) и минимальному (только эффекторные клетки) лизису с использованием следующего уравнения: % лизиса = [(экспериментальный лизис-спонтанный лизис)/(макс. лизис-спонтанный лизис)]*100.

[00329] Антитела к CD33 на основе IgG1 с низким содержанием фукозы индуцировали АЗКЦ зависимым от концентрации образом (Фиг. 11). C33B48.CLF продемонстрировало более высокую активность АЗКЦ против клеток MOLM-13 и MV4-11, чем C33B912.CLF со значениями полумаксимальной эффективной концентрации в 12-23 раз большими (EC₅₀, Таблица 16). Максимальный лизис клеток MOLM-13 и MV4-11 в ответ на C33B48.CLF и C33B912.CLF был аналогичным.

[00330] Таблица 16. Анализы АЗКЦ CD33. Сводка значений EC₅₀ для 2 антител к CD33 и 2 линий клеток

	EC ₅₀ АЗКЦ C33B48.CLF (нМ)	EC ₅₀ АЗКЦ C33B912.CLF (нМ)
MOLM-13	0,023	0,292
MV4-11	0,113	2,008

[00331] Пример 12. Характеристики связывания антитела СЗСВ189, которое нацелено на CD33, где антиген в большом количестве экспрессируется лейкобластами.

[00332] СЗСВ189 представляет собой полностью человеческое биспецифическое антитело-иммуноглобулин G (IgG)4-РАА, нацеленное на рецепторный комплекс CD3 на Т-клетках и CD33 на миелоидных клетках. СЗСВ189 связывается с человеческим рекомбинантным (r)CD33 с аффинностью (K_d) 0,89 пМ и с rCD33 яванского макака (макака) с аффинностью (K_d) 363 пМ. СЗСВ189 также связывается с rCD3e человека и яванского макака с аффинностями (K_d) 151,32 и 43,83 нМ, соответственно. СЗСВ189 специфически связывалась с CD33-экспрессирующими линиями клеток ОМЛ KG-1, MOLM-13, Kasumi-1 и OCI-AML3 (Фиг. 12). Аналогичный характер связывания наблюдали для отрицательного контрольного антитела к CD33×null, как и ожидалось, поскольку оно содержит одно Fab-плечо к CD33. Отрицательные контрольные биспецифические антитела к null×CD3, а также к null×null, не продемонстрировали значительного связывания с этими клетками. Ни одно из протестированных биспецифических антител не связывалось с CD33-отрицательными линиями клеток, CARNAVAL и KG-1ΔCD33, то есть клетками KG 1 с генетической делецией CD33 с использованием CRISPR (Фиг. 12). Кроме того, в отличие от исходных клеток НЕК-293Т, СЗСВ189, связывалось с клетками НЕК-293Т, экспрессирующими CD33 яванского макака, что демонстрирует перекрестную реактивность в отношении яванского макака (Фиг. 12).

[00333] Пример 13: СЗСВ189 уничтожает линии CD33⁺ клеток ОМЛ и активирует Т-клетки in vitro

[00334] Затем использовали анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности для оценки активности СЗСВ189 in vitro в различных линиях клеток, включая линии CD33⁺ клеток, такие как линии клеток MOLM-13, KG-1, SKNO-1, Kasumi-1 и OCI-AML3, а также линии клеток CD33^{no/low}, такие как CARNAVAL и KG1ΔCD33. Анализы проводили с выделенными человеческими пан CD3⁺ Т-клетками от шести здоровых доноров и блокатором кристаллизующегося фрагмента иммуноглобулина (Fc). Для предотвращения опосредованного Fc рекрутинга СЗСВ189 добавляют блокатор Fc, поскольку мутации РАА в области Fc IgG4 не делают ее полностью молчащей (Vafa et al., 2014) и поскольку Fc-гамма-рецепторы (FcγR) часто экспрессируются на клетках ОМЛ (Ball et al., 1989).

[00335] Как показано на Фиг. 13, СЗСВ189 продемонстрировала опосредованную Т-клетками цитотоксичность в отношении линий CD33⁺ клеток ОМЛ в комбинации с очищенными Т-клетками через 48 часов (Фиг. 13). Медиана полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) [а также значения EC_{20}] для MOLM-13, KG-1, Kasumi-1 и OCI-AML3 составляли 0,1307 [0,0283], 0,1677 [0,0525], 0,05 [0,0366] и 0,1826 [0,0844] нМ, соответственно (Фиг. 2В). Цитотоксичность в отношении линий CD33-отрицательных клеток CARNAVAL и KG-1ΔCD33 или для контрольных биспецифических антител (null×CD3 или CD33×null; см. Фиг. 13). Мы подтвердили, что клетки KG1ΔCD33

действительно могут быть нацелены Т-клетками путем выполнения анализов цитотоксичности с биспецифическим антителом к CD123xCD3 (Фиг. 14А).

[00336] Степень Т-клеточной активации, индуцированной СЗСВ189, в присутствии линий CD33⁺ опухолевых клеток также оценивали *in vitro* в анализах цитотоксичности, при этом экспрессию CD25 измеряют в качестве индикатора активации. Как показано на Фиг. 2С, СЗСВ189 индуцировал активацию Т-клеток при инкубации с линиями CD33⁺ опухолевых клеток и пан Т-клетками здорового донора, тогда как минимальная активация Т-клеток или ее отсутствие наблюдалась для клеток CD33⁻ CARNAVAL и KG-1ΔCD33. Медиана EC₅₀ [EC₂₀] для MOLM-13, KG-1, Kasumi-1 и OCI-AML3 составляли 0,0283 [0,0077], 0,0664 [0,0256], 0,0432 [0,0267] и 0,0500 [0,0178] нМ, соответственно (Фиг. 15С). СЗСВ189 не вызывал активацию Т-клеток в отсутствие клеток-мишеней, демонстрируя специфичность активации Т-клеток (Фиг. 14В). Контрольное антитело к CD33xnull не индуцировало активацию Т-клеток ни в одной линии клеток. Контрольное антитело к nullxCD3 индуцировало активацию Т-клеток при самых высоких концентрациях 533 и 53 нМ в присутствии линий CD33⁺ и CD33⁻ клеток, но не могло опосредовать активацию при любой другой дозе. Важно отметить, что СЗСВ189 продемонстрировал специфическую индукцию активации Т-клеток только в присутствии линий CD33⁺ клеток, но не в присутствии линии CD33⁻ клеток (Фиг. 15А) или когда Т-клетки инкубировали в отсутствие клеток-мишеней (Фиг. 14В).

[00337] Наконец, цитокиновые ответы также оценивали в вышеупомянутом анализе перенаправления Т-клеток *in vitro* с линией клеток Kasumi-1. СЗСВ189 приводило к секреции нескольких цитокинов, включая интерферон-гамма (ИФН-γ), фактор некроза опухоли альфа (ФНО-α), интерлейкин (ИЛ)-2 и ИЛ-8 (дополнительная Фиг. 3). Эти данные согласуются с данными по цитотоксичности и активации Т-клеток, приведенными на Фиг. 13 и Фиг. 15А - 15С. сводные данные по медианной EC₅₀ и концентрации, продуцирующей 20% от максимальных возможных эффектов (EC₂₀) для цитокиновых ответов, приведены в Таблице 17.

Таблица 17. Значения эффективных концентраций СЗСВ189-опосредованного высвобождения цитокинов в анализе перенаправления Т-клеток с очищенными Т-клетками и клетками-мишенями Kasumi-1. Значения EC указаны в нМ. n представляет количество доноров из 6, для которых можно определить значения EC.

Цитокин	n	Медиана EC ₂₀	Медиана EC ₅₀	Медиана EC ₉₀
ИФН-гамма	6	0,048	0,16	1,409
НЕК-1бета	6	0,013	0,045	0,226
ИЛ-2	4	0,090	0,346	5,282
ИЛ-4	4	0,054	0,078	0,153
ИЛ-8	6	0,015	0,042	0,246
ИЛ-10	6	0,052	0,123	1,271
ИЛ-13	5	0,008	0,034	0,103
ФНО-альфа	6	0,049	0,208	3,530

[00338] Пример 14. СЗСВ189 демонстрирует эффективную противоопухолевую активность *in vivo*

[00339] Оценивали функцию СЗСВ189 в двух стандартных моделях ксенотрансплантата у гуманизированных Т-клетками мышей линии NSG. У мышей с развившимися подкожными опухолями KG-1, лечение СЗСВ189 в дозах 0,1, 0,5 и 1 мг/кг вызвало ингибирование роста опухоли на 41%, 92% и 87%, соответственно, по сравнению с контрольными животными, получавшими антитело к nullxCD3 ($p < 0,0001$ для 0,5 и 1 мг/кг, Фиг. 16А). СЗСВ189 в дозах 0,5 и 1 мг/кг также приводил к 6 и 7 полным ответам на 55 день, соответственно.

[00340] В развившейся диссеминированной экспрессирующей люциферазу модели MOLM-13 (MOLM-13-luc), после подтверждения хоминга клеток ОМЛ в костный мозг (КМ) после внутривенной инъекции начинали лечение СЗСВ189. СЗСВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг вводили каждые 3-4 дня, что значительно подавляло рост опухоли, согласно биолюминесцентной оценке, (76%, 100% и 82%, соответственно) по сравнению с мышами, получавшими контроль к nullxCD3 (Фиг. 17). СЗСВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг приводил к статистически значимому увеличению продолжительности жизни на 19%, 72% и 50%, соответственно, ($p < 0,0001$, Фиг. 16 В), коррелирующей со сниженной опухолевой нагрузкой в КМ, позвоночнике и задней конечностях, наблюдаемой с помощью биолюминесценции (Фиг. 16С). В конце исследования на 55 день у трех животных, получавших лечение СЗСВ189 в дозе 0,05 мг/кг, наблюдался полный ответ по результатам ВЛ.

[00341] Более того, мыши с опухолями MOLM-13-luc, получавшие лечение СЗСВ189 в дозе 0,05 мг/кг и в меньшей степени в дозе 0,005 мг/кг, демонстрировали снижение числа опухолевых клеток и увеличение инфильтрации CD3⁺ Т-клеток в костном мозге по данным проточной цитометрии (Фиг. 16D) и увеличение инфильтрации CD8⁺ Т-клеток по ИГХ (Фиг. 3Е) на 11 день. Эти данные важны, поскольку КМ часто является местом резистентности к лейкозным стволовым клеткам (ЛСК) при ОМЛ и персистенцией минимальной остаточной болезни. Вместе эти данные демонстрируют, что СЗСВ189 ингибирует рост опухоли в двух опухолевых моделях ОМЛ путем рекрутирования Т-клеток в очаг опухоли у гуманизированных Т-клетками мышей.

[00342] Пример 15. СЗСВ189 опосредует цитотоксичность клеток ОМЛ, введенных в нормальную цельную кровь, а также бластов ОМЛ, из первичных образцов пациентов

[00343] Сообщается, что внеклеточный домен (ВКД) CD33 слущивается с клеток; таким образом, нормальные образцы и образцы пациентов могут содержать растворимый CD33 (sCD33). Исследование показало, что в плазме пациентов с ОМЛ обнаруживается около 4-30 нг/мл sCD33 (Biedermann, B., Gil, D., Bowen, D. T., and Crocker, P. R. (2007). *Leuk Res* 31, 211-220.). Это значение превышает 0,6-5,8 нг/мл концентрации, определенной в сыворотке здорового человека (Biedermann, B., Gil, D., Bowen, D., and Crocker, P. R. (2007). *Leuk Res* 31, 211-220.).

[00344] Для определения физиологических уровней sCD33 у здоровых доноров и доноров с ОМЛ был разработан анализ методом масс-спектрометрии (МС) с

иммунозахватом. Анализ нормальных образцов сыворотки и образцов сыворотки при ОМЛ показал сходные средние уровни sCD33, составляющие 53,03 нг/мл (1,91 нМ) и 52,90 нг/мл (1,90 нМ), соответственно (Таблица 18).

Таблица 18. Оценка уровней sCD33 в нормальных образцах и образцах от пациентов с ОМЛ. Образцы сыворотки здоровых людей и людей с ОМЛ (n=20/каждый) анализировали на уровни sCD33 с применением масс-спектропии.

Образец	Концентрация (нМ)	Концентрация (нг/мл)
Индивидуум 1	0,23	6,15
Индивидуум 2	Н/Д	Н/Д
Индивидуум 3	Н/Д	Н/Д
Индивидуум 4	0,21	5,59
Индивидуум 5	Н/Д	Н/Д
Индивидуум 6	0,25	6,73
Индивидуум 7	0,24	6,39
Индивидуум 8	Н/Д	Н/Д
Индивидуум 9	0,23	6,14
Индивидуум 10	0,21	5,69
Среднее значение для NHS (подлежащее регистрации)	0,23	6,12
Донор 1 с ОМЛ	0,14	3,76
Донор 2 с ОМЛ	0,14	3,71
Донор 3 с ОМЛ	Н/Д	Н/Д
Донор 4 с ОМЛ	0,15	3,92
Донор 5 с ОМЛ	0,16	4,32
Донор 6 с ОМЛ	0,13	3,61
Донор 7 с ОМЛ	Н/Д	Н/Д
Донор 8 с ОМЛ	0,17	4,44
Донор 9 с ОМЛ	0,14	3,81
Донор 10 с ОМЛ	Н/Д	Н/Д
Среднее для ОМЛ (подлежащее регистрации)	0,15	3,94

Нормальная сыворотка человека (NHS)

Сыворотка доноров с ОМЛ (ОМЛ)

[00345] Чтобы оценить активность СЗСВ189 в более физиологически значимых условиях, мы выполнили анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности с

использованием цельной периферической крови человека в качестве источника эффекторных Т-клеток, с добавлением различных CD33⁺ опухолевых клеток в качестве мишеней и инкубацией в течение 48 часов. СЗСВ189 индуцировал опосредованную Т-клетками цитотоксичность клеток CD33⁺ MOLM-13 и Kasumi-1, при этом медианные значения EC₅₀ [EC₂₀] составляли 0,111 [0,054] и 0,124 [0,06] нМ, соответственно (Фиг. 17). Аналогичным образом, СЗСВ189 приводил к активации Т-клеток (как указано клетками CD25), MOLM-13 и Kasumi-1, при этом медианные значения EC₅₀ [EC₂₀] составляли 0,037 [0,017] и 0,085 [0,039] нМ, соответственно (Фиг. 18А и 18В). Измеренная опосредованная СЗСВ189 активация Т-клеток представляет собой общую активацию Т-клеток в крови и отражает активацию, связанную с уничтожением как экзогенных CD33⁺ опухолевых клеток, так и, возможно, эндогенных периферических CD33⁺ лейкоцитов, таких как нейтрофилы и моноциты, цитотоксичность которых в этом анализе не измеряли. Кроме того, эти данные свидетельствуют о том, что СЗСВ189 опосредует уничтожение опухолевых клеток, несмотря на наличие исходных уровней sCD33 и других CD33⁺ лейкоцитов в цельной крови.

[00346] Затем оценивали способность СЗСВ189 индуцировать цитотоксичность в более клинически значимом контексте в анализе цитотоксичности *ex vivo* с использованием цельной крови доноров с ОМЛ. Данная система основана на присутствии аутологичных Т-клеток в собственной крови пациента для уничтожения клеток ОМЛ. Измеряли степень опосредованной Т-клетками цитотоксичности в отношении CD33⁺ клеток и активации Т-клеток. СЗСВ189 индуцировал зависимую от концентрации цитотоксичность CD33⁺ бластов (Фиг. 19А), которая также коррелировала с повышенной активацией Т-клеток (Фиг. 19В) во всех образцах, полученных от 6 пациентов. Максимальная цитотоксичность, индуцированная СЗСВ189, составляла приблизительно 60% CD33⁺ бластов. Контрольные антитела с нулевым плечом индуцировали ограниченную цитотоксичность и активацию Т-клеток. СЗСВ189 индуцировал цитотоксичность и активацию Т-клеток, которая приводила к значениям EC₅₀, которые находились в диапазоне от 0,052 до 9,52 нМ (медиана: 0,365 нМ) и от 0,03 до 5,109 нМ (медиана: 0,355 нМ), соответственно (Фиг. 19А и 19В). Эти данные демонстрируют, что СЗСВ189 эффективно уничтожал CD33⁺ клетки ОМЛ в более физиологических условиях *ex vivo* и в присутствии исходных уровней sCD33.

[00347] Пример 16. Оценка перекрестной реактивности яванских макак в отношении СЗСВ189

[00348] Для оценки того, является ли яванский макак (макак) подходящей моделью для оценки активности СЗСВ189, мы сначала исследовали методом проточной цитометрии экспрессию CD33 на лейкоцитах, полученных от 6 здоровых яванских макак. Было обнаружено, что Т- и В-клетки в периферической крови макаки имеют низкие или нулевые уровни экспрессии CD33 (Фиг. 20). Приблизительно от 75% до 96% нейтрофилов яванского макака экспрессировали CD33 со средней плотностью антигенов 7,545 молекул/клетка (Фиг. 20). С другой стороны, процентное содержание CD33⁺ моноцитов

макаки у 6 доноров варьировало от 0% до 84% при средней плотности антигена 2146 молекул на клетку (Фиг. 20).

[00349] Затем, чтобы продемонстрировать перекрестную реактивность в отношении яванского макака и оценить потенциал цитотоксичности СЗСВ189 в элиминации нормальных моноцитов и нейтрофилов яванского макака, мы провели анализы цитотоксичности *ex vivo* с использованием цельной крови здоровых яванских макаков с экзогенно добавленными клетками CD33⁺ MOLM-13. В этой системе также отслеживали истощение нормальных CD33⁺ моноцитов яванского макака и нормальных нейтрофилов яванского макака наряду с активацией Т-клеток. Действительно, опосредованное СЗСВ189 уничтожение CD33⁺ клеток MOLM-13 (EC₅₀: 0,013-0,452 нМ) вместе с нормальными CD33⁺ моноцитами яванского макака (EC₅₀: 0,625-5,636 нМ) и нормальными нейтрофилами яванского макака (EC₅₀: 0,013-0,714 нМ) *in vitro* через 48 часов инкубации *ex vivo* (Фиг. 21). Контроль к null×CD3 демонстрировал ограниченную цитотоксичность в отношении всех CD33⁺ клеток-мишеней и демонстрировал активацию Т-клеток только при самой высокой дозе 533 нМ. В совокупности эти данные демонстрируют функциональную перекрестную реактивность у яванских макаков СЗСВ189 и определяют CD33⁺ моноциты и нейтрофилы яванского макака в качестве потенциальных фармакодинамических (ФД) маркеров в исследованиях на отличных от человека приматах. Эти данные также демонстрируют, что СЗСВ189 может опосредовать истощение человеческой линии клеток ОМЛ Т-клетками яванского макака. Важно отметить, что эти результаты подтверждают, что яванский макак является подходящей моделью эффективности для СЗСВ189.

[00350] Пример 17. СЗСВ189 опосредует снижение CD33⁺ лейкоцитов у яванских макаков

[00351] Для оценки фармакокинетики (ФК) и фармакодинамики (ФД) СЗСВ189 *in vivo*, яванским макакам вводили однократную в/в дозу СЗСВ189. ФК профили представлены на Фиг. 22А. СЗСВ189 проявляла ФК характеристики типичного моноклонального антитела (мкАт) с приблизительно линейной ФК в диапазоне доз 0,05-1 мг/кг. Расчетное среднее значение общего клиренса СЗСВ189 составило от 13,03 до 21,39 мл/день/кг, объем распределения составил от 89,14 до 154,91 мл/кг, а конечный период полувыведения составил от 4,20 до 5,06 дней. По-видимому, наблюдали ускоренное выведение СЗСВ189 после 10 дня из группы животных, получавшей дозу 1 мг/кг. Это наиболее вероятно связано с выработкой антител к лекарственному средству (ADA), хотя ADA в данном исследовании не тестировали.

[00352] В соответствии с предполагаемым механизмом действия наблюдали дозозависимое увеличение активации Т-клеток (% CD25⁺) после однократной в/в дозы СЗСВ189, при этом пик % CD25⁺ на цитотоксических Т-лимфоцитах (CD8⁺/CD4⁻) наблюдался в первый момент времени через 24 часов после введения дозы (Фиг. 22В). Т-лимфоциты-хелперы (CD4⁺/CD8⁻) также демонстрировали схожие профили активации (% CD25⁺) после введения дозы СЗСВ189 (данные не показаны). Введение СЗСВ189 также

приводило к дозозависимому увеличению концентрации анализируемых цитокинов в плазме (ИФН- γ , ИЛ-10, ИЛ-2, ИЛ-6, МСР-1 и ФНО- α) через 2 часа после введения дозы (Фиг. 23). За исключением ИЛ-10 и МСР-1, уровни цитокинов вернулись к уровню ниже нижнего предела количественного определения (НПКО) через 24 часа после введения дозы.

[00353] Введение доз связанного с СЗСВ189 приводило к устойчивому снижению CD33⁺ гранулоцитов (нейтрофилов). В соответствии с более низкими уровнями экспрессии CD33 на моноцитах также наблюдалось более временное снижение CD33⁺ моноцитов. Профили зависимости концентрации от времени для гранулоцитов и моноцитов показаны на Фиг. 22С и Фиг. 22D, соответственно. Хотя первоначальное быстрое исчезновение гранулоцитов и моноцитов из периферической крови может быть связано с временным скоплением лейкоцитов по краю участка воспаления, связанным с активацией Т-клеток, снижение популяций CD33⁺ гранулоцитов/моноцитов было гораздо более продолжительным. В частности, снижение популяций гранулоцитов продолжало достигать почти максимального уровня до 8 дня и постепенно восстанавливалось после этого. Восстановление моноцитов происходило раньше и было более заметным.

[00354] СЗСВ189 также исследовали в других двух исследованиях на яванских макаках после многократного в/в введения при уровнях дозы в диапазоне от 0,01 мг/кг до 30 мг/кг. Изменения, связанные с СЗСВ189, как правило, соответствовали изменениям, наблюдаемым после однократной дозы, и СЗСВ189 хорошо переносился при этих уровнях дозы (данные не показаны). Вместе эти данные свидетельствуют о опосредующей СЗСВ189 активности при сохранении переносимости у яванских макаков.

[00355] Пример 18. СЗСВ189-опосредованная цитотоксичность в отношении линий CD33⁺ клеток и образцов пациентов независимо от генотипов SNP rs12459419

SNP, rs12459419 (C>T; Ala14Val в экзоне 2) происходит в пределах регуляторного сайта сплайсинга CD33, в котором Т-аллель приводит к повышенной экспрессии транскриптов, которые, как предполагается, кодируют изоформу белка CD33, не содержащую домен V-типа. Недавние данные дополнительно показали, что субъекты с генотипом SNP rs12459419 CC (около 50% участников исследования) имели значительно более низкий риск рецидива и лучшую бессобытийную выживаемость (EFS) и выживаемость без признаков заболевания после терапии гемтузумаб озогамицином, хотя этот положительный эффект не наблюдался у пациентов с генотипами СТ или ТТ (Lamba, J. K., Chauhan, L., Shin, M., Loken, M. R., Pollard, J. A., Wang, Y. C., Ries, R. E., Aplenc, R., Hirsch, B. A., Raimondi, S. C., et al. (2017). *J Clin Oncol* 35, 2674-2682.). Принимая во внимание данные, полученные в ходе вышеупомянутого исследования, мы оценивали влияние генотипов SNP-rs12459419 на активность СЗСВ189. Сначала посредством картирования водород-дейтериевого обмена (HDX) было подтверждено, что СЗСВ904 (исходное плечо к CD33 версии IgG₄ в СЗСВ189) связывается с различными областями в С2-домене (IgC на Фиг. 24А) CD33 и не связывается с V-областью (IgV на Фиг. 24А). Напротив, СЗСВ836 (исходное плечо к CD33 версии IgG₄ в СЗСВ97) связывается с V-

доменом CD33 и не связывается в C2-области CD33. Далее мы использовали анализы опосредованной Т-клетками цитотоксичности *in vitro* для сравнения ответов, опосредованных связыванием СЗСВ97 (вещество, связывающее V-домен), и СЗСВ189 (вещество, связывающее C2-домен). На основании данных генотипирования (Фиг. 25А), KG-1, SH2 и OCI-AML3 выбирали таким образом, чтобы они представляли собой СС дикого типа, гетерозиготный СТ и гомозиготный ТТ по мутации CD33 SNP rs12459419, соответственно. В отличие от контроля к nullxCD3, V-домен и C2-домен-связывающие биспецифические антитела к CD33xCD3 индуцировали цитотоксичность с перенаправлением Т-клеток к линии клеток CD33⁺ KG-1 СС через 48 ч (Фиг. 6В). Напротив, в отличие от V-связывающего СЗСВ97, только C2-связывающее СЗСВ189 опосредовало цитотоксичность в отношении линии клеток SH2 «СТ» и линий клеток OCI-AML3 «ТТ», в то время как активность V-связывающего СЗСВ97 не наблюдалась.

[00356] Затем проводили анализы цитотоксичности *ex vivo* с использованием цельной крови пациента с ОМЛ для продления и подтверждения наших вышеуказанных наблюдений. Основываясь на данных генотипирования, образцы пациентов 6095, 6116 и 6152 были идентифицированы как имеющие генотип СС, тогда как образцы пациентов 6129 и USAML0078 были идентифицированы как гетерозиготные по CD33 SNP rs12459419, соответственно (Фиг. 25В). Никакие образцы не были идентифицированы как гомозиготные по CD33 SNP rs12459419. V-домен- и C2-домен-связывающие биспецифические антитела к CD33xCD3 действительно индуцировали сопоставимую цитотоксичность с перенаправлением Т-клеток в образцах ОМЛ, для которых был определен генотип СС; Напротив, C2-домен-связывающее СЗСВ189 продемонстрировало повышенную цитотоксичность в отношении образцов ОМЛ, которые были гетерозиготными (СТ) по мутации SNP rs12459419, по сравнению с V-домен-связывающим СЗСВ97 (Фиг. 24В). Затем, учитывая, что SNP rs12459419 является мутацией зародышевой линии, мы провели аналогичные эксперименты *ex vivo* с очищенными моноцитами и сопоставленными аутологичными Т-клетками от 25 различных здоровых доноров. Данные генотипирования для всех 25 доноров показаны на Фиг. 25С. В соответствии с тем фактом, что СЗСВ189 связывается с C2-доменом CD33, СЗСВ189 опосредует цитотоксичность первичных моноцитов человека независимо от их статуса генотипа SNP (см. Фиг. 24С). Напротив, V-домен-связывающее СЗСВ97 ограничено отсутствием цитотоксичности, когда образцы были СТ или ТТ по SNP rs12459419. Вместе эти три линии доказательств предполагают, что СЗСВ189 может демонстрировать эффективность в более широкой группе пациентов с ОМЛ, воздействуя на консервативный эпитоп C2.

[00357] Специалистам в данной области следует понимать, что в варианты осуществления, описанные выше, можно вносить изменения без отступления от общей концепции, обладающей признаками изобретения, представленной в настоящем документе. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно

охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения, определяемых настоящим описанием.

Таблица 19. Последовательности вариабельной области тяжелой цепи

Ид. номер НС	Ид. номер	Аминокислотная последовательность
B23H1	256	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKA LEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTMNMDP VDTATYYCARLYGFTYGFAYWGQGLVTVSS
CD3H141	257	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMN SLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTVSS
CD3H219	258	QVQLQQSGPRLVLRPSQTLTLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSR GLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNS VTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQGLVTVSS
C33H42	259	QLQLQESGPGLVNPSETLSHTCTVSGGSISSSSHYWGWIRQPPGK GLEWIGKIYYSGNTYYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKMSSVTAA DTAVYYCARLADV VVVPAARYFDSWGQGLVTVSS
C33H44	260	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSR GLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVRSRITINPDTSKNQFSLQLNSV TPEDTAVYHCARETMFRGLMDYWGQGLVTVSS
C33H45	261	QVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGK GLEWVAVISYDGSNKYCADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDFRSLDWLPPDSTS YDGMDVWGQGT TVTVSS
C33H46	262	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSL KAEDTAVYYCARDREVRDYWGQGLVTVSS
C33H48	263	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSTNYYWGWIRQPPGK GLEWIGTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYYCARLADV VVVPAARYFDYWGQGILVTVSS
C33H49	264	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSGFYWGWIRQPPRK GLEWIGTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYFCARLADV VVVPAARYFDNWGQGLVTVSS
C33H51	265	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTGRYYWGWIRQPPGK GVIWIGNIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLNSVTAA DTAVYYCARLGSLLVVVPAAMSFYWGQGLVTVSS

C33H52	266	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWVRQPPG KGLEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA DTALYYCARLGSLVVVPAAMSFDYWGQGTLVTVSS
C33H55	267	QVQLQESGPGLVKPSGTLTLTCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPGR GLEWIGEIYHSGNTNNSPSLKSRTISADKSKNQFSLKLSSVTAA DTAVYFCARIIAVARYFDSWGQGTLVTVSS
C33H65	268	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVVVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDFRDFDWLPPDSTSYHGMDVWGQGTTVTVSS
C33H66	269	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEGTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTVTVSS
C33H68	270	EVQLLES GGGLVQPGGSLGLS CAASGFTFSGYAMSWVRQAPGK GLNWVSAIDYSGNDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKESQLLHGLFEHWGQGILVTVSS
C33H69	271	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGK GLDWIGSINYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLRSVTAAD TAVYYCARLDGYESPFDYWGQGTLVTVSS
C33H70	272	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWIRQPPGK GLEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAA TAVYYCARLGSLVVVPAAMSFDYWGQGTLVTVSS
C33H72	273	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQHSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGTLVTVSS
C33H73	274	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASRFTFSSYAMTWVRQAPGKG LEWVSTINISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTKGGYSSGPFDYWGQGTLVSVSS
C33H74	275	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASRFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVHYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTVTVSS
C33H76	276	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARTYNSGYDGDYFDYWGQGTLVTVSS
C33H78	277	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK

		GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLR AEDTAVYYCAKDFRYFDWLPPDSSSYGMDVWGQGTTVTVSS
C33H80	278	QVQLVQSGSELRKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSSAYLQISSL KAEDTAMYYCATDRDRGTDYWGQGLVTVSS
C33H81	279	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSAYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEGTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTVTVSS
C33H84	280	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSTSYYGMDVWGQGTTVTVSS
C33H87	281	EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDNVKN SLYLQMNSL RTEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGLVTVSS
C33H88	282	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTLTRSAMNWVRQAPGQ GLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLLISL K TEDTAVYYCASDILPGYHEDYWGQGLVTVSS
C33H90	283	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSR GLEWLGRITYYRSKWyNDYALS VQSRITINPDTSKNQFSLQLNSV TPEDTAVYYCAREVAVAASFYWGQGLVTVSS
C33H91	284	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSHYWG WIRQPPGV GLEWIGSIYYTGSTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARLADIVVPAARYFDYWGQGLVTVSS
C33H92	285	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSSYWGWIRQPPGK GPEWIGSIYSSGNTYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLISMTAAD TAVFYCARLAATIVVPAARYFDCWGQGLVTVSS
C33H98	286	EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGLVTVSS
C33H99	287	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRPAPGK GLEWVANIKRDGGEKYYVDSVKGRFTISRDN AANSLYLQMNSL RVEDTAVYYCARPFYDHFYWGQGLVTVSS
C33H108	288	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFSTYAMNWVRQAPGQ GLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISSLK

		AEDTAVYYCARDRDRGTDYWGQGLTVTVSS
C33H249	289	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYAIHWVRQAPGK LEWVSGLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLK TEDTAFYYCTKDPYGDYFDYWGQGLTVTVSS
C33H250	290	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAGSGFTFDDYAIHWVRQAPGK LEWVSGLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLKT EDTAFYYCAKDSPYGDYFDYWGQGLTVTVSS
C33H251	291	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGRFKISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGLTVTVSS
C33H252	292	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK GLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGLTVTVSS
C33H253	293	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCTASGFTFRSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAINGYDGRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYSCAKDQGFGEFFDYWGQGLTVTVSS
C33H254	294	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPDK GLEWVAVIWFDFGNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDRELLFDYWGQGLTVTVSS
C33H255	295	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPGE GLEWVSGISWNGGDMVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSL RPEDTALYYCVKDMPYDFDLTGSDYYYYGMDVWGQGTTVTVS S
C33H256	296	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPGK GLEWVAVIWYVVGSHKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARDGSLCFDYWGQGLTVTVSS

Таблица 20. Вариабельные области легкой цепи

Ид. номер LC	Ид. номер	Аминокислотная последовательность
B23L3	297	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHWYQQKPG GQPPKLLIYAASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY YCQQIEDPWTFGQGTKVEIK
CD3L66	298	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQ APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY YCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

CD3L150	299	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAP KVLLYEVS KRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCV SYAGSGTLLFGGGTKLTVL
C33L8	300	SYELTQPPSVSVSPGQTASIICSGDKLGKNKYACWYQQKPGQSPV VIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAW DSSTYVFGTGTKVTVL
C33L10	301	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGSNIGSKSVHWYQQKPGQAPV MVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQ VWDSSSDVVFGGGTKLTVL
C33L11	302	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYACWYQQKPGQSPV VVIYKDSKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL
IAPL24	303	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L58	304	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDYKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTYVFGTGTKVTVL
C33L59	305	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDYKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYYCQA WDISTYVFGTGTKVTVL
C33L34	306	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQLRPGQSPIL VIYQDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSTWVFGGGTKLTVL
N46L109	307	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTWVFGGGTKLTVL
C33L42	308	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGIKSVHWYQQKPGQAPV LVVYDDSDRPPGIPERFSGSNSGNTATLTITRVEAGDEADYYCQV WDSSSDHVVFGGGTKLTVL
C33L47	309	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV VVIYQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L60	310	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV

		LVIYQDQDKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQA WDRNTVVFGGGTKLTVL
C33L17	311	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQ KAGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFILISSLQAEDVA VYYCQQYYGTPWTFGQGTKVEIK
C4LL152	312	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ ANSFPFTFGPGTKVDIK
C33L40	313	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPV VIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAW DSSTVVFGGGTKLTVL
C33L32	314	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVRWYQQKTGQSPV LVMYQDSKRPSGIRERFYGSNSGNTATPTISGTQAVDEAEYYCQ AWDSSTGVVFGGGTKLTVL
C33L38	315	SYELTQPPSVSVPPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WGRNTVVFGGGTKLTVL
C33L39	316	QSALTQPASVSGSPGQSIPISTGTSSDDGKNNIVSWYQQHPGKA PKLMIYKDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEADYHC CSYAGASNHVVFGGGTKLTVL
C33L57	317	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGNKYACWYQQKPGQSPV VVVYQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ AWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L73	318	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG DYNVSWYQQHPGK VPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSMGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVL
C33L53	319	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSNTVVFGGGTKLTVL
C33L66	320	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPV VVIHQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L35	321	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPV LVIYQDTKRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHCQA

		WDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L61	322	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGINSVGSYDLVSWYQQHPGKA PKLLIYDGSERPSGVFGRFSGSKSDNTTSLTISGLQAEDEAAYYCC SYEVTTTTYVVFVFGGGTKLTVL
C33L51	323	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWSQQKPGQAPV LVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDSNSDHVVFVFGGGTKLTVL
C33L44	324	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISETQAMDEADYYCQA WDSSTYVFGTGKVTVL
C33L30	325	SYELTQPPSVSVSPGQTVSISCSGDRLGDKYACWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSSYVFGTGKVTVL
C33L69	326	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFACWYQQKPGQSPVL VIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSTVVFGGGTKLTVL
C33L37	327	SYVLTQPPSVAVAPGQTARITCGGSNIGKISVHWYQQKAGQAPV LVVHDDRARPSGIPERLSGSNSGTTATLTISRVEVGDEADYYCQV WNSSSVHPVFVFGGGTKLTVL
C33L74	328	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDDNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADYY CSSYSSSTTLEVFVFGGGTKLTVL
C33L115	329	DIQMTQSPSSVWASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQQPGKAP NLLIYRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ DNSFPYTFGQGTKLEIK
C33L116	330	DIQMTQSPSSEWASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYGASSWQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ DNSFPYTFGQGTKLEIK
C33L117	331	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKNYLAWYQQ KPGQPPKLLISWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDV AVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK
C33L118	332	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQ KPGQPPKLLISWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDV AVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK

C33L119	333	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISWLAWYQQKPGKAPK LLIYKASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYCCQQY NSYPWTFGQGTKVEIK
C33L120	334	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDMYACWYQQKPGQSPL VVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQT WDTRIAVFGGGTNLTVL
C33L121	335	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGNEHVCWYHQKPGQSPV LVIYQNNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLSISGTQATDEADYYCQA WDSSTAVFGGGTKLTVL
C33L122	336	SYELTQPPSVSVSPGQTANISCSGVTLGYNAYWYQQKPGQSPIL VISQDTQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQAW DITTVLFGGGTKLTVL
C33L132	337	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPV LVIYQDGKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQA WDRNTVVFGGGTKLTVL
C33L41	338	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGKNKYASWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQA WDSSTVVFGGGTKLTVL

Таблица 21. Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи

Ид. номер HC	Ид. номер	CDR1	Ид. номер	CDR2	Ид. номер	CDR3	Ид. номер
B23H1	256	GFSLSTSGM	339	YWDDD	340	LYGFTYGFA	341
CD3H141	257	GFTFNTY	342	RSKYNNY A	343	HGNFGNSYVSWFA	344
CD3H219	258	GDSVFNNN A	345	YYRSKWL	346	GYSSSFD	347
C33H42	259	GGSISSSSH	348	YYSGN	349	LADV VVVPAARYFD	350
C33H44	260	GDSVSSNSA	351	YYRSKWY	352	ETMFRGLMD	353
C33H45	261	GFTFSSY	354	SYDGSN	355	DFRSLDWLPPDSTS MD	356
C33H46	262	GYTFTNY	357	NTNTGN	358	DREVRD	359
C33H48	263	GGSIIRSTNY	360	YYSGN	361	LADV VVVPAARYFD	362
C33H49	264	GGSISSGF	363	YYSGN	364	LADV VVVPAARYFD	365
C33H51	265	GGSISTGRY	366	YYSGN	367	LGSLVVVPAAMSFD	368

C33H52	266	GGIRGSSY	369	YSSGN	370	LGSLVVVPAAMSFD	371
C33H55	267	GGSISSSN	372	YHSGN	373	IIVARYFD	374
C33H65	268	GFTFSSY	375	SYDGSN	376	DFRDFDWLPPDSTSYHG MD	377
C33H66	269	GFTFSSY	378	SYDGSN	379	DFRSFDWLPPDSASYHG MD	380
C33H68	270	GFTFSGY	381	DYSGND	382	ESQLLHGLFE	383
C33H69	271	GGSISSSSY	384	NYSGS	385	LDGYESPFD	386
C33H70	272	GGIRGSSY	387	YSSGN	388	LGSLVVVPAAMSFD	389
C33H72	273	GFTFSSY	390	KQHGSE	391	DRDLGYFD	392
C33H73	274	RFTFSSY	393	NISGGS	394	GGYSSGPF	395
C33H74	275	RFTFSSY	396	SYDGSN	397	DFRSFDWLPPDSASYHG MD	398
C33H76	276	GFTFNY	399	SGSGGS	400	TYNSGYDGD	401
C33H78	277	GFTFSSY	402	SYDGSN	403	DFRYFDWLPPDSSSYG MD	404
C33H80	278	GYTFTNY	405	NTNTGN	406	DRDRGTD	407
C33H81	279	GFTFSAY	408	SYDGSN	409	DFRSFDWLPPDSASYHG MD	410
C33H84	280	GFTFSSY	411	SYDGSN	412	DFRSFDWLPPDSTSYGMD	413
C33H87	281	GFTFSSY	414	KQHGSE	415	DRDLGYFD	416
C33H88	282	GYTLTRS	417	NTNTGN	418	DILPGYHED	419
C33H90	283	GDSVSSNSA	420	YYSKQWY	421	EVAVAASFD	422
C33H91	284	GGSISSRSH	423	YYTGS	424	LADIVVPAARYFD	425
C33H92	285	GGIRSSSY	426	YSSGN	427	LAATIVVPAARYFD	428
C33H98	286	GFTFSSY	429	KQHGSE	430	DRDLGYFD	431
C33H99	287	GFTFSSY	432	KRDGGE	433	PFYDHF	434
C33H108	288	GYTFSTY	435	NTNTGN	436	DRDRGTD	437
C33H249	289	GFTFDDY	438	SWNGGN	439	DTPYGDYFD	440
C33H250	290	GFTFDDY	441	SWNGGN	442	DSYGDYFD	443
C33H251	291	GFTFDDY	444	GWSGGS	445	DSYGDFFD	446
C33H252	292	GFTFDDY	447	GWSGGS	448	DSYGDFFD	449
C33H253	293	GFTFRSY	450	NGYGDG	451	DQGFGEFFD	452

C33H254	294	GFTFSYY	453	WFDGNN	454	DRELLFD	455
C33H255	295	GFTFDDY	456	SWNGGD	457	DMPYFDFLTGSDYYYYYG MD	458
C33H256	296	GFTFSNY	459	WYVGSH	460	DGSLCFD	461

Таблица 22. Последовательности CDR1-3 легкой цепи

Ид. номер LC	Ид. номер	CDR1	Ид. номер	CDR2	Ид. номер	CDR3	Ид. номер
B23L3	297	SQSVDYNGISY	462	AAS	463	IIEDPW	464
CD3L66	298	STGAVTTSNY	465	GTN	466	WYSNLW	467
CD3L150	299	TSSNIGTYKF	468	EVS	469	YAGSGTL	470
C33L8	300	DKLGNKY	471	QDS	472	WDSSTY	473
C33L10	301	SNIGSKS	474	DDS	475	WDSSTDV	476
C33L11	302	HKLGDKY	477	KDS	478	WDSSTV	479
IAPL24	303	DKLGDKY	480	QDS	481	WDSSTV	482
C33L58	304	DKLGDKY	483	QDY	484	WDSSTY	485
C33L59	305	DKLGDKY	486	QDY	487	WDISTY	488
C33L34	306	DKLGDKY	489	QDS	490	WDSSTW	491
N46L109	307	DKLGDKY	492	QDS	493	WDSSTW	494
C33L42	308	NNIGIKS	495	DDS	496	WDSSTDHV	497
C33L47	309	DKLGDKY	498	QDR	499	WDSSTV	500
C33L60	310	DKLGDKY	501	QDG	502	WDRNTV	503
C33L17	311	SQSVLYSSNNKNY	504	WAS	505	YYGTPW	506
C4LL152	312	SQGISSW	507	AAS	508	ANSFPF	509
C33L40	313	NKLGAKF	510	QDN	511	WDSSTV	512
C33L32	314	DKLGDKY	513	QDS	514	WDSSTGV	515
C33L38	315	DKLGDKY	516	QDN	517	WGRNTV	518
C33L39	316	TSSDDGKNNI	519	KDS	520	YAGASNHV	521
C33L57	317	DELGNKY	522	QDR	523	WDSSTV	524
C33L73	318	TSSDVGDYNY	525	DVS	526	YSSSSALE	527
C33L53	319	DKLGDKY	528	QDN	529	WDSNTV	530
C33L66	320	DKLGDKY	531	QDR	532	WDSSTV	533
C33L35	321	DKLGNKY	534	QDT	535	WDSSTV	536
C33L61	322	INSDVGSYDL	537	DGS	538	YEVTTTYV	539
C33L51	323	NNIGSKS	540	DDS	541	WDSNSDHV	542
C33L44	324	DKLGDKYa	543	QDS	544	WDSSTY	545

C33L30	325	DRLGDKY	546	QDS	547	WDSSSY	548
C33L69	326	DKLGSKF	549	QDS	550	WDSSTV	551
C33L37	327	SNIGKIS	552	DDR	553	WNSSSVHP	554
C33L74	328	TSSDVGDDNY	555	DVS	556	YSSSTLE	557
C33L115	329	SQGISSW	558	RSS	559	DNSFPY	560
C33L116	330	SQGISSW	561	GAS	562	DNSFPY	563
C33L117	331	SQTVLYSSNNKNY	564	WAS	565	YYSTPY	566
C33L118	332	SQTVFYSSNNKNY	567	WAS	568	YYSTPY	569
C33L119	333	SQSISSW	570	KAS	571	YNSYPW	572
C33L120	334	DELGDMY	573	QDS	574	WDTRIA	575
C33L121	335	DNLGNEH	576	QNN	577	WDSSTA	578
C33L122	336	VTLGYNY	579	QDT	580	WDITTV	581
C33L132	337	DKLGDKY	582	QDG	583	WDRNTV	584
C33L41	338	DKLGNKY	585	QDS	586	WDSSTV	587

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает C2-домен CD33.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи 1 (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область легкой цепи 1 (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность SEQ ID NO:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно; или
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 292, 291, 261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284 или 285, или вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 332, 331, 302, 310, 320, 300, 304, 305, 306, 307, 317, 319, 324 или 325.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, содержащее:

a. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 292, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 332;

b. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 291, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 331;

c. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 261, и вариабельную область легкой цепи, имеющую

полипептидную последовательность SEQ ID NO: 302;

d. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 269, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 310;

e. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 280, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 322;

f. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 259, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 300;

g. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 263, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 304;

h. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 264, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 305;

i. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 265, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 306;

j. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 266, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307;

k. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 272, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 307;

l. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 277, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 317;

m. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 279, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 319;

n. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 284, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 324; или

o. вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность SEQ ID NO: 325.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) *in vitro* с

EC₅₀ менее около 2 нМ.

6. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит остов IgG1 с низким содержанием фукозы.

7. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD33 с константой диссоциации (KD) менее около 5×10^{-9} М.

8. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD33 и индуцирует интернализацию с EC₅₀ менее около 2 нМ.

9. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

10. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

11. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с терапевтическим агентом.

12. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10.

13. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 12.

14. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 13.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 15.

17. Способ по п. 16, в котором злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз.

18. Способ по п. 17, в котором гемобластоз выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы или множественной миеломы.

19. Способ по п. 17, в котором гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритических клеток (ОБПДК).

20. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-10, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, в

условиях для получения биспецифического антитела или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

21. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

22. Биспецифическое антитело к CD33/CD3, содержащее антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- a. SEQ ID NO: 447, 448, 449, 567, 568 и 569, соответственно;
- b. SEQ ID NO: 444, 445, 446, 564, 565 и 566, соответственно;
- c. SEQ ID NO: 354, 355, 356, 477, 478 и 479, соответственно;
- d. SEQ ID NO: 378, 379, 380, 501, 502 и 503, соответственно;
- e. SEQ ID NO: 411, 412, 413, 531, 532 и 533, соответственно;
- f. SEQ ID NO: 348, 349, 350, 471, 472 и 473, соответственно;
- g. SEQ ID NO: 360, 361, 362, 483, 484 и 485, соответственно;
- h. SEQ ID NO: 363, 364, 365, 486, 487 и 488, соответственно;
- i. SEQ ID NO: 366, 367, 368, 489, 490 и 491, соответственно;
- j. SEQ ID NO: 369, 370, 371, 492, 493 и 494, соответственно;
- k. SEQ ID NO: 387, 388, 389, 492, 493 и 494, соответственно;
- l. SEQ ID NO: 402, 403, 404, 522, 523 и 524, соответственно;
- m. SEQ ID NO: 408, 409, 410, 528, 529 и 530, соответственно;
- n. SEQ ID NO: 423, 424, 425, 543, 544 и 545, соответственно; или
- o. SEQ ID NO: 426, 427, 428, 546, 547 и 548, соответственно;

и антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3 и определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидную последовательность:

- 1) SEQ ID NO: 342, 343, 344, 465, 466 и 467, соответственно; или
- 2) SEQ ID NO: 345, 346, 347, 468, 469 и 470, соответственно.

23. Биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, в котором антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична SEQ ID NO: 292, 291, 261, 269, 280, 259, 263, 264, 265, 266, 272, 277, 279, 284 или 285, или вариабельную

фрагмент по любому одному из пп. 22-24, в котором антитело к CD33 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает C2-домен CD33.

26. Биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-25, в котором биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент индуцирует Т-клеточно-зависимую цитотоксичность в отношении CD33-экспрессирующих клеток *in vitro* со значением EC₅₀ менее около 1 нМ.

27. Биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-26, в котором биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

28. Биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-27, в котором биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

29. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-28.

30. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п. 29.

31. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 30.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело к CD33/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-28 и фармацевтически приемлемый носитель.

33. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, который в этом нуждается, включающий введение субъекту фармацевтической композиции по п. 32.

34. Способ по п. 33, в котором злокачественное новообразование представляет собой гемобластоз.

35. Способ по п. 34, в котором гемобластоз выбран из группы, состоящей из лейкоза, лимфомы или множественной миеломы.

36. Способ по п. 35, в котором гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмоцитоидных дендритических клеток (ОБПДК).

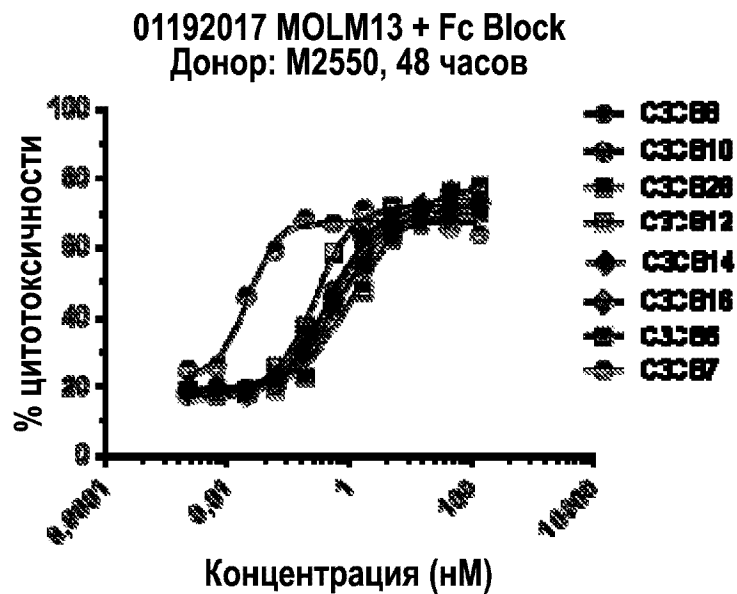
37. Способ получения биспецифического антитела к CD33/CD3 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 22-28, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую биспецифическое антитело к CD33/CD3 или антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для получения биспецифического антитела к CD33/CD3 или антигенсвязывающего фрагмента, и выделение биспецифического антитела CD33/CD3 или антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

38. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело к CD33/CD3 или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 22-28, включающий объединение биспецифического антитела к CD33/CD3 или его

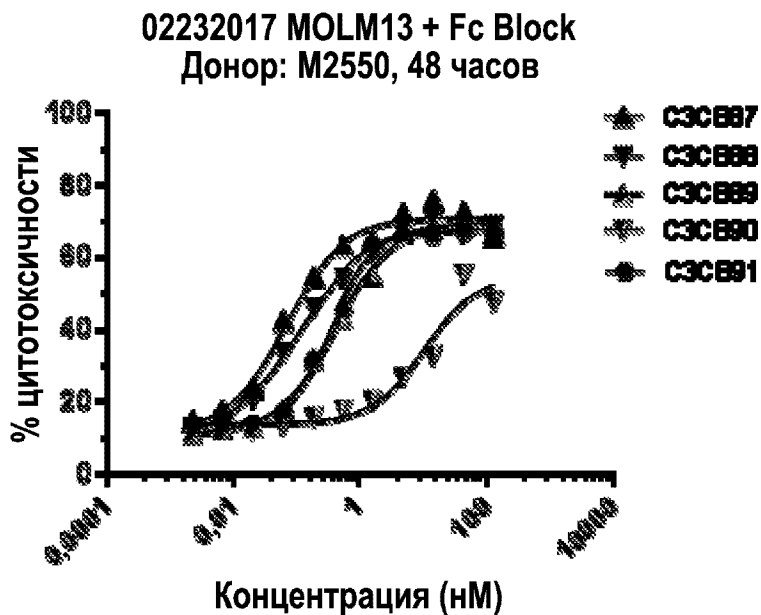
антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

По доверенности

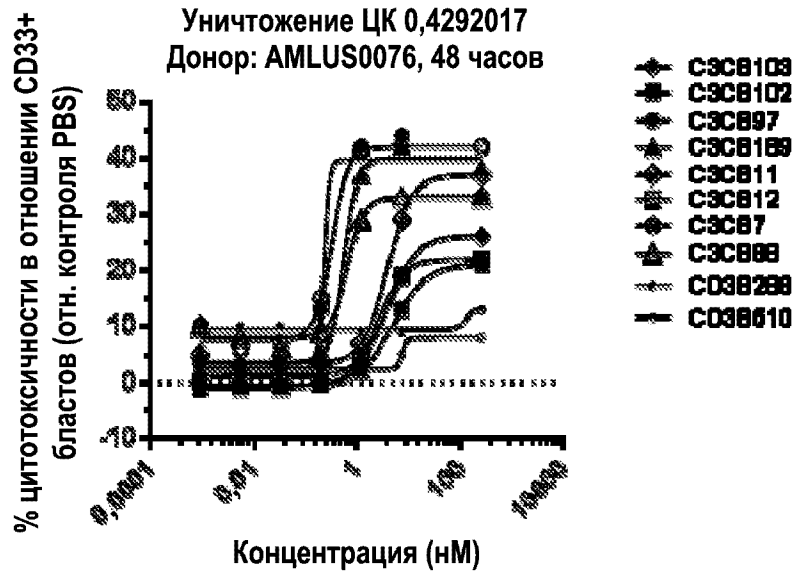
1/23



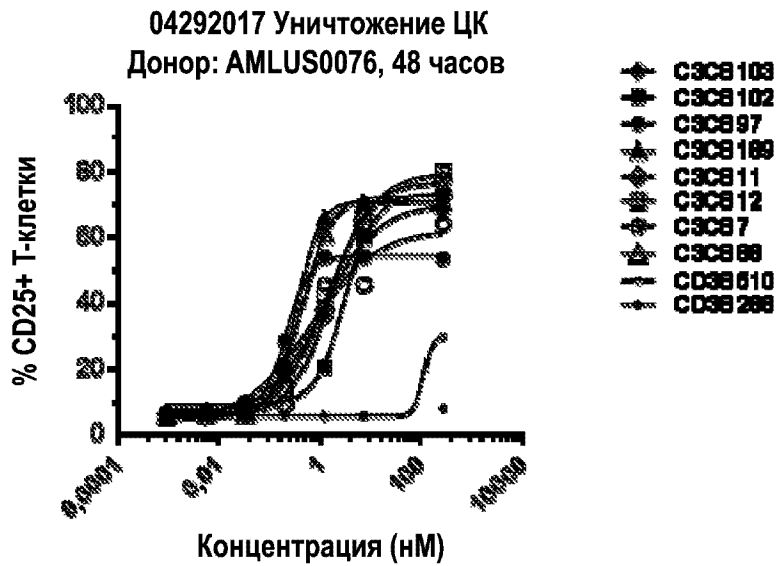
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В

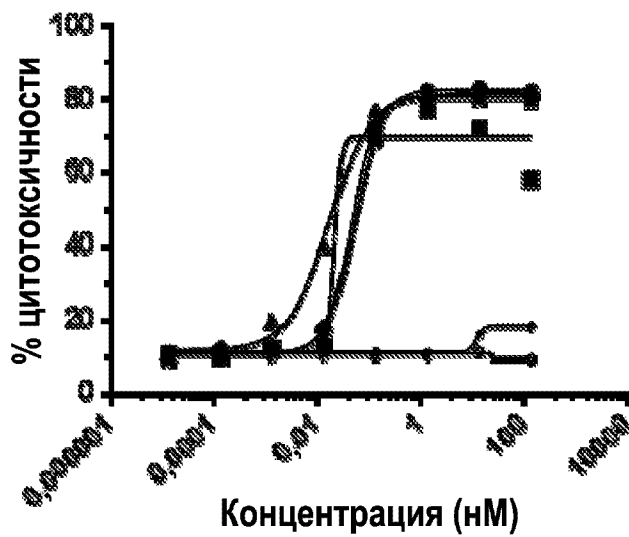


ФИГ. 2А



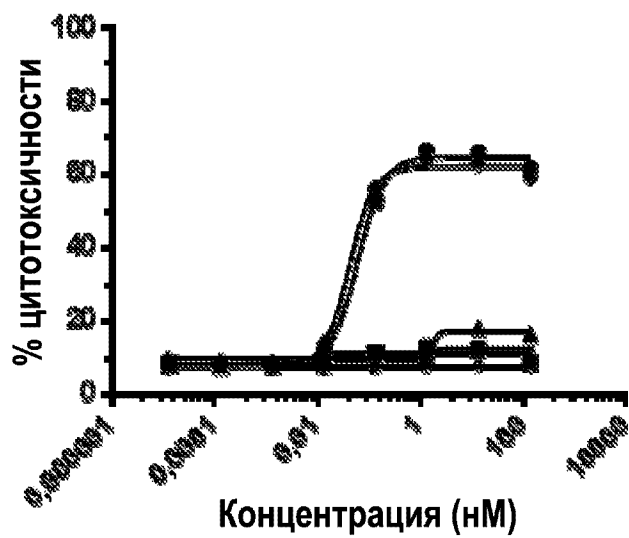
ФИГ. 2В

ИП-22
№81

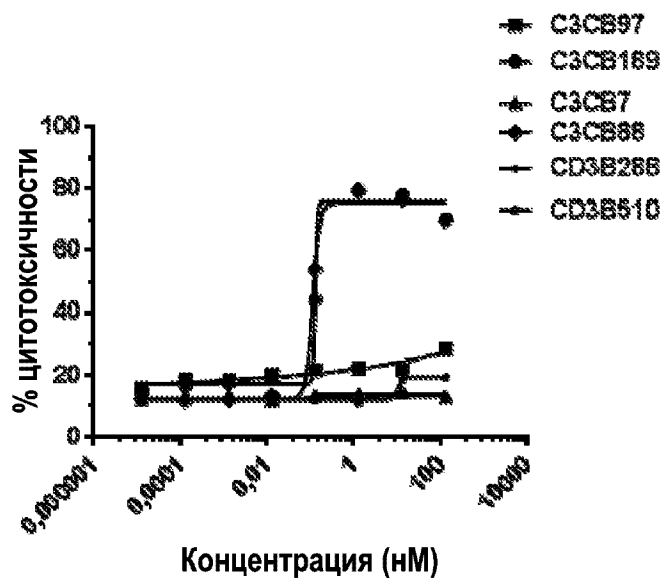


ФИГ. 3А

ИП-21
№82

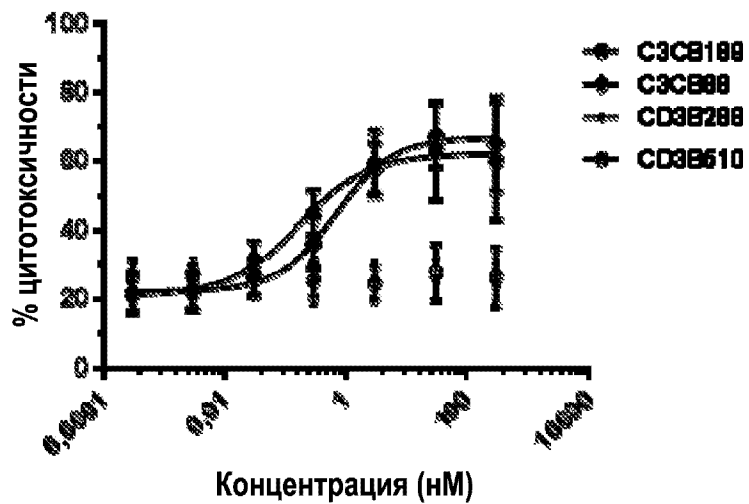


ФИГ. 3В

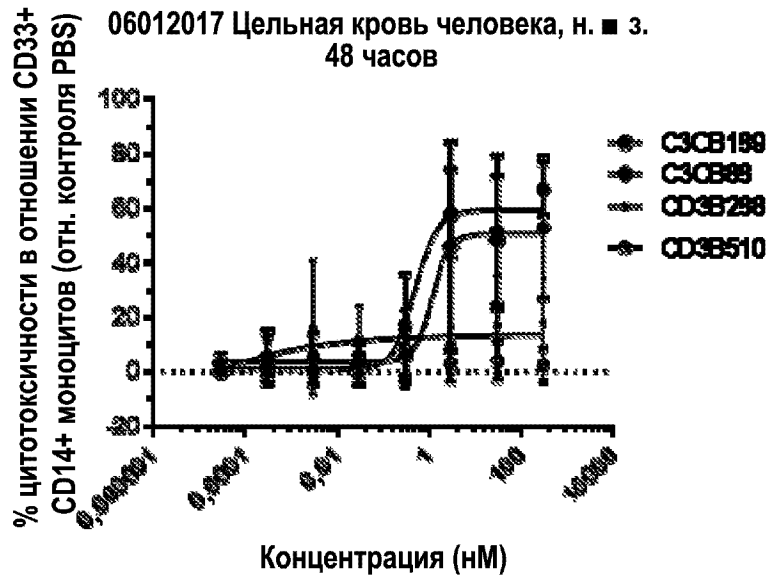


ФИГ. 3С

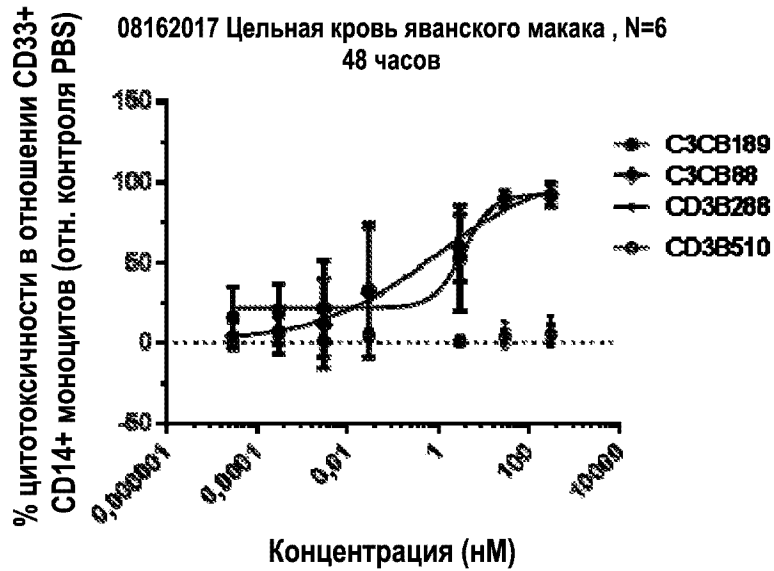
08012017 MOLM13 в нормальной человеческой крови
48 часов, и Е:Т 1:5



ФИГ. 4А

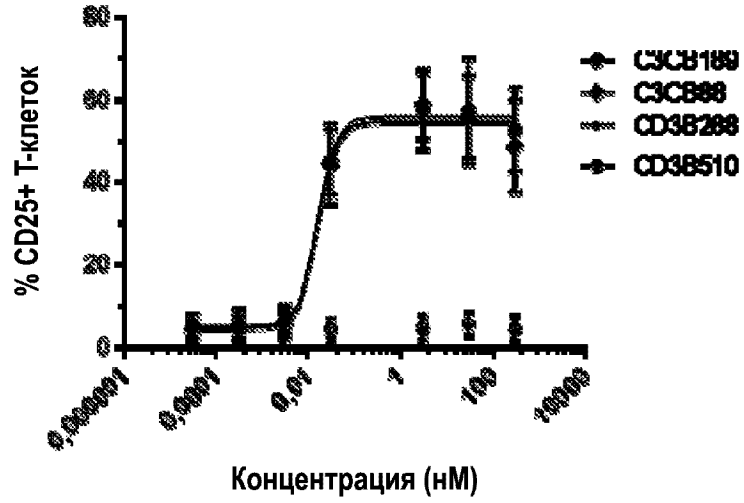


ФИГ. 4В

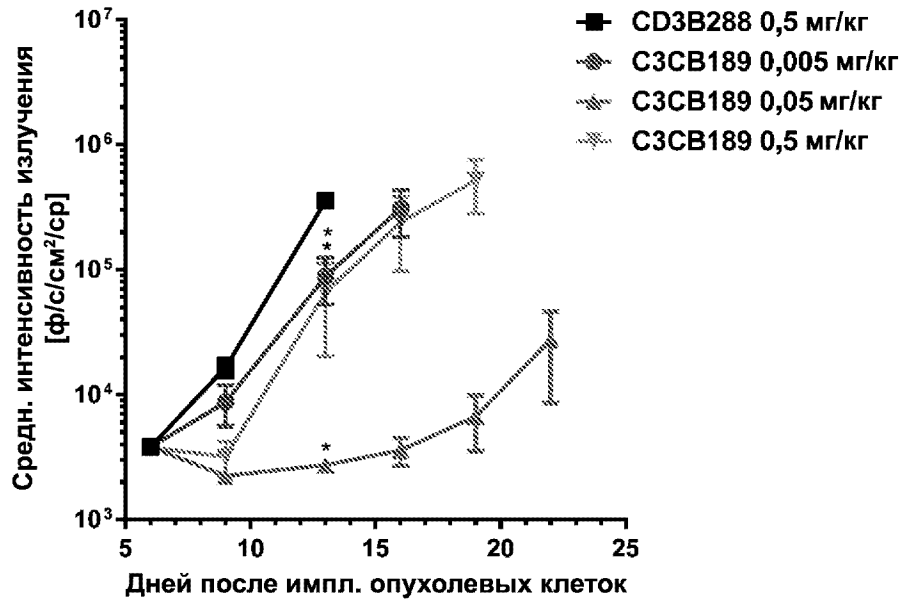


ФИГ. 5А

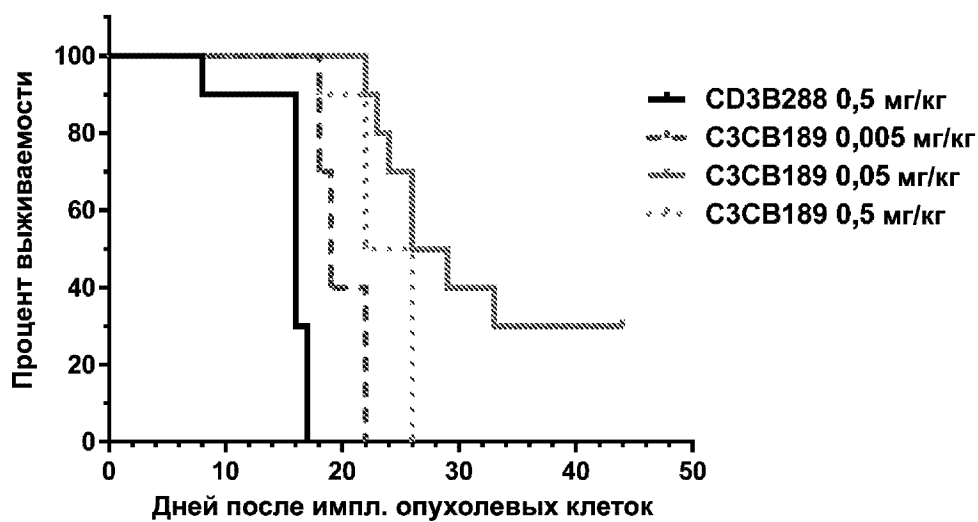
08162017 Цельная кровь яванского макака, н. ■ 3.
48 часов



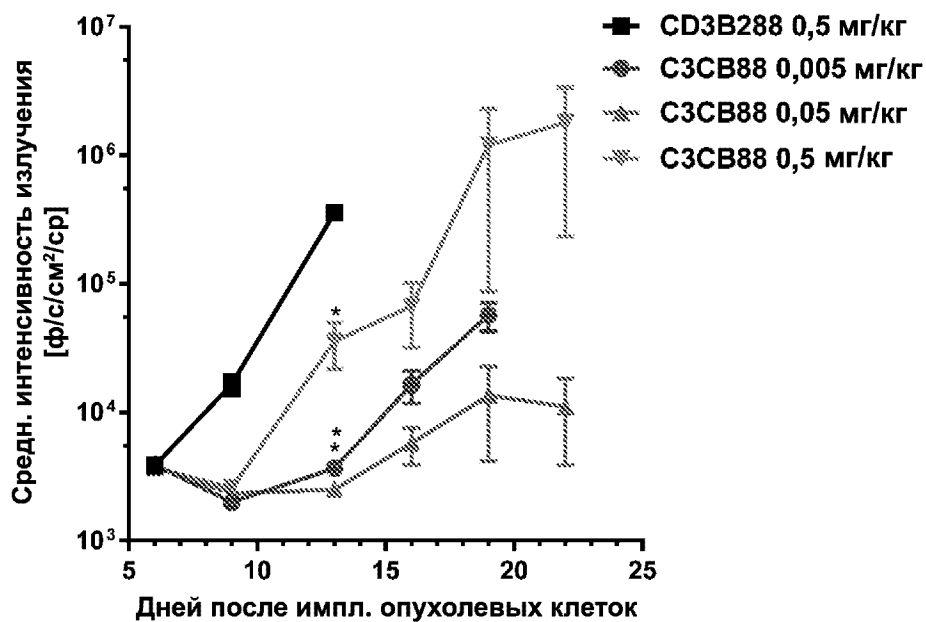
ФИГ. 5В



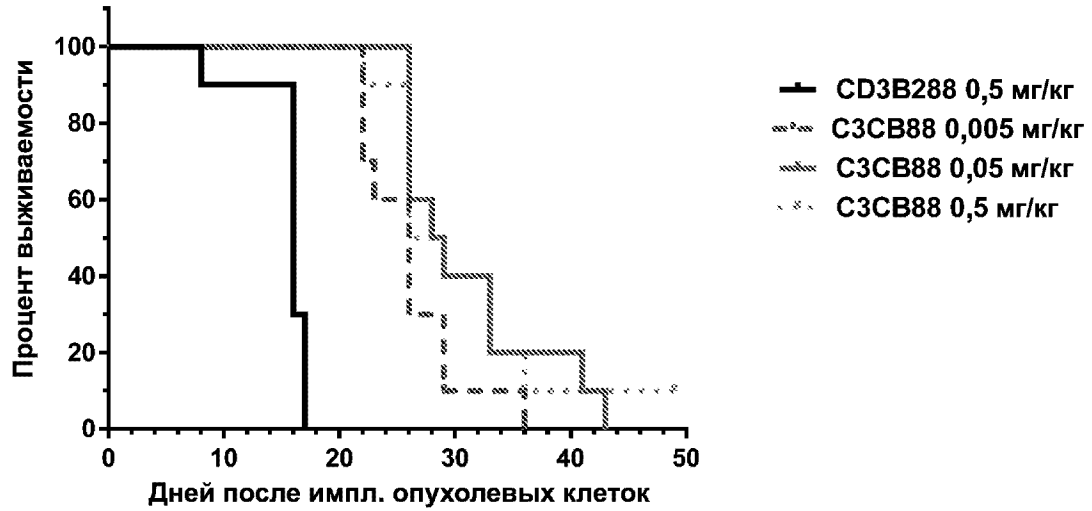
ФИГ. 6



ФИГ. 7



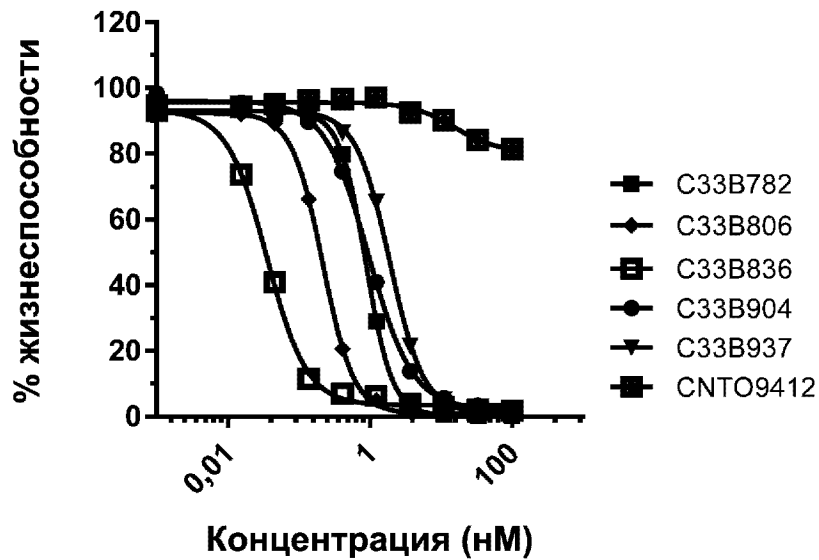
ФИГ. 8



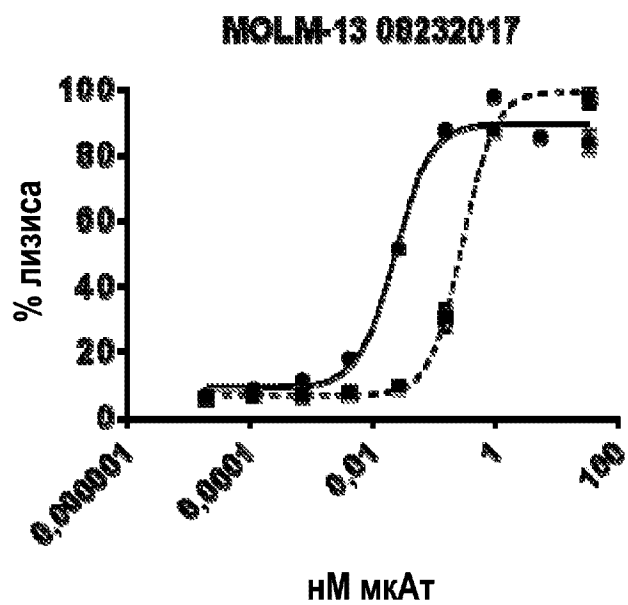
ФИГ. 9

Анализ белка А-ММАF

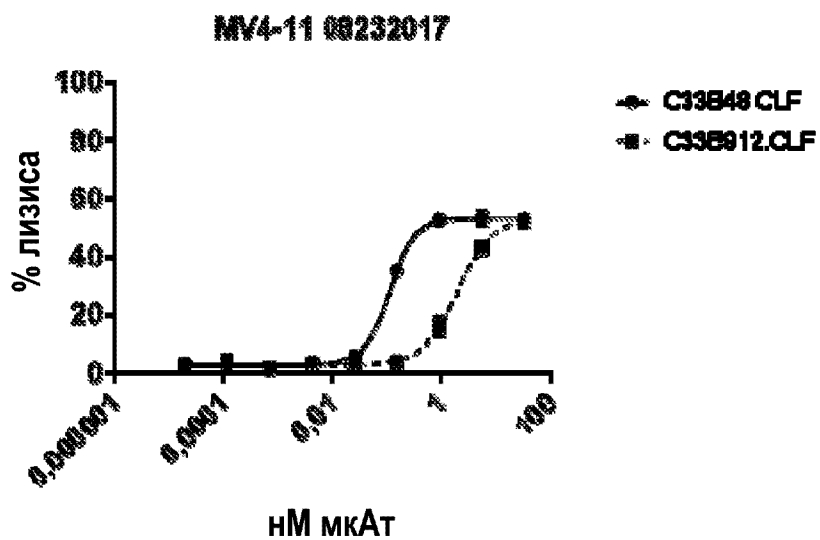
Клетки Molm13 (через 72 часов после обработки)



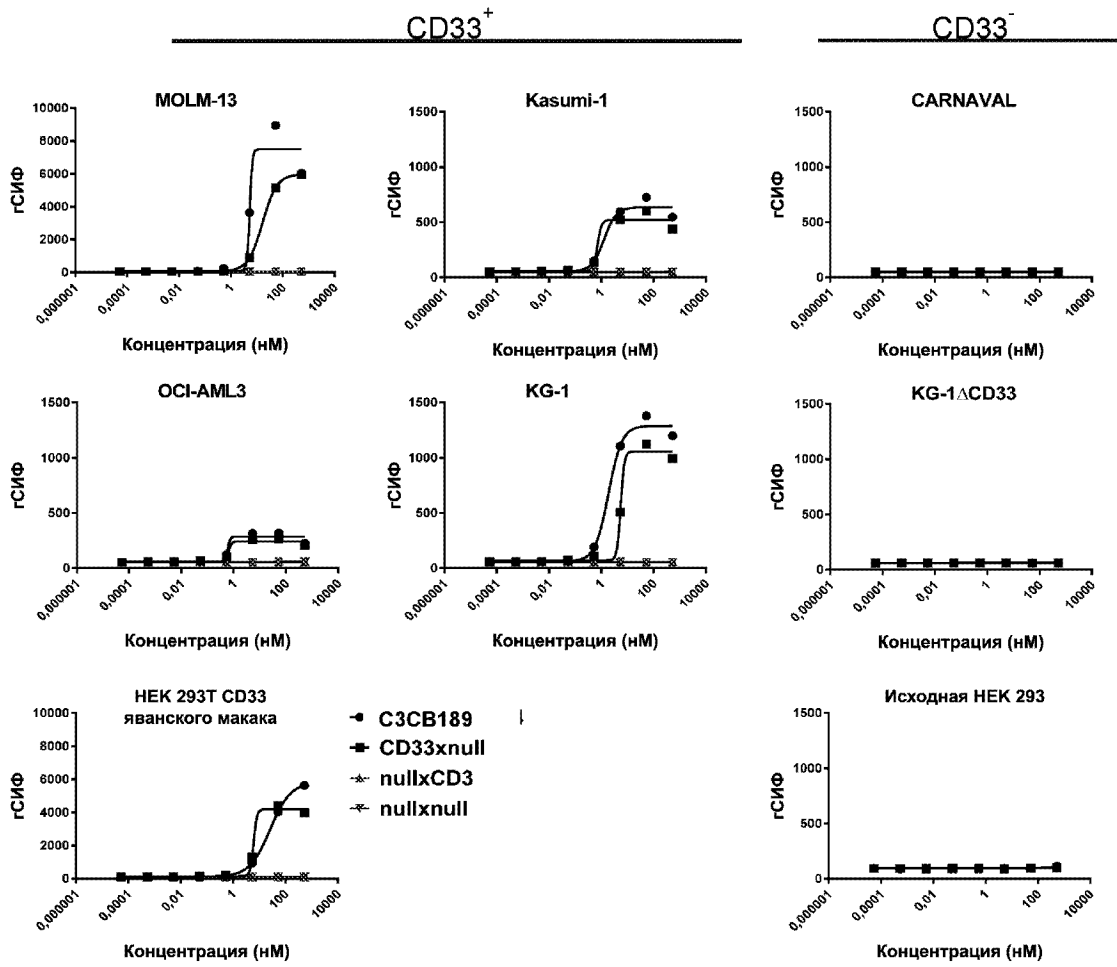
ФИГ. 10



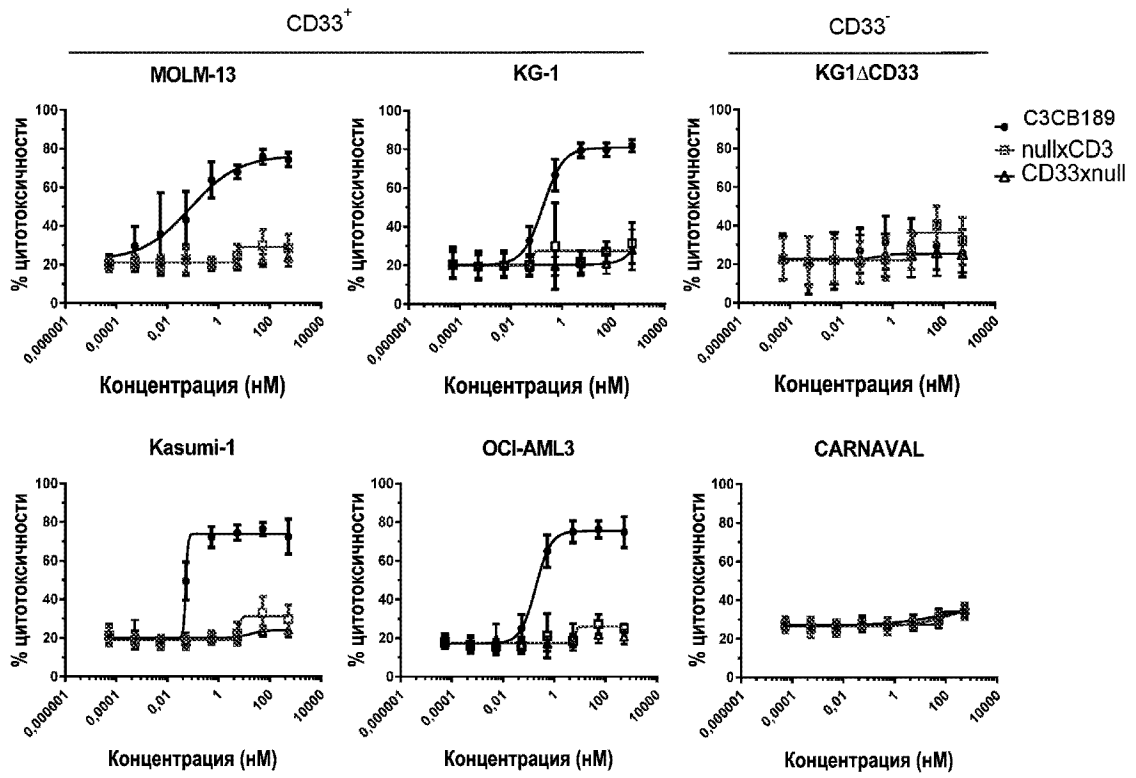
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

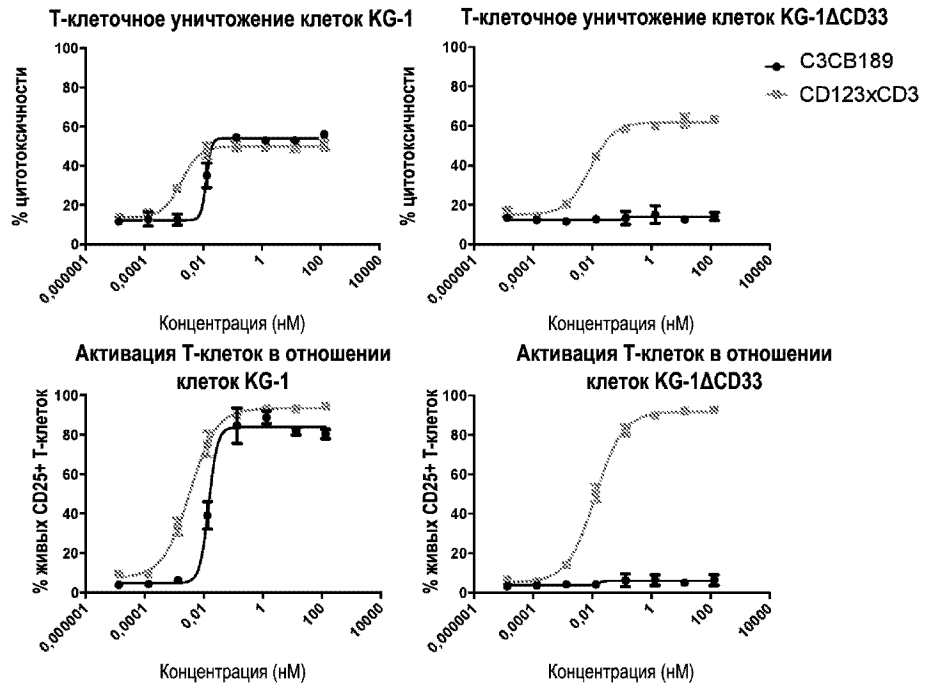


ФИГ. 12

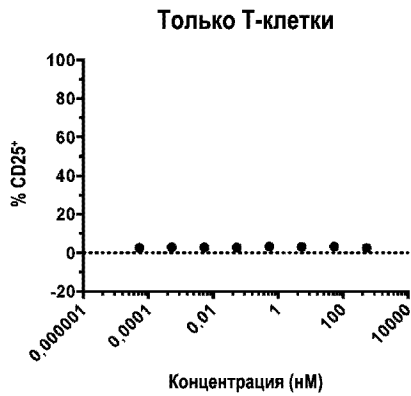


ФИГ. 13

ФИГ. 14А



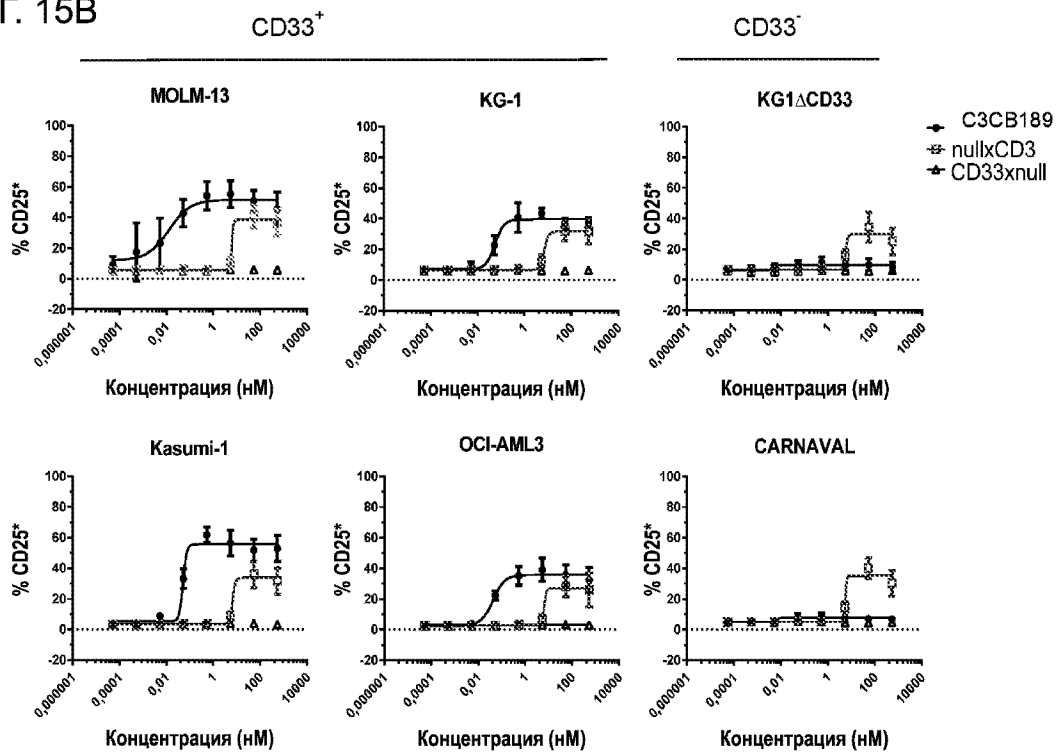
ФИГ. 14В



ФИГ. 15А

Эффективная концентрация (нМ)	MOLM-13	KG-1	Kasumi-1	OCI-AML3
EC₂₅	0,0283	0,0525	0,0366	0,0844
EC₅₀	0,1307	0,1677	0,0500	0,1826
EC₉₅	2,2865	1,9978	0,0842	0,6220

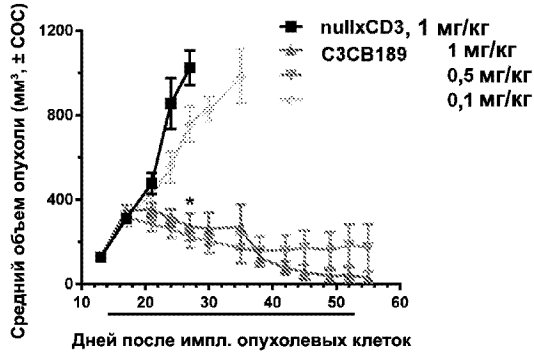
ФИГ. 15В



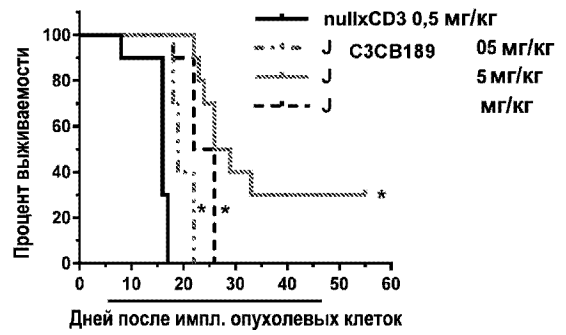
ФИГ. 15С

Эффективная концентрация (нМ)	MOLM-13	KG-1	Kasumi-1	OCI-AML3
EC₂₅	0,0077	0,0356	0,0267	0,0178
EC₅₀	0,0263	0,0664	0,0432	0,0500
EC₉₅	0,1677	0,4236	0,1126	0,2585

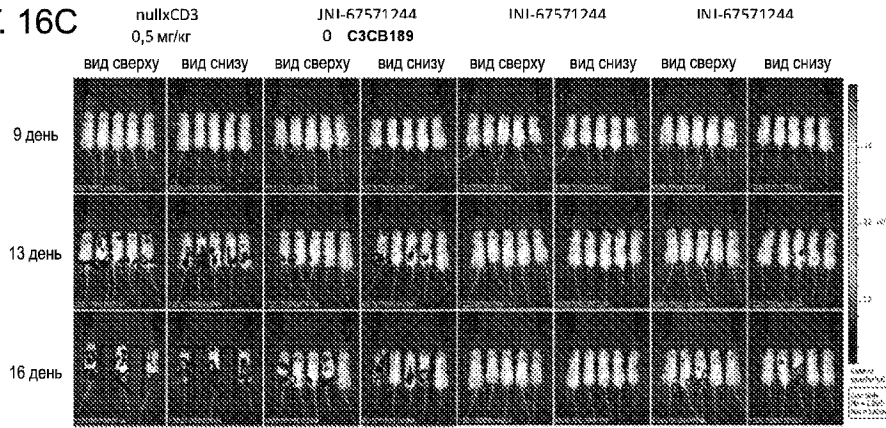
ФИГ. 16А



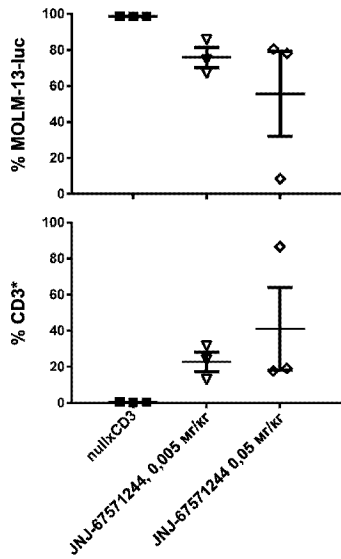
ФИГ. 16В MOLM-13



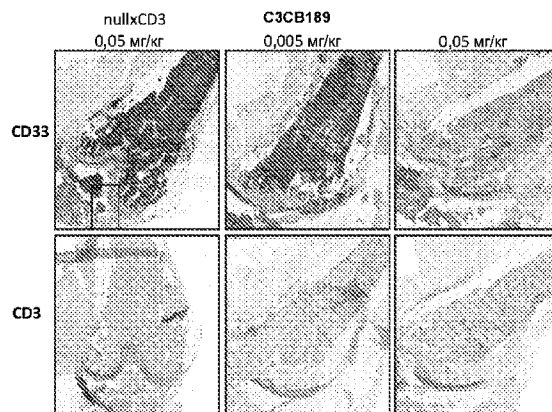
ФИГ. 16С

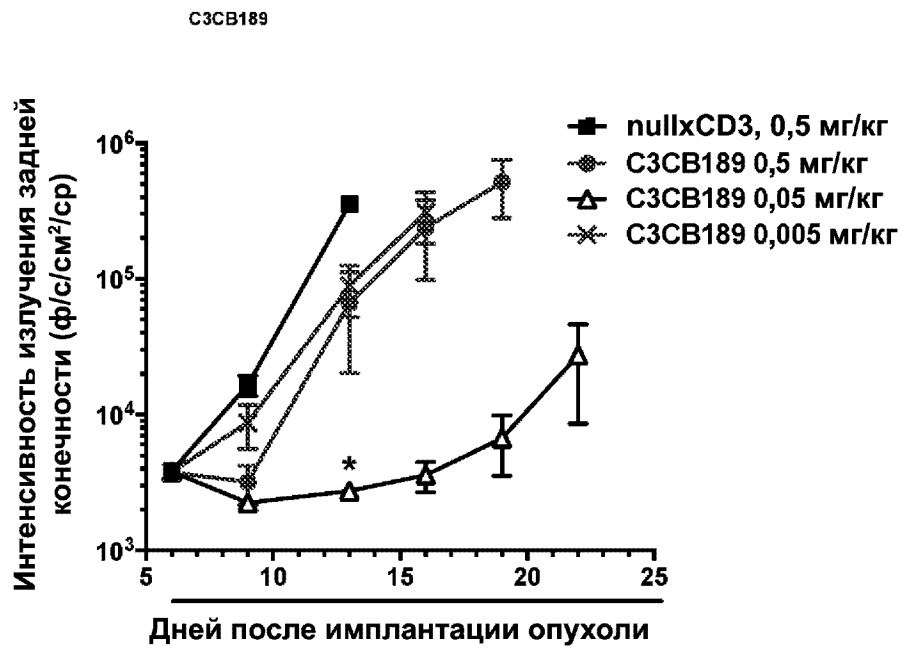


ФИГ. 16D



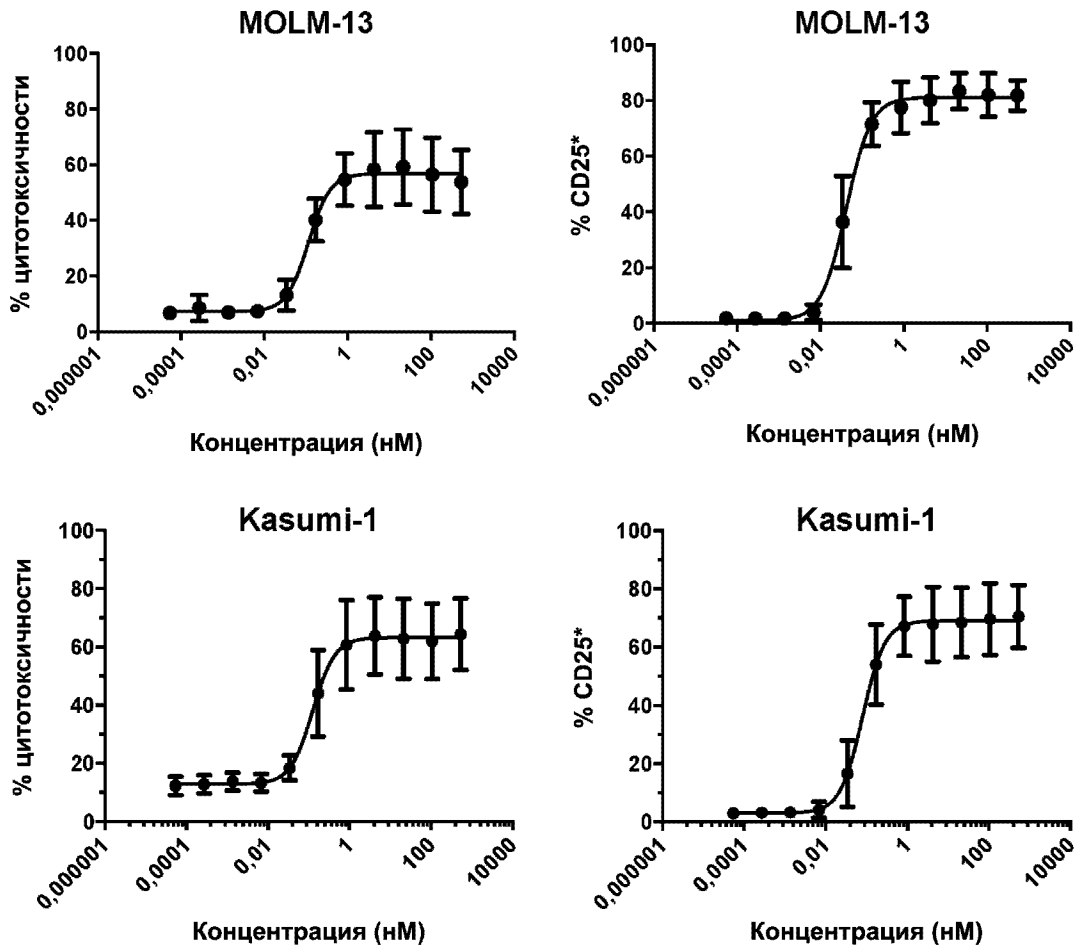
ФИГ. 16Е





ФИГ. 17

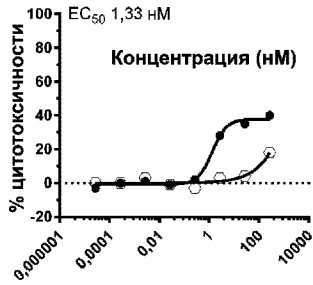
ФИГ. 18А



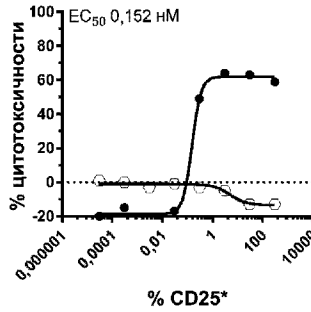
ФИГ. 18В

Эффективная концентрация (нМ)	Медианная цитотоксичность: MOLM-13	Медианная активация Т-клеток: MOLM-13	Медианная цитотоксичность: Kasumi-1	Медианная активация Т-клеток: Kasumi-1
EC ₂₀	0,017	0,054	0,039	0,060
EC ₅₀	0,037	0,111	0,085	0,124
EC ₉₀	0,132	0,420	0,281	0,496

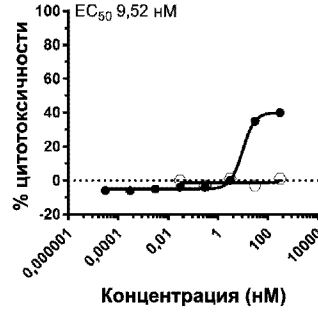
ФИГ. 19А Донор: 6095



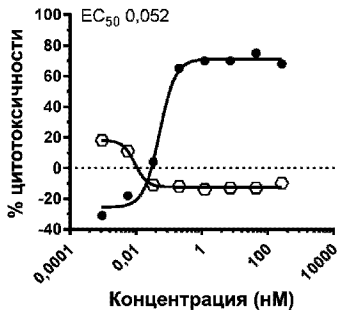
Донор: 6116



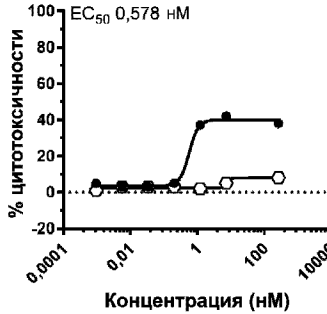
Донор: 6129



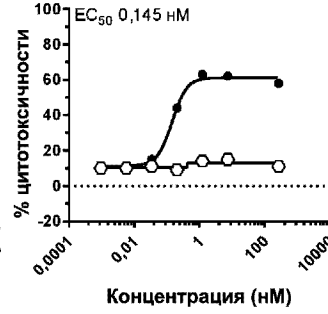
Донор: AMLUS0075



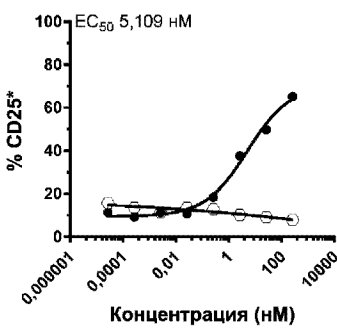
Донор: AMLUS0076



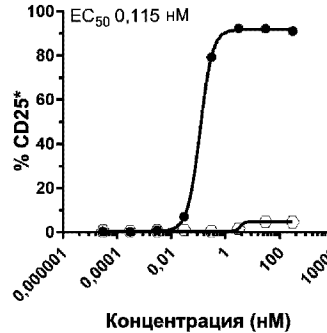
Донор: AMLUS0103



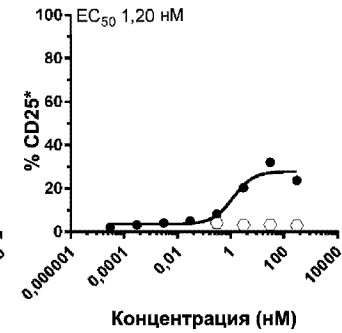
ФИГ. 19В Донор: 6095



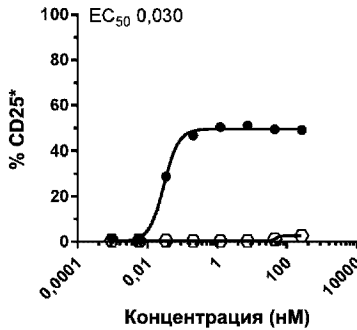
Донор: 6116



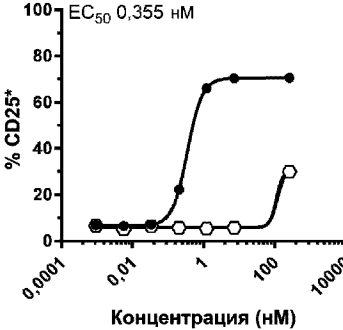
Донор: 6129



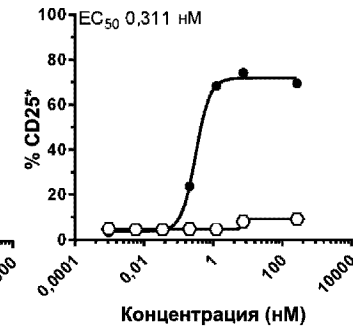
Донор AMLUS0075



Донор AMLUS0076

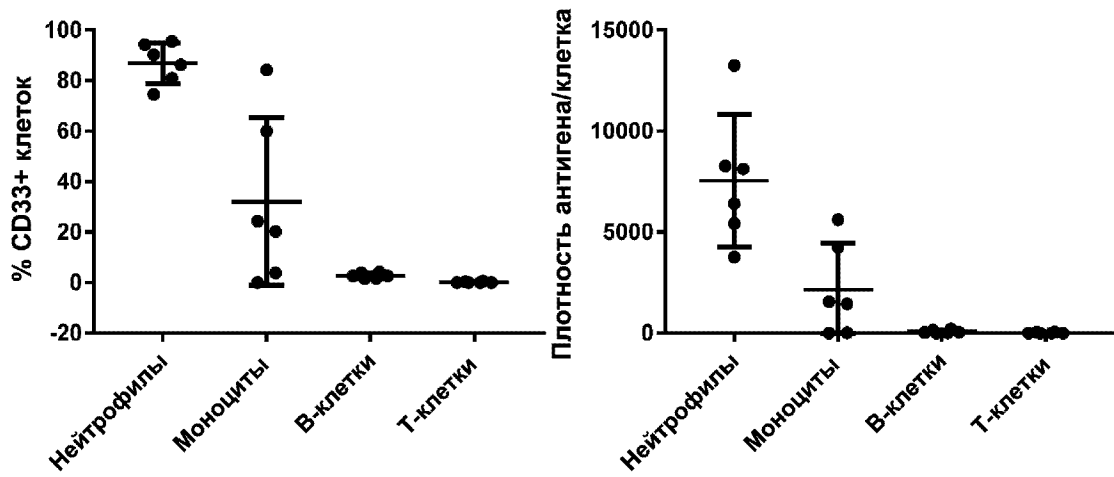


Донор AMLUS0103

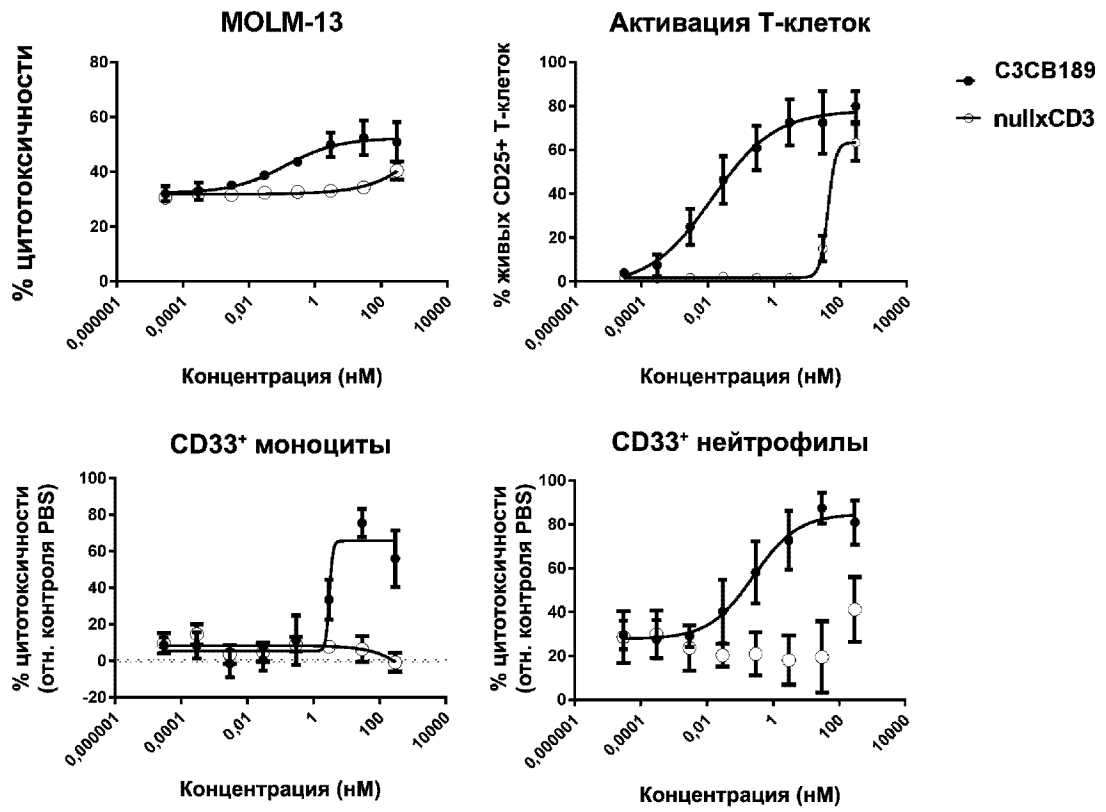


● JNJ-67571244
 ○ nullxCD3

C3CB189

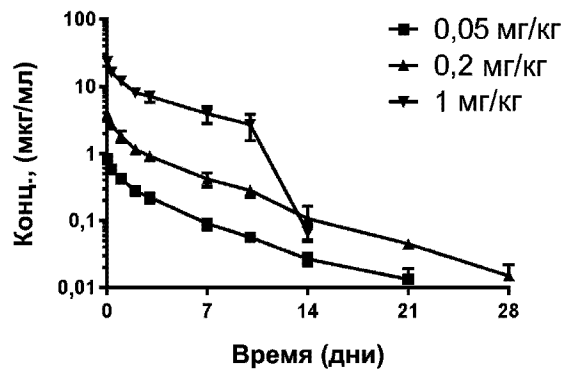


ФИГ. 20

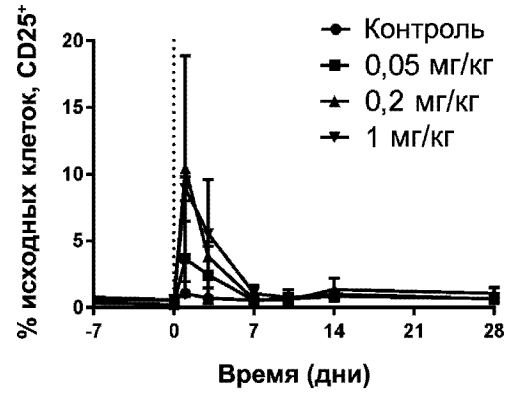


ФИГ. 21

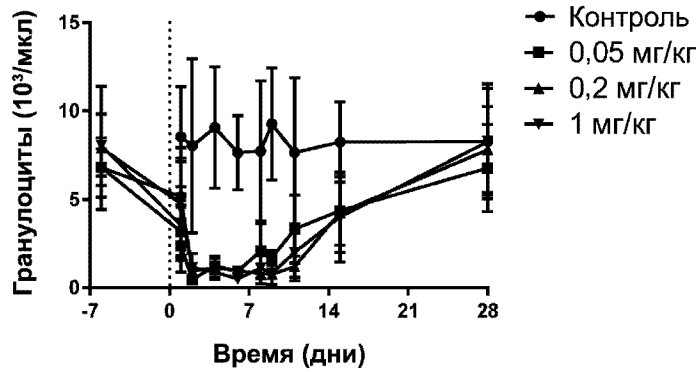
ФИГ. 22А



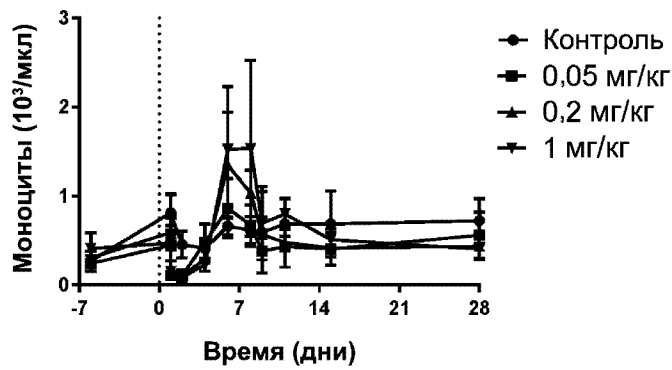
ФИГ. 22В

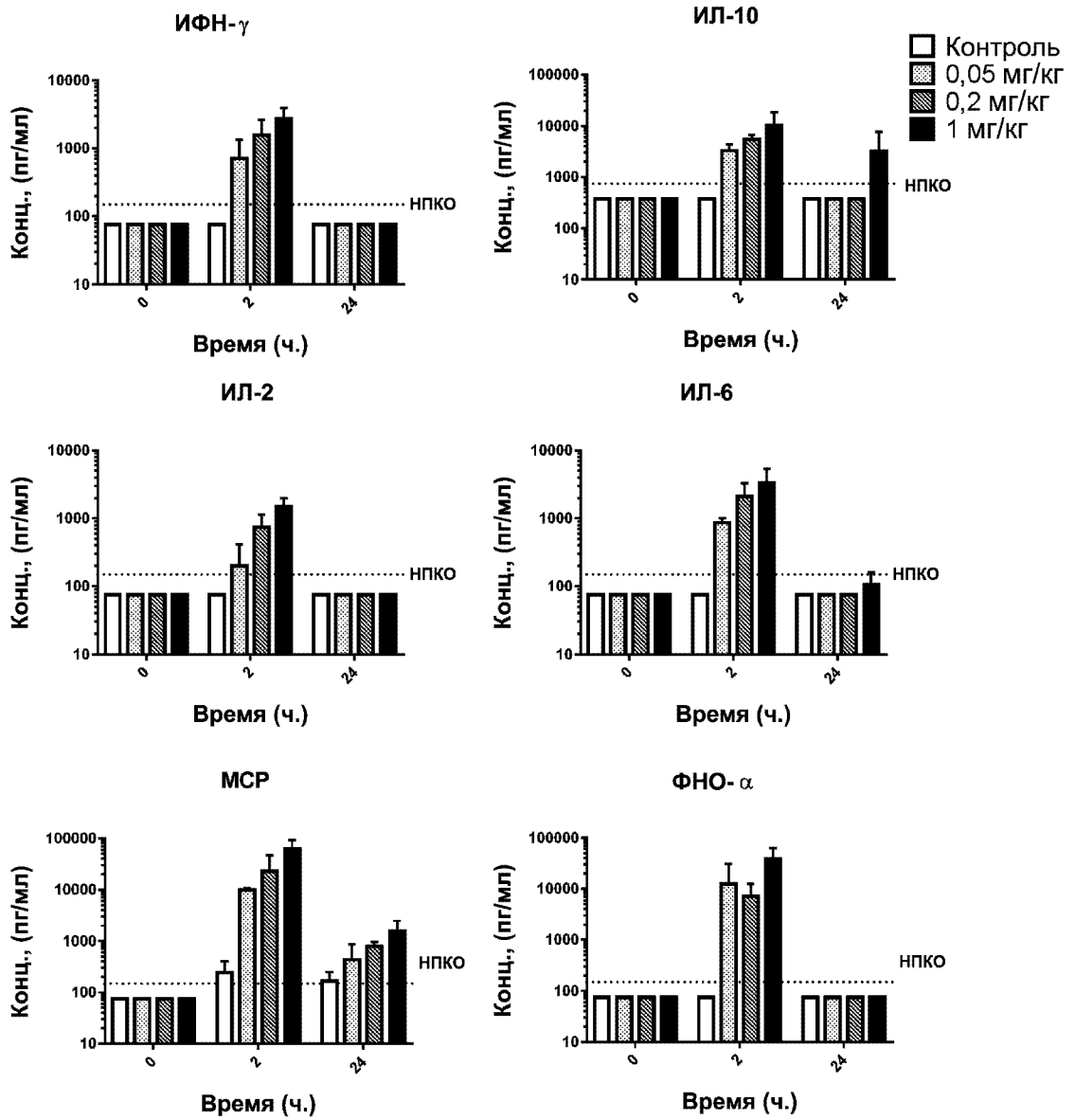


ФИГ. 22С



ФИГ. 22D



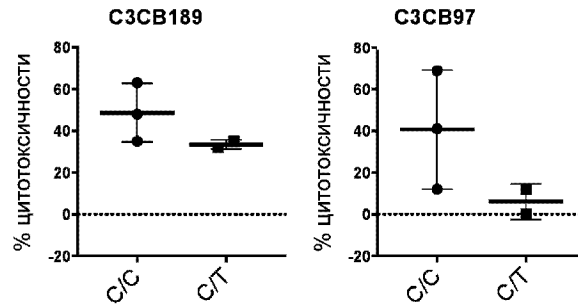


ФИГ. 23

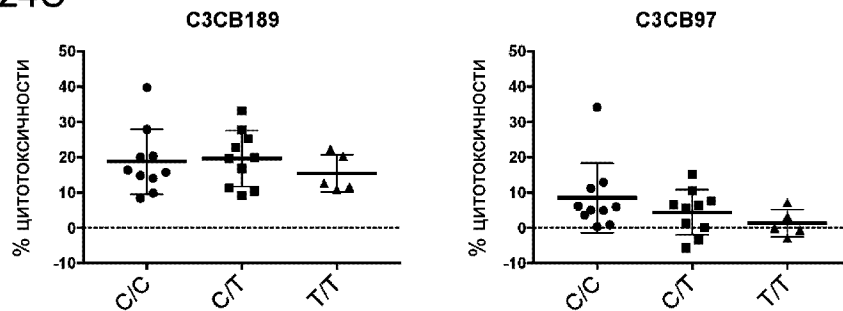
ФИГ. 24А



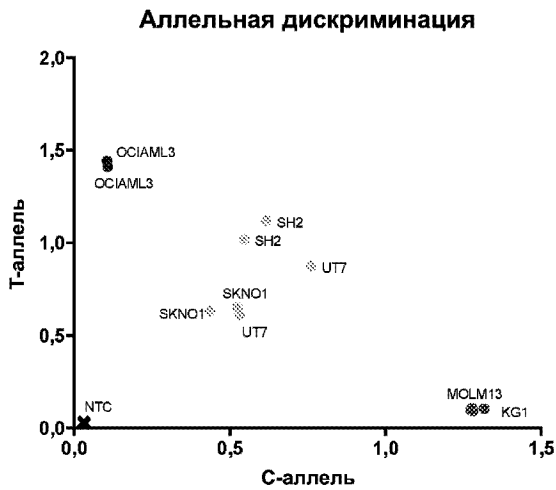
ФИГ. 24В



ФИГ. 24С



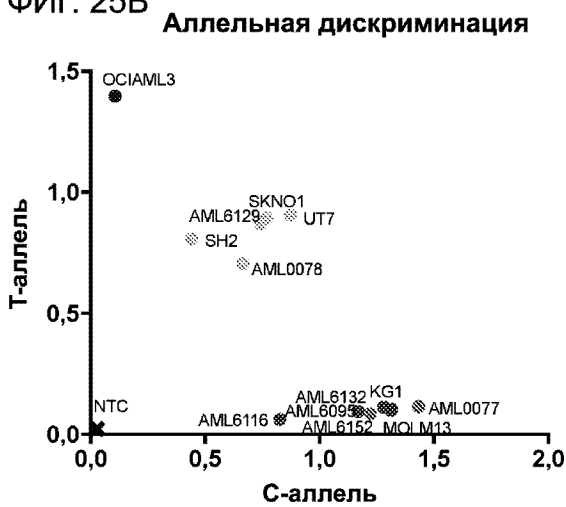
ФИГ. 25А



ФИГ. 25С

Идентификатор пробы	Rs12459419 (TaqMan)	Rs12459419 (Сэнгер)
D1	C/C	C/C
D2	C/T	C/T
D3	T/T	T/T
D4	C/C	C/C
D5	C/C	C/C
D6	C/C	C/C
D7	C/T	C/T
D8	T/T	T/T
D9	C/C	C/C
D11	C/T	C/T
D12	C/T	C/T
D13	C/T	C/T
D14	C/T	C/T
D17	C/T	C/T
D18	C/C	C/C
D20	T/T	T/T
D21	C/T	C/T
D22	T/T	T/T
D23	C/C	C/C
D24	C/T	C/T
D25	C/C	C/C
D26	C/C	C/C
D28	T/T	T/T
D29	C/T	C/T
D30	C/C	C/C
Всего:	C/C; 10	C/C; 10
	C/T; 10	C/T; 10
	T/T; 5	T/T; 5

ФИГ. 25В



УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ

- ⊗ Гомозиготный: аллель 1 / аллель 1
- ⊗ Гомозиготный: аллель 1 / аллель 2
- ⊗ Гетерозиготный: аллель 1 / аллель 2
- × X: не определен