

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092847 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.20

(22) Дата подачи заявки
2019.05.21

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/676,081

(32) 2018.05.24

(33) US

(86) PCT/IB2019/054188

(87) WO 2019/224717 2019.11.28

(88) 2020.03.05

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

(72) Изобретатель:

Годе Франсуа, Джайлс-Комар Джилл,
Хайдрих Бредли, Хуан Чичи, Кейн
Коллин (US), Макдейд Ронан (GB),
Немет-Сизэй Дженнифер (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают PSMA. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и PSMA. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают IL1RAP. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD33. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и IL1RAP. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и CD33. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают TMEFF2. Настоящее изобретение относится к антителам, которые специфически связывают CD3 и TMEFF2. Настоящее изобретение относится к фрагментам антител, полинуклеотидам, кодирующим антитела или их фрагментам, и способом их получения и применения.

VH		1	50
BLW-2B4-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
BLW-3B4-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-1F8-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-3G8-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-3F4-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
BLW-2E6-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
BLX-2E9-гамма	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
IGHV6-1*01_Homo	(1)	QVQLQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVFNNAAWSWIRQSPSRGLEWL	
CDR1			
VH		51	100
BLW-2B4-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
BLW-3B4-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
BLX-1F8-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
BLX-3G8-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
BLX-3F4-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
BLW-2E6-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
BLX-2E9-гамма	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
IGHV6-1*01_Homo	(51)	GRTYRSKWLVDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFLQLNSVTPEDTALYCV	
CDR2			
VH		101	120
BLW-2B4-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
BLW-3B4-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
BLX-1F8-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
BLX-3G8-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
BLX-3F4-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
BLW-2E6-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
BLX-2E9-гамма	(101)	RGYSSFDYWGQGLLVTVSS	
IGHV6-1*01_Homo	(101)	R-----	
CDR3			

A1

202092847

202092847

A1

VL

```

1
50
BLW-2B4-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
BLW-3B4-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
BLX-1F8-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
BLW-2E6-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
BLX-2E9-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
BLX-3F4-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
BLX-3G8-am03aa (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
IGLV2-23*02_Homo (1) QSALTPASVSGSPGQSIITISCTGTSRDIGTYKRVSWYQQHPDKAPKVVLL
                                CDR1

51
100
BLW-2B4-am03aa (51) YEVNKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
BLW-3B4-am03aa (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-1F8-am03aa (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
BLW-2E6-am03aa (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-2E9-am03aa (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-3F4-am03aa (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
BLX-3G8-am03aa (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
IGLV2-23*02_Homo (51) YEVSKRPSGVSSRPSGSKSGNTASLTISGLQAEQADYHCCSYAGSGTLL
                                CDR2                                CDR3

101
BLW-2B4-am03aa (101) FGGGTKLTVL
BLW-3B4-am03aa (101) FGGGTKLTVL
BLX-1F8-am03aa (101) FGGGTKLTVL
BLW-2E6-am03aa (101) FGGGTKLTVL
BLX-2E9-am03aa (101) FGGGTKLTVL
BLX-3F4-am03aa (101) FGGGTKLTVL
BLX-3G8-am03aa (101) FGGGTKLTVL
IGLV2-23*02_Homo (100) -----

```

202092847 A1

202092847 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565839RU/018

АНТИТЕЛА К CD3 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 3 мая 2019 г., называется JBI5135WOPCT1_Sequence_listing.txt и имеет размер 588 килобайт.

Область техники

Изобретение, предложенное в настоящем документе, относится к антителам к кластеру дифференцировки 3 (CD3) и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим CD3, и в частности к антителам к CD3 и антигенсвязывающим фрагментам, которые перекрестно реагируют с CD3 отличного от человека млекопитающего (например, яванского макака); антителам к простатспецифическому мембранному антигену (PSMA) и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим PSMA; антителам к IL1RAP и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим IL1RAP; антителам к CD33 и их антигенсвязывающим фрагментам, способным специфически связываться с человеческим и нечеловеческим CD33; и биспецифическим антителам, способным специфически связывать CD3; PSMA; IL1RAP; CD33; CD3 и PSMA; CD3 и IL1RAP; или CD3 и CD33. Данное изобретение также относится к применению таких антител и антигенсвязывающих фрагментов при лечении злокачественного новообразования, аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний и других патологических состояний.

Предпосылки

Биспецифические антитела и фрагменты антител исследовали как средство для рекрутинга цитолитических Т-клеток для уничтожения опухолевых клеток. Однако клиническое применение многих биспецифических антител, рекрутирующих Т-клетки, ограничено проблемами, включая неблагоприятную фармакокинетику, потенциальную иммуногенность и проблемы при производстве. Таким образом, существует значительная потребность в биспецифических антителах, рекрутирующих цитолитические Т-клетки, для уничтожения опухолевых клеток, демонстрирующих сниженную токсичность и благоприятные производственные профили.

Белковый комплекс Т-клеточный антигенный рецептор/CD3 человека состоит из шести различных цепей: CD3 γ -цепи (SwissProt P09693), CD3 δ -цепи (SwissProt P04234), двух CD3 ϵ -цепей (SwissProt P07766) и одного гомодимера CD3 ζ -цепи (SwissProt P20963) (ϵ γ : ϵ δ : $\zeta\zeta$), который связан с α - и β -цепями Т-клеточного рецептора. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует

трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. CD3 необходим для иммунного ответа.

Сводная информация

В настоящем документе предложены выделенные рекомбинантные антитела к CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие: тяжелую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR), содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR), содержащую SEQ ID NO: 671, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690; переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 652, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 661; тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 640, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 676; или содержащие: тяжелую цепь, содержащую HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 773, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690; переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 657, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 678; или тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 675, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 678.

Также предложены выделенные рекомбинантные антитела к CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CD3d, или CD3e, или CD3e и CD3d *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью связывания около 300 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления выделенные рекомбинантные антитела к CD3 или их антигенсвязывающие фрагменты имеют одно, два, три или четыре из следующих свойств:

связывают CD3+ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывают клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

связывают рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691) или связывают рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692) с равновесной константой диссоциации (KD) 12 нМ или менее, причем KD измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °C;

связывают остатки 1-6 Cd3e при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

активируют Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и

сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; или HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, содержат HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690, соответственно; VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно или HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

Дополнительно в настоящем документе описаны биспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, причем первый домен содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670, соответственно; и второй домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 697, 683, 698, 699, 792 и 686, соответственно;

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и второй домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 681 и 682, соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно; и второй домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 679 и 680, соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670, соответственно; и второй домен, который содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 704, 705, 706, 707, 708 и 709, соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и второй домен, который содержит VH и VL с SEQ ID NO: 702 и 703, соответственно.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, могут содержать первый домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно; и второй домен, который содержит HC и LC с SEQ ID NO: 700 и 701, соответственно.

В изобретении дополнительно предложены выделенные биспецифические антитела к CD3×PSMA, содержащие первый домен, который связывается с клетками,

экспрессирующими рекомбинантный белок CD3d, или CD3e *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью 300 нМ или менее, причем связывание с клетками измеряют методом проточной цитометрии, и второй домен, который специфически связывается с PSMA.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело к CD3×PSMA содержит первый домен, который:

связывает CD3+ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°С с использованием проточной цитометрии;

связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691), или связывает рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692), или связывает рекомбинантный CD3e от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации (KD) 12 нМ или менее, в котором KD измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °С;

демонстрирует отсутствие окисления метионина или триптофана, или отсутствие деамидирования аспарагина, или демонстрирует отсутствие изомеризации аспарагина по результатам анализа методом пептидного картирования;

связывает остатки 1-6 CD3e при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

активирует Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

Также описаны фармацевтические композиции, содержащие описанные в настоящем документе антитела и фармацевтически приемлемый носитель.

В изобретении дополнительно предложены способы получения антител, описанных в настоящем документе, включающие культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином. Способы получения биспецифического антитела к CD3×PSMA могут включать объединение моноспецифического двухвалентного антитела к CD3, имеющего две идентичные HC1 и две идентичные LC1, и моноспецифического двухвалентного антитела к PSMA, имеющего две идентичные HC2 и две идентичные LC2, в смеси с молярным соотношением приблизительно 1:1; введение в смесь восстанавливающего агента; инкубирование смеси в течение от приблизительно девяноста минут до приблизительно шести часов; удаление восстанавливающего агента; и очистку биспецифического антитела к CD3×PSMA, которое содержит HC1, LC1, HC2 и LC2.

Дополнительно описаны способы лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающие введение терапевтически эффективного количества описанных выделенных антител субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

В изобретении также предложены наборы, содержащие антитела, описанные в настоящем документе. Наборы могут дополнительно содержать реагенты для обнаружения антител и инструкции по применению.

Краткое описание графических материалов

Изложение сущности изобретения, а также последующее подробное описание будут более понятными при рассмотрении вместе с прилагаемыми рисунками. С целью иллюстрации описанных антител и способов в графических материалах представлены примеры осуществления антител и способов; однако антитела и способы не ограничиваются конкретными раскрытыми вариантами осуществления. В графических материалах показано следующее:

На **Фиг. 1А и 1В** показаны антитела к CD3, продуцируемые OmniRat. Последовательности VH (Фиг. 1А) и VL (Фиг. 1В) активных мкАт к CD3, продуцируемых у OmniRat, были выровнены с последовательностями человеческой зародышевой линии из IMGT. CDR подчеркнуты. Дивергенция последовательностей показана жирным шрифтом. На Фиг. 1А описаны SEQ ID NO: 651, 653, 656, 655, 20, 654 и 717, а на Фиг. 1В описаны SEQ ID NO: 658, 688, 660, 659, и 718, соответственно, все из которых представлены в порядке появления.

На **Фиг. 2** показан клеточный анализ связывания для оценки связывающей способности отдельных супернатантов гибридом крыс с человеческими очищенными CD3+ Т-лимфоцитами.

На **Фиг. 3** показан клеточный анализ связывания для оценки связывающей способности отдельных супернатантов гибридом крыс с очищенными CD3+ Т-лимфоцитами яванского макака.

На **Фиг. 4** показаны результаты конкурентного анализа для супернатантов гибридом, оцениваемые на их способность конкурировать с коммерческим антителом к CD3 человека SP34-2, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака.

На **Фиг. 5** показаны репрезентативные кривые связывания антител к CD3 на первичных Т-клетках человека.

На **Фиг. 6** показаны репрезентативные кривые конкурентного связывания антител к CD3 с конъюгированным AlexaFluor 488 SP34-2 на первичных Т-клетках человека.

На **Фиг. 7** показано связывание мкАт BLW-2Е6 со сконструированной легкой цепью (LC) с первичными Т-клетками человека.

На **Фиг. 8** показано связывание BLW-2Е6 со сконструированной тяжелой цепью (HC) с первичными Т-клетками человека.

На **Фиг. 9** показано насыщение CD3 человека красителем AlexaFluor™ (AF) 488

посредством анализа методом FACS. Полученные средние значения интенсивности флуоресценции строили на графике в виде зависимости от концентрации молекулы антитела. Для каждого донора получали значения K_d и получали среднее значение. Константа насыщения связывания (K_dT) для человеческих Т-клеток составила $5,6 \pm 1,0$ нМ ($n=4$) и была использована в настоящем документе для определения аффинности связывания K_d . Один донор-человек был исключен, поскольку во время анализа он не соответствовал критериям жизнеспособности, составляющим по меньшей мере 60%. Идентификаторы LS на фигурах условных обозначений относятся к отдельным донорам человеческих Т-клеток.

На **Фиг. 10** показаны кривые ингибирования для двухвалентных антител к CD3, CD3B376 и CD3B450, для конкуренции за связывание с антителом AlexaFluor488 SP-34 к CD3. Значения IC_{50} составили 29 и 60 нМ, соответственно.

На **Фиг. 11** показаны сенсограммы связывания вариантов BLW-2E6 с hCD3 ϵ (1-27)-Tn25.

На **Фиг. 12A - 12E** показана термостабильность антител к CD3 CD3B376 (**Фиг. 12A**), CD3B450 (**Фиг. 12B**), CD3B389 (**Фиг. 12 C**), CD3B467 посредством DSC (**Фиг. 12 D**) и наложение термограмм для всех кандидатов (**Фиг. 12E**).

На **Фиг. 13A - 13C** показаны сравнения термостабильности антител к CD3 с наложением термограмм для CD3B376 и CD3B389 (**Фиг. 13A**); наложением термограмм для CD3B450 и CD3B467 (**Фиг. 13B**); и наложением термограмм для CD3B376, CD3B450 и CD3B219 (**Фиг. 13C**).

На **Фиг. 14** показано связывание с клетками LNCAP подмножества биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью.

На **Фиг. 15** показано связывание с клетками LNCAP подмножества биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью.

На **Фиг. 16** показаны результаты по PSMA-отрицательному связыванию с клетками PC3 биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью.

На **Фиг. 17** показаны результаты биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью в функциональном анализе уничтожения клеток.

На **Фиг. 19** показаны взаимодействия антитело-антиген в комплексе CD3B334:CD3. Остатки CD3 находятся в эллипсах, остатки CD3B334 находятся в прямоугольниках.

На **Фиг. 20** показан анализ на основе первичных Т-клеток человека и яванского макака, используемый для определения способности отобранных соединений из гибридом активировать Т-клетки, измеренной по активации CD69.

На **Фиг. 21** показана противоопухолевая эффективность PS3B79 в ксенотрансплантатах человеческих клеток предстательной железы LnCAP AR.TB у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP AR.TB измеряли два раза в неделю, и результаты представляли как средний объем опухоли, выраженный в $\text{мм}^3 \pm \text{СОС}$ (*, $p < 0,0001$).

На **Фиг. 22** показана противоопухолевая эффективность PS3B90 в модели ксенотрансплантатах человеческих клеток предстательной железы LnCAP AR.TB у гуманизированных T-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли LnCAP AR.TB измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в $\text{мм}^3 \pm \text{СОС}$ (*, $p < 0,001$).

На **Фиг. 23А-23D** показаны кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA с клетками LNCaP человека. На **Фиг. 23 А** показаны кривые титрования для отобранных соединений G9-PSM M18, M25, M50, M52, M56, M57 и M59; На **Фиг. 23 В** показаны M52 и M110; На **Фиг. 23С** показаны M85, M87, и M81; а на **Фиг. 23D** показаны M52 и M84. На **Фиг. 23D** экспрессируемые млекопитающим супернатанты нормализовали по экспрессии Fab посредством Octet, и титровали либо к клеткам LNCaP человека, PSMG5 (НЕК с PSMA яванского макака), либо к клеткам PSMG9 (НЕК с PSMA шимпанзе) с помощью проточной цитометрии. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (геом. СИФ) откладывали на графике в отношении Fab с помощью GraphPad Prism.

На **Фиг. 24А - 24D** показаны кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэннинга соединений с клетками НЕК, экспрессирующими PSMA шимпанзе. (Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и НЕК, экспрессирующих PSMA шимпанзе). На **Фиг. 24А** показаны кривые титрования для отобранных соединений G9-PSM M18, M25, M50, M52, M56, M57 и M59; На **Фиг. 24В** показаны M52 и M110; На **Фиг. 24С** показаны M81, M52, M85, и M87; а на **Фиг. 24D** показаны M52 и M84. На **Фиг. 24D** экспрессируемые млекопитающим супернатанты нормализовали по экспрессии Fab посредством Octet, и титровали либо к клеткам LNCaP человека, PSMG5 (НЕК с PSMA яванского макака), либо к клеткам PSMG9 (НЕК с PSMA шимпанзе) с помощью проточной цитометрии. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (геом. СИФ) откладывали на графике в отношении Fab с помощью GraphPad Prism.

На **Фиг. 25А-25D** показаны кривые титрования для связывания отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA с клетками НЕК, экспрессирующими PSMA яванского макака. (Кривые титрования Fab супернатанта млекопитающих для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA по сравнению с НЕК, экспрессирующими PSMA яванского макака). На **Фиг. 25А** показаны кривые титрования для отобранных соединений G9-PSM M18, M25, M50, M52, M56, M57 и M59; На **Фиг. 25В** показаны M52 и M110; На **Фиг. 25С** показаны M81, M52, M85, и M87; а на **Фиг. 25D** показаны M52 и M84. На **Фиг. 25D** экспрессируемые млекопитающим супернатанты нормализовали по экспрессии Fab посредством Octet, и титровали либо к клеткам LNCaP человека, PSMGS (НЕК с PSMA яванского макака), либо к клеткам PSMG9 (НЕК с PSMA шимпанзе) с помощью проточной цитометрии. Среднюю геометрическую интенсивность флуоресценции (геом. СИФ) откладывали на графике в отношении Fab с помощью GraphPad Prism.

На **Фиг. 26** показана общая структура Fab PSMM84, связанного с гомодимером ВКД человеческого PSMA.

На **Фиг. 27** показан вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с легкой цепью PSMB83. На **Фиг. 28** показан вид крупным планом основных взаимодействий PSMA с тяжелой цепью PSMB83.

На **Фиг. 29** показано сравнение остатков эпитопа PSMB83 в последовательностях PSMA человека (SEQ ID NO: 719), мыши (SEQ ID NO: 720) и яванского макаки (макаки) (SEQ ID NO: 721). Остатки эпитопа заштрихованы, а дивергенция последовательностей показана подчеркиванием.

На **Фиг. 30** показаны остатки паратопа PSMB83. CDR подчеркнуты, а остатки паратопа заштрихованы. На Фиг. 30 раскрыты SEQ ID NO 722-727, соответственно, по порядку.

На **Фиг. 31** представлена карта взаимодействия с прямыми контактами, установленными между PSMA и PSMM84. Ван-дер-ваальсовы взаимодействия показаны пунктирными линиями, а водородные связи представлены сплошными линиями со стрелками, указывающими на атомы остова.

На **Фиг. 32** показаны уровни экспрессии клонов Fab к PSMA, полученных из PSMM84, по сравнению с экспрессией исходного PSMB83. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации

На **Фиг. 33** показано связывание с человеческим PSMA клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMM84. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На **Фиг. 34** показано связывание с PSMA яванского макаки клонов Fab к PSMA, полученных из PSMB83, по сравнению со связыванием исходного PSMB83. Строили график зависимости исходных значений люминесценции от логарифмической концентрации.

На **Фиг. 35** показана цитотоксичность Т-клеток, опосредованная IC3B19 и IC3B34, ex vivo для клеток LAMA-84 20 в цельной крови через 48 часов. Концентрация IC3B19 и IC3B34 приведена в таблице в нижней части фигуры.

На **Фиг. 36** показана активация Т-клеток, опосредованная IC3B19 и IC3B34, ex vivo в цельной крови через 48 часов. Концентрация IC3B19 и IC3B34 приведена в таблице в нижней части фигуры.

На **Фиг. 37-56** показано опосредованное IC3B19 и IC3B34 вовлечение Т-клеток и IL1RAP+ линии клеток-мишеней LAMA-84 (эндогенные и добавленные экзогенно опухолевые клетки). Супернатанты оценивали в отношении 10 провоспалительных цитокинов из цельной крови (n=15 доноров) и анализировали активацию Т-клеток с добавлением экзогенной линии IL1RAP+ опухолевых клеток LAMA-84. Для этих фигур статистически значимые различия показаны жирным шрифтом.

На **Фиг. 37А-37В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-бета, опосредованное

IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 37А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 37В) через 24 часа.

На **Фиг. 38А-38В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-бета, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 38А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 38В) через 48 часов.

На **Фиг. 39А-39В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-2, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 39А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 39В) через 24 часа.

На **Фиг. 40А-40В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-2, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 40А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 40В) через 48 часов.

На **Фиг. 41А-41В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-4, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 41А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 41В) через 24 часа.

На **Фиг. 42** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-4, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 часов.

На **Фиг. 43А-43В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-6, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 43А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 43В) через 24 часа.

На **Фиг. 44** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-6, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 часов.

На **Фиг. 45** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-8, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 24 часа.

На **Фиг. 46** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-8, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 часов.

На **Фиг. 47А-47В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-10, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 47А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 47В) через 24 часа.

На **Фиг. 48А-48В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-10, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 48А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 48В) через 48 часов.

На **Фиг. 49** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-12p70, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 24 часа.

На **Фиг. 50** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-12p70, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 48 часов.

На **Фиг. 51** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-13, опосредованное IC3B19 и IC3B34, через 24 часа. На **Фиг. 52А-52В** показано высвобождение Т-клеточного ИЛ-13, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 52А), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 52В) через 48 часов.

На **Фиг. 53А-53В** показано высвобождение Т-клеточного ИФН-гамма,

опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 53A), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 53B) через 24 часа.

На **Фиг. 54A-54B** показано высвобождение Т-клеточного ИФН-гамма, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 54A), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 54B) через 48 часов.

На **Фиг. 55A-55B** показано высвобождение Т-клеточного ФНО-альфа, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 55A), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 55 B) через 24 часа.

На **Фиг. 56A-56B** показано высвобождение Т-клеточного ФНО-альфа, опосредованное IC3B19 и IC3B34 (Фиг. 56A), и соответствующие оценки параметров 4-параметрической логистической регрессии (Фиг. 56BB) через 48 часов.

На **Фиг. 57** показаны IC3B19 и IC3B34, но не биспецифические антитела с нулевыми плечами (IAPB57xB23B49 или B23B39xCD3B219), индуцированные специфической к мишени цитотоксичностью в клетках NCI-H1975. В этом анализе EC50 цитотоксичности варьируется в пределах трех раз для IC3B19 и IC3B34, при этом значения составляют 0,018 и 0,057 нМ, соответственно.

На **Фиг. 58** показана противоопухолевая эффективность IAPB57xCD3B376 в ксенотрансплантатах человеческих клеток NSCLC H1975 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Подкожные опухоли H1975 измеряли два раза в неделю, и результаты представляли в виде среднего объема опухоли, выраженного в $\text{мм}^3 \pm \text{СОС}$, * $p < 0,0001$.

На **Фиг. 59** показано сравнение изоэлектрических точек для различных конструкторов к PSMA.

На **Фиг. 60** показано изменение длины волны по сравнению с контрольной молекулой CNT05825. Контрольное CNT0607 демонстрирует характерное сильное самовзаимодействие. Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения от среднего значения трех повторностей.

На **Фиг. 61** показано сравнение времени удерживания на IgG и контрольных колонках в анализе перекрестного взаимодействия с антителом к PSMA.

На **Фиг. 62A-62B** показана оценка *ex vivo* биспецифических антител к CD33xCD3 с цитотоксичностью плеча к CD3 CD3B219 и CD3B376 в отношении бластов и активации Т-клеток в свежей цельной крови пациента с ОМЛ. На **Фиг. 2A** показан процент общей цитотоксичности в отношении клеток ОМЛ с использованием биспецифических антител к CD33 или контролей к CD3xnull. На **Фиг. 2B** показана активация Т-клеток, индуцированная биспецифическими антителами к CD33 или контролями к CD3xnull. При этом не было добавлено ни одного блокатора Fc.

На **Фиг. 63A-63C** показаны анализы опосредованной CD33xCD3 Т-клетками цитотоксичности. Биспецифические антитела к CD33xCD3 с использованием плеча к CD3 CD3B219 и анти-CD3B376 инкубировали с человеческими пан Т-клетками и линиями клеток ОМЛ, которые были или дикого типа (KG1, **Фиг. 3A**), или гетерозиготными (SH2, **Фиг. 3B**), или гомозиготными (OCIAML3, **Фиг. 3C**) по SNP-мутации CD33 rs12459419.

через 48 часов при 37 °С, 5% CO₂ общую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток измеряли с помощью проточной цитометрии.

На **Фиг. 64А-64В** 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.

На **Фиг. 65А-65В** 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.

На **Фиг. 66** показана противоопухолевая эффективность С3СВ189 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Диссеминированные опухоли MOLM-13 визуализировали на биолюминесценцию (BLI) дважды в неделю, а результаты представляли в виде средней интенсивности излучения (ф/с/см²/ср) ± СОС (n=8-10/группа). *p≤ 0,0001 для лечения по сравнению с контролем, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

На **Фиг. 67** показана выживаемость животных, получавших в качестве лечения С3СВ189, в модели ксенотрансплантатов человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Выживаемость мышей, несущих MOLM-13, графически представлена с использованием кривой Каплана - Мейера и оценивается с помощью логрангового критерия (критерия Кокса-Мантеля). *p≤ 0,0001 для групп лечения в сравнении с контрольными группами.

На **Фиг. 68** показана противоопухолевая эффективность С3СВ88 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG. Диссеминированные опухоли MOLM-13 визуализировали на биолюминесценцию (BLI) дважды в неделю, а результаты представляли в виде средней интенсивности излучения (ф/с/см²/ср) ± СОС (n=8-10/группа). *p≤ 0,0001 для лечения по сравнению с контролем, рассчитанное с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони.

На **Фиг. 69** показана выживаемость животных, получавших в качестве лечения С3СВ88, в модели ксенотрансплантатов человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей 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.

На **Фиг. 70** показано выравнивание выбранных переменных областей тяжелой цепи (VH) антитела к TMEFF2. Области VH идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки.

На **Фиг. 71** показано выравнивание выбранных переменных областей легкой цепи (VL) антитела к TMEFF2. Области VH идентифицированы по их SEQ ID NO: в начале каждой строки.

На **Фиг. 72** показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,5 мг/кг TMCB132, в модели рака предстательной железы LnCaP *ex vivo* у самцов мышей NGS.

На **Фиг. 73** показана эффективность TMEB762xCD3B376 в развившихся ксенотрансплантатах LNCaP у гуманизированных T-клетками мышей NSG.

На **Фиг. 74** показана активация T-клеток в клетка рака предстательной железы LnCaP в ответ на введение TMCB132.

На **Фиг. 75** показана опосредованная T-клетками цитотоксичность TMCB132.

На **Фиг. 76** показана противоопухолевая эффективность TMCB132 у гуманизированных T-клетками мышей.

Подробное описание изобретения

Все публикации, включая, без ограничений, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящий документ путем ссылки, как если бы они были полностью изложены в настоящем документе.

Следует понимать, что применяемые в настоящем документе термины предназначены только для цели описания конкретных вариантов осуществления и не имеют ограничительного характера. Все применяемые в настоящем документе технические и научные термины, если не указано иное, имеют общепринятое значение, понятное обычному специалисту в области, к которой относится изобретение.

В настоящем документе описаны иллюстративные способы и материалы, хотя при практическом осуществлении для проверки настоящего изобретения могут быть использованы любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе. При описании и изложении формулы настоящего изобретения будут применяться следующие термины.

При использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают и множественное число, если содержание текста ясно не указывает на иное. Так, например, ссылка на «клетку» включает в себя комбинацию двух или более клеток и т. п.

Термины «специфическое связывание», или «специфически связывает», или «связывает» относятся к связыванию антитела с антигеном или эпитопом в пределах антигена с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, антитело связывается с антигеном или эпитопом в пределах антигена с равновесной константой

диссоциации (K_D) около 5×10^{-8} М или менее, например, около 1×10^{-9} М или менее, около 1×10^{-10} М или менее, около 1×10^{-11} М или менее или около 1×10^{-12} М или менее, как правило, с K_D , которая по меньшей мере в сто раз ниже его K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, БСА, казеином). Константу диссоциации можно измерять с помощью стандартных процедур. Однако антитела, которые специфически связываются с антигеном или эпитопом в пределах антигена, могут иметь перекрестную реактивность в отношении других родственных антигенов, например, в отношении такого же антигена от других биологических видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes* (шимпанзе). Если моноспецифическое антитело специфически связывает один антиген или один эпитоп, биспецифическое антитело специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа.

«Антитела» означает в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина, включая моноклональные антитела, включая мышьиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, биспецифические или мультиспецифические антитела, димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. «Полноразмерные молекулы антител» состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), соединенных между собой дисульфидными связями, а также из их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно поделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), между которыми расположены каркасные области (FR). Каждая из VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, расположенных в направлении от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

«Определяющие комплементарность области (CDR)» представляют собой области антитела, которые связывают антиген. CDR можно определить с помощью различных систем разграничения, например, таких как Kabat (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211-50) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77) и AbM (Martin and Thornton (1996) J Mol Biol 263: 800-15). Описано соответствие между различными системами разграничения и нумерациями вариабельных областей (см., например, Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, (2001) J Mol Biol 309:657-70; база данных International ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурсы, http://www_imgt_org). Для разметки CDR можно использовать доступные программы,

такие как abYsis от UCL Business PLC. Используемые в настоящем документе термины «CDR», «HCDR1», «HCDR2», «HCDR3», «LCDR1», «LCDR2» и «LCDR3» включают в себя CDR, определенные любым из способов, описанных выше, по Кабат, чотиа, IMGT или AbM, если в описании явным образом не указано иное.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина могут относиться к пяти основным классам - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изоотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антител любых видов позвоночных в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов можно отнести к одному из двух четко отличающихся типов, а именно каппа (κ) и лямбда (λ).

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к части молекулы иммуноглобулина, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут представлять собой синтетические, ферментативно получаемые или модифицированные методами генной инженерии полипептиды, и они включают в себя VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, F(ab')₂, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, переменные домены IgNAR акулы, адаптированные к верблюду VH-домены, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих CDR-области антитела, например участки FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3, а также LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3. Домены VH и VL могут быть связаны вместе посредством синтетического линкера с образованием различных типов конфигураций одноцепочечных антител, в которых домены VH/VL могут объединяться в пару внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одноцепочечными конструктами антител с образованием моновалентного антигенсвязывающего сайта, такими как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело; они описаны, например, в международных патентных публикациях № WO1998/44001, WO1988/01649, WO1994/13804 и WO1992/01047.

Термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из по существу гомогенной популяции молекул антител, т. е. индивидуальных антител, составляющих популяцию, идентичных за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление C-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или деамидирование аминокислот, окисление метионина или аспарагина или деамидирование глутамин. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифические моноклональные антитела связываются с двумя разными антигенными эпитопами. В пределах популяции антител моноклональные антитела могут иметь гетерогенное гликозилирование. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, например биспецифическим, а также моновалентным, двухвалентным или мультивалентным.

«Выделенное антитело» относится к антителу или фрагменту антитела, который по

существу не содержит других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, специфически связывающее антиген, по существу не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от указанного антигена). В случае биспецифических антител к CD3 биспецифическое антитело специфически связывает как CD3, так и второй антиген. Термин «выделенное антитело» охватывает антитела, выделенные так, что они имеют более высокую степень чистоты, такие как антитела, являющиеся чистыми на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором по меньшей мере один CDR получен из биологического вида, отличного от человека, а по меньшей мере один каркас получен из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может включать в себя замены в каркасных областях, в результате чего каркасы могут не являться точной копией экспрессированного человеческого иммуноглобулина или человеческих генных последовательностей зародышевой линии.

Термин «человеческое антитело» относится к антителу, которое оптимизировано для обеспечения минимального иммунного ответа при введении человеческому индивиду. Вариабельные области человеческого антитела получены из последовательностей иммуноглобулинов человека. Если антитело человека содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов человека. Антитело человека содержит вариабельные области тяжелой и легкой цепи, которые «получены из» последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области антитела человека получены из системы, в которой используется иммуноглобулин человеческой зародышевой линии или реаранжированные гены иммуноглобулина. Такими примерами систем являются библиотеки генов человеческих иммуноглобулинов, отображаемые на фаге, и трансгенные животные, отличные от человека, такие как мыши или крысы, несущие локусы иммуноглобулинов человека. «Антитело человека», как правило, содержит аминокислотные различия по сравнению с иммуноглобулинами, экспрессируемыми у человека, из-за различий между системами, используемыми для получения антитела человека и локусов иммуноглобулина человека, введения соматических мутаций или преднамеренного введения замен в каркасные области или CDR, или и то и другое. Как правило, «антитело человека» на по меньшей мере около 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой генами иммуноглобулина человеческой зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях «антитело человека» может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализов человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86,

или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов иммуноглобулинов человека, отображаемых на фаге, например, как описано в публикации Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96 и в международной патентной публикации № WO2009/085462.

«Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей» относительно эталонной полипептидной последовательности определяется как процентная доля аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые являются идентичными с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения, в случае необходимости, гэпов для достижения максимальной идентичности последовательностей, но без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание с целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей может осуществляться различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступных компьютерных программ, таких как программные обеспечения BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей данного изобретения значения % идентичности аминокислотных последовательностей генерируются с использованием компьютерной программы сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для выравнивания последовательностей ALIGN-2 была автоматизирована Genentech. Inc., а исходная программа была подана вместе с документацией пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где она зарегистрирована под номером регистрации авторского права США TXU510087. Программа ALIGN 2 находится в свободном доступе от Genentech. Inc., г. Южный Сан-Франциско, штат Калифорния, США, или ее можно скомпилировать из исходного кода. Для применения в операционной системе UNIX, включающей цифровую версию UNIX V4.0D, программу ALIGN-2 нужно скомпилировать. Все параметры сравнения последовательностей устанавливаются программой ALIGN-2 и остаются неизменными. Если для сравнения аминокислотных последовательностей используется ALIGN-2, % идентичности данной аминокислотной последовательности А к, с, или по отношению к данной аминокислотной последовательности В (что в альтернативном варианте может быть сформулировано как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности к, с или по отношению к данной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

100 умножить на соотношение X/Y ,

где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных программой выравнивания последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при программном выравнивании А и В, и где Y представляет общее количество

аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что там, где длина аминокислотной последовательности А не равняется длине аминокислотной последовательности В, % идентичности аминокислотной последовательности А к В не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности В к А. Если специально не указано иное, все значения % идентичности аминокислотных последовательностей, которые используются в данном документе, получают, как описано в предыдущем абзаце с использованием компьютерной программы ALIGN-2.

Антитела, в которых антигенсвязывающие сайты получены из видов, отличных от человека, не подходят под определение антитела человека.

Термин «рекомбинантный» относится к ДНК, антителам и другим белкам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными способами, когда сегменты из разных источников соединены с получением рекомбинантной ДНК, антител или белков.

Термин «эпитоп» означает часть антигена, с которым специфически связывает антитело. Как правило, эпитопы состоят из химически активных (таких как полярные, неполярные или гидрофобные) поверхностных группировок фрагментов, таких как боковые цепи аминокислот или полисахаридов, и могут иметь конкретные характеристики трехмерной структуры, а также конкретные характеристики заряда. Эпитоп может быть образован из непрерывных и/или прерывающихся аминокислот, образующих конформационное пространственное звено. В случае прерывающегося эпитопа аминокислоты из разных частей линейной последовательности антигена подходят близко друг к другу в 3-мерном пространстве посредством сворачивания молекулы белка. «Эпитоп» антитела зависит от методологии, применяемой для выявления эпитопа.

Термин «паратоп» означает часть антитела, с которой специфически связывается антиген. Паратоп может быть линейным или дискретным, образованным за счет пространственных взаимоотношений между аминокислотами антитела, не находящимися в непрерывной последовательности, в отличие от взаимодействия линейных последовательностей аминокислот. Термины «паратоп легкой цепи» и «паратоп тяжелой цепи», или «аминокислотные остатки паратопа легкой цепи» и «аминокислотные остатки паратопа тяжелой цепи» означают остатки легкой и тяжелой цепей антитела, контактирующие, соответственно, с антигеном или в целом «остатки паратопа антитела» означают те аминокислоты антитела, которые контактируют с антигеном.

Термин «биспецифический» относится к антителу, которое специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в пределах одного антигена. Биспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «мультиспецифический» относится к антителу, которое специфически

связывает два или более разных антигенов или два или более разных эпитопов в пределах одного антигена. Мультиспецифическое антитело может иметь перекрестную реактивность с другими родственными антигенами, например, таким же антигеном от других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca fascicularis* (яванский макак, макак) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который имеется в двух или более разных антигенах.

Термин «вариант» относится к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или более модификациями, например одной или более заменами, вставками или делециями.

Термин «вектор» относится к полинуклеотиду, который способен к удвоению внутри биологической системы, или может быть перемещен между такими системами. Векторные полинуклеотиды, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, промотор, сигнал полиаденилирования и селективные маркеры, способствующие дубликации или сохранению данных полинуклеотидов в биологической системе, такой как клетка, вирус, животное, растение и восстановленные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Векторный полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК или их гибрид, одноцепочечную или двухцепочечную молекулу.

Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в экспрессионном векторе.

Термин «полинуклеотид» означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечная и одноцепочечная ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов. Термин «полинуклеотид» может относиться к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. кДНК является примером синтетического полинуклеотида.

Термин «полипептид» или «белок» относится к молекуле, которая содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Малые полипептиды, содержащие менее 50 аминокислотных остатков, могут называться «пептидами».

«Проточная цитометрия» представляет собой технологию, применяемую для определения физических и химических характеристик частиц в текучей среде по мере их прохождения через по меньшей мере один лазер. Компоненты клеток флуоресцентно метят, а затем возбуждают лазером для излучения света с различными длинами волн (Adan, et al, *Critical Reviews in Biotechnology* (2016) 1549-7801).

«Антиидиотипическое (анти-Id) антитело» представляет собой антитело, которое

распознает антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Специалистам в данной области техники по существу известен способ получения или приготовления антиидиотипического антитела. (Lathey, J. et al Immunology 1986 57(1):29-35). Антиидиотипическое антитело может быть антиген-блокирующим или неблокирующим. Антиген-блокирующие антиидиотипическое антитела можно использовать для обнаружения свободных антител в образце, например, CD3. Неблокирующее антиидиотипическое антитело можно использовать для обнаружения общего антитела (свободного, частично связанного с антигеном или полностью связанного с антигеном) в образце. Антиидиотипическое антитело можно получить путем иммунизации животного антителом, к которому получают антиидиотипическое антитело. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антиидиотипическое антитело используется для обнаружения уровня терапевтических антител в образце.

Анти-Id-антитело также можно применять в качестве иммуногена для индукции иммунного ответа у еще одного животного, получая так называемое анти-анти-Id-антитело. Антитело к антиидиотипическому антителу может быть идентично по эпитопам первичному мкАт, которое индуцировало образование антиидиотипического антитела. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам mAb, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности. Антиидиотипические антитела можно изменять (тем самым продуцируя варианты антиидиотипических антител) и/или получать производные с помощью любого подходящего способа, такого как те, которые описаны в другом месте в настоящем документе в отношении антител к CD3.

PSMA относится к простатспецифическому мембранному антигену. Аминокислотная последовательность PSMA Pan troglodytes (также называемых шимпанзе) показана в SEQ ID NO: 49. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 49. Аминокислотная последовательность PSMA Macaca fascicularis (также называемого яванским макаком, макаком или макаком-крабоедом) показана в SEQ ID NO: 50. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 50. Аминокислотная последовательность зрелого PSMA человека приведена в SEQ ID NO: 51. Внеклеточный домен охватывает остатки 44-750, трансмембранный домен охватывает остатки 20-43, а цитоплазматический домен охватывает остатки 1-19 в последовательности SEQ ID NO: 51.

В настоящем описании термины «CD3-специфический» или «специфически связывает CD3» или «антитело к CD3» относятся к антителам, которые специфически связываются с полипептидом CD3-эпсилон (SEQ ID NO: 635), включая антитела, которые специфически связываются с внеклеточным доменом CD3-эпсилон (ВКД) (SEQ ID NO:

636). CD3-эпсилон, вместе с CD3-гамма, -дельта и -дзета, а также гетеродимерами Т-клеточных рецепторов альфа/бета и гамма/дельта, образуют комплекс Т-клеточный рецептор - CD3. Этот комплекс играет важную роль в связывании распознавания антигена с несколькими внутриклеточными путями сигнальной трансдукции. Комплекс CD3 опосредует трансдукцию сигнала, что приводит к активации Т-клеток и пролиферации. Для иммунного ответа необходим CD3.

SEQ ID NO:635 (человеческий CD3-эпсилон)

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGS
EILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLR
ARVCENCMEMDMVMSVATIVIVDICITGGLLLLVEYYWSKNRKAkakpvTRGAGAGGRQR
GQNKERPPVPNPDYEPiRKGQRDLYSGLNQRI

SEQ ID NO: 636 (внеклеточный домен человеческого CD3-эпсилон)

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS
DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD

Используемые в настоящем документе термины «аксессуарный белок рецептора интерлейкина-1» , «IL1RAP» и «IL1-RAP» конкретно включают человеческий белок IL1RAP, например, как описывается в каталоге Genbank под номером доступа AAB84059, эталонная последовательность NCBI: NP_002173.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot Q9NPH3-1 (см. также Huang et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (24), 12829-12832). В научной литературе IL1RAP также известен как IL1 R3, C3orf13, FLJ37788, IL-1 RAcP и EG3556.

Термин « CD33» относится к белку кластера дифференцировки 33. CD33 представляет собой однопроходной трансмембранный гликопротеин размером 67 килодальтон (кДа) и является членом семейства связывающих сиаловую кислоту иммуноглобулиноподобных лектинов (Siglecs). CD33 в основном считается антигеном миелоидной дифференцировки, имеющим низкий уровень экспрессии в миелоидных клетках-предшественниках, нейтрофилах и макрофагах и высокий уровень экспрессии в циркулирующих моноцитах и дендритных клетках. Внеклеточный домен CD33 человека (Uniprot P20138) (SEQ ID NO: 636) и CD33 яванского макака (XP_005590138.1) являются примерами белков для применения в получении CD33-специфических антител по настоящему описанию.

Термин «TMEFF2» относится к человеческому трансмембранному белку с EGF-подобным и двумя фоллистатиноподобными доменами 2, также называемым томорегулином 2. Аминокислотная последовательность полноразмерной последовательности TMEFF2 человека приведена в SEQ ID NO: 77. Внеклеточный домен TMEFF2 приведен в SEQ ID NO: 575 и охватывает остатки 40-374 полноразмерного TMEFF2. Внеклеточный домен TMEFF2 содержит три отдельных субдомена: Kazal-подобный 1 (остатки 85-137), Kazal-подобный 2 (остатки 176-229) и EGF-домен (остатки 261-301). EGF-домен TMEFF2 приведен в SEQ ID NO: 577. Термин «мембранная проксимальная область» TMEFF2 относится к области TMEFF2 с SEQ ID NO: 629,

которая охватывает EGF-домен и N-C-концевые линкерные области (например, остатки 230-320 полноразмерного человеческого TMEFF2 с SEQ ID NO: 77). Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к отличным от человека видам. Таким образом, «TMEFF2» означает человеческий TMEFF2, если не указано что он получен от видов, отличных от человека, например, «мышинный TMEFF2» или «обезьяний TMEFF2» и т. д.

SEQ ID NO: 77 (полноразмерный человеческий TMEFF2)

```
MVLWESPRQCSSWTLCEGFCWLLLLPVMLLIVARPVKLAAPFPTSLSDCQTPTGW
NCSGYDDRENDLFLCDTNTCKFDGECRLRIGDVTVCVCQFKCNNDYVPVCGSNGESYQN
ECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSGDGVHEGSGGETSQKETSTCDICQFGAEC
DEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQEKIEVMSLGRCQD
NTTTTTKSEDGHHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPS
CRCDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYVLIAAVIGTIQIAVICVVVLCITRKCPRS
NRIHRQKQNTGHHYSSDNTTRASTRLI
```

SEQ ID NO: 575 (внеклеточный домен человеческого TMEFF2)

```
FPTSLSDCQTPTGWNCSGYDDRENDLFLCDTNTCKFDGECRLRIGDVTVCVCQFK
CNNDYVPVCGSNGESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDAGSGSGDGVHEGSG
ETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEA
SCQKQEKIEVMSLGRCQDNTTTTTKSEDGHHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYN
GFCMHGKCEHSINMQEPSCRCDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYVLIAAVIGTI
QIAVICVVVLCITRKCPRSNRIHRQKQNTGHHYSSDNTTRASTRLI
```

EGF-домен TMEFF2, **SEQ ID NO: 577**

HHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRCDAGYTGQHCE

Мембранная проксимальная область TMEFF2, **SEQ ID NO: 629**

```
NTTTTTKSEDGHHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSIN
MQEPSCRCDAGYTGQHCEKKDYSVLYVVP GPVRFQYV
```

Термин «TMEFF2-положительное злокачественное новообразование» относится к раковой ткани или раковой клетке, которая демонстрирует измеримый уровень белка TMEFF2. Уровень белка TMEFF2 может быть измерен с использованием хорошо известных анализов с использованием, например, твердофазного ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммуноанализа на живых или лизированных клетках. Термины «сверхэкспрессия», «сверхэкспрессированный» и «сверхэкспрессирующий» взаимозаменяемо относятся к образцу, такому как раковая клетка, злокачественная клетка или раковая ткань, которые имеют значительно более высокие уровни опухолевого антигена по сравнению с эталонным образцом. Сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией генов или повышенной транскрипцией или трансляцией. Экспрессию и сверхэкспрессию белка в образце можно измерять с помощью известных анализов, например, твердофазного ИФА, иммунофлуоресценции, проточной цитометрии или радиоиммунного анализа на живых

или лизированных клетках. Экспрессию и сверхэкспрессию полинуклеотида в образце можно измерять, например, с помощью методик флуоресцентной гибридизации *in situ*, саузерн-блоттинга или ПЦР. Белок или полинуклеотид сверхэкспрессируется, когда уровень белка или полинуклеотида в образце в по меньшей мере 1,5 раза выше по сравнению с эталонным образцом. Выбор эталонного образца хорошо известен.

Термин «образец» относится к сбору аналогичных текучих сред, клеток или тканей, выделенных из организма пациента, а также к текучим средам, клеткам или тканям, находящимся внутри пациента. Примерами образцов являются биологические текучие среды, такие как кровь, сыворотка и серозные текучие среды, плазма, лимфа, моча, слюна, кистозная текучая среда, слезы, кал, мокрота, слизистые выделения секреторных тканей и органов, влагалищные выделения, асцитные жидкости, такие как связанные с несолидными опухолями, текучие среды в плевре, перикарде, брюшине, брюшной и других полостях тела, текучие среды, собранные посредством смыва из бронхов, жидкие растворы, контактировавшие с субъектом или биологическим источником, например, среда для культуры клеток и органов, включая кондиционированную среду клеток и органов, промывные жидкости и т. п., биоптаты тканей, аспираты, взятый тонкой иглой, или ткань опухоли после хирургической резекции.

Термин «раковая клетка» или «опухолевая клетка» относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке, либо *in vivo*, *ex vivo*, либо в культуре тканей, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно затрагивают поступление нового генетического материала. Хотя преобразование может вызвать инфицирование преобразующим вирусом и встраивание новой геномной нуклеиновой кислоты или поглощение экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может возникнуть спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего происходит мутация эндогенного гена. Преобразование/злокачественное новообразование проявляется в морфологических изменениях, иммортализации клеток, нарушении контроля роста, образовании очагов, пролиферации, злокачественности, уровнях маркера, специфических для опухоли, инвазивности, росте опухоли у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo* (Freshney, Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique (3rd ed. 1994)).

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.

Термин «эффекторные антигены» представляют собой антигены из клеток иммунной системы, которые могут стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена и/или высвобождение цитокинов. Такие эффекторные антигены получены, например, без ограничений, из Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK). Примеры подходящих специфичностей для эффекторных антигенов включают, без ограничений, CD3 или субъединицы CD3, такие как CD3ε для Т-клеток и CD16 для NK-клеток. Такие молекулы клеточной поверхности эффекторных клеток подходят для опосредования уничтожения клеток. Эффекторные клетки представляют собой клетки иммунной системы, которые могут стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена и/или высвобождение цитокинов. Такие эффекторные клетки представляют собой, например, без ограничений, Т-клетки, естественные клетки-киллеры (NK), гранулоциты, моноциты, макрофаги, дендритные клетки и антигенпрезентирующие клетки. Примеры подходящей специфичности для эффекторных клеток включают, без ограничений, CD2, CD3 и субъединицы CD3, такие как CD3ε, CD5, CD28 и другие компоненты Т-клеточного рецептора (TCR) для Т-клеток; CD16, CD16A, CD25, CD38, CD44, CD56, CD69, CD94, CD335 (NKp46), CD336, (NKp44), CD337 (NKp30), NKp80, NKG2C и NKG2D, DNAM, NCR для NK-клеток; CD18, CD64 и CD89 для гранулоцитов; CD18, CD32, CD64, CD89 и маннозный рецептор для моноцитов и макрофагов; CD64 и маннозный рецептор для дендритных клеток; а также CD35. В некоторых вариантах осуществления изобретения эти специфичности, т.е. молекулы клеточной поверхности, эффекторных клеток подходят для опосредования уничтожения клеток при связывании биспецифических или мультиспецифических молекул с такой молекулой клеточной поверхности и, таким образом, индуцируя цитолиз или апоптоз.

Термин «биспецифическое антитело к CD3» относится к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий второй антиген, например, биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген. Домены, специфически связывающие CD3 и второй антиген, как правило, представляют собой пары V_H/V_L . Биспецифическое антитело к CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с CD3, или со вторым антигеном. В некоторых вариантах осуществления второй или целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой опухолеассоциированный антиген (ТАА). Иллюстративные ТАА представляют собой PSMA, CD33, IL1RAP и TMEFF2.

Термины «биспецифическое антитело к PSMA×CD3», «антитело к PSMA/CD3», «биспецифическое антитело против PSMA×CD3» или «антитело против PSMA/CD3» и

т.п. относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий PSMA, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие PSMA и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L . Биспецифическое антитело к PSMA×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с PSMA, или с CD3.

Термины «биспецифическое антитело к CD33×CD3», «антитело к CD33/CD3», «биспецифическое антитело против CD33×CD3» или «антитело против CD33/CD3» и т.п. относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD33, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие CD33 и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L . Биспецифическое антитело к CD33×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с CD33, или с CD3.

Термины «биспецифическое антитело к IL1RAP×CD3», «антитело к IL1RAP/CD3», «биспецифическое антитело против IL1RAP×CD3» или «антитело против IL1RAP/CD3» и т.п. относятся к молекуле, содержащей по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий IL1RAP, и по меньшей мере один связывающий домен, специфически связывающий CD3. Домены, специфически связывающие IL1RAP и CD3, как правило, представляют собой пары V_H/V_L . Биспецифическое антитело к IL1RAP×CD3 может быть моновалентным с точки зрения его связывания или с IL1RAP, или с CD3.

Термины «биспецифическое антитело против TMEFF2/CD3», «антитело к TMEFF2/CD3», «антитело к TMEFF2×CD3 » и т. п. относятся к антителу, которое связывается с TMEFF2 и CD3.

Термин «валентный» относится к наличию в молекуле установленного числа сайтов связывания, специфичных для антигена. Таким образом, термины «моновалентный», «двухвалентный», «четырёхвалентный» и «шестивалентный» относятся к наличию в молекуле одного, двух, четырех и шести сайтов связывания соответственно, специфичных для антигена. Термин «мультивалентный» относится к наличию двух или более сайтов связывания, специфических для антигена в молекуле.

Термин «антигенспецифическая CD4+ или CD8+ Т-клетка» относится к CD4+ или CD8+ Т-клетке, активированной специфическим антигеном или его иммуностимулирующим эпитопом.

Термин «пациент» включает в себя любого человека или не относящееся к человеку животное. Термин «отличное от человека животное» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и отличных от млекопитающих животных, таких как приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Если не указано иное, термины «пациент» или «субъект» применяются взаимозаменяемо.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела в тексте описания приведена в соответствии с индексом EU, как описано в публикации Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes

of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

Таблица 1 В настоящем документе применяются стандартные одно- и трехбуквенные коды аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенный код	Однобуквенный код
Аланин	Ala	A
Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N
Аспартат	Asp	D
Цистеин	Cys	C
Глутамат	Gln	E
Глутамин	Glu	Q
Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H
Изолейцин	Ile	I
Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M
Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P
Серин	Ser	S
Треонин	Thr	T
Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y
Валин	Val	V

Химические соединения

В настоящем изобретении предложены антитела к CD3 и их антигенсвязывающие фрагменты, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают PSMA, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CD33, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают IL1RAP, мультиспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, а также мультиспецифические антитела, которые специфически связывают CD3, и один или более из PSMA, CD33, IL1RAP и TMEFF2. В настоящем изобретении предложены полипептиды и полинуклеотиды, кодирующие биспецифические антитела по изобретению, или комплементарные к ним нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева и способы их получения и применения.

Общие аспекты антител, описанных в настоящем документе

Описанные в настоящем документе антитела к CD3 или антигенсвязывающие

фрагменты включают варианты, имеющие одну или более аминокислотных замен, делеций или добавления, которые сохраняют биологические свойства (например, аффинность связывания или иммунную эффекторную активность) описанных антител к CD3 или антигенсвязывающих фрагментов. В контексте настоящего изобретения, при отсутствии особых указаний, для описания мутаций используются следующие обозначения: i) замена аминокислоты в заданном положении записывается, например, как K409R, что означает замену лизина на аргинин в положении 409; и ii) для конкретных вариантов используются конкретные трехбуквенные или однобуквенные коды, включая коды Хаа и X, для обозначения любого аминокислотного остатка. Таким образом, замена лизина на аргинин в положении 409 обозначается как K409R, а замена лизина в положении 409 на любой аминокислотный остаток обозначается как K409X. Делеция лизина в положении 409 обозначается K409*. Специалист может получать варианты, содержащие одиночные или множественные замены, делеции или присоединения аминокислот.

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

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут относиться к изотипу IgM, IgD, IgG, IgA или IgE. В некоторых вариантах осуществления изотип антитела представляет собой изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG1. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG2. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG3. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к изотипу IgG4. Специфичность антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по большей части определяется аминокислотной последовательностью и расположением CDR. Следовательно, CDR одного изотипа можно переносить на другой изотип без изменения антигенной специфичности. Соответственно,

такие изотипы антител входят в объем описанных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Класс IgG у людей делится на четыре изотипа: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Они имеют более чем 95% гомологию в аминокислотных последовательностях в областях CH1, CH2 и CH3, но демонстрируют значительные различия в аминокислотном составе и структуре шарнирной области. Fc-область опосредует эффекторные функции, например антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). При АЗКЦ Fc-область связывается с Fc-рецепторами (FcγR) на поверхности иммунных эффекторных клеток, например, естественных клеток-киллеров и макрофагов, что приводит к лизису клеток-мишеней. При КЗЦ антитела опосредуют целевое уничтожение клеток, запуская каскад комплемента на поверхности клетки. При АЗКФ антитело опосредует уничтожение покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки. Описанные в данном документе антитела включают антитела с описанными свойствами переменных доменов в комбинации с любым из изотипов IgG, включая модифицированные версии, в которых Fc-область была модифицирована для модуляции различных эффекторных функций.

Для многих применений терапевтических антител эффекторные функции, опосредованные Fc, нежелательны, поскольку они потенциально могут представлять риск безопасности из-за истощения популяции клеток. Изменить эффекторные функции можно путем конструирования Fc-областей для уменьшения их связывания с FcγR или факторами системы комплемента. Связывание IgG с активирующими (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIIa и FcγRIIIb) и ингибирующими (FcγRIIb) FcγR или первым компонентом комплемента (C1q) зависит от остатков, расположенных в шарнирной области и в домене CH2. Мутации могут быть введены в IgG1, IgG2 и IgG4 для снижения или подавления опосредованных Fc эффекторных функций. Антитела, описанные в настоящем документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP содержат сконструированную Fc-область, имеющую одно или более из следующих свойств: (a) сниженная эффекторная функция по сравнению с исходной Fc; (b) сниженная аффинность к FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIb и/или FcγRIIIa; (c) сниженная аффинность к FcγRI; (d) сниженная аффинность к FcγRIIa; (e) сниженная аффинность к FcγRIIIb; или (f) сниженная аффинность к FcγRIIIa.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP относятся к изотипам, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG4, антитело содержит замены S228P, F234A и L235A в своей Fc-области по сравнению с IgG4 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело имеет изотип IgG1, антитело содержит замены L234A, и L235A в Fc-области. Антитела, описанные в настоящем

документе, могут включать в себя эти модификации.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP представляет собой изотип IgG4, необязательно имеющий замену в тяжелой цепи S228P.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP представляют собой изотип IgG1, необязательно имеющий замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, A330 и P331S по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP представляют собой изотип IgG2, необязательно имеющий замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, V309L, A330S и P331S по сравнению с IgG2 дикого типа.

IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLGK (SEQ ID NO: 602)

IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 601)

IgG2 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID NO: 711)

В определенных вариантах осуществления предложены меченые антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP. Иллюстративные метки или фрагменты, которые обнаруживаются напрямую (например, флуоресцентные, хромофорные, электронно-плотные, хемилюминесцентные и радиоактивные метки), и метки и фрагменты (например, ферменты или лиганды), которые обнаруживаются опосредованно (например, посредством ферментативной реакции или молекулярного взаимодействия). Примеры радиоактивных меток включают радиоактивные метки (например, ^{32}P , ^{14}C , ^{111}I , ^{125}I , ^3H , ^{131}I), флуоресцентные метки (такие как DyLight® 649), эпитопные метки, биотин,

хромофорные метки, электрохемилюминесцентные метки или ферменты. Более конкретно, описанные метки включают в себя рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA), пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу, полигистидин (HIS-метку), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители, красители Alexa Fluor® и т. п.

В дополнение к описанным антителам к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP и антигенсвязывающим фрагментам также предложены полинуклеотидные последовательности, способные кодировать описанные антитела и антигенсвязывающие фрагменты. Также предложены векторы, содержащие описанные полинуклеотиды, а также клетки, экспрессирующие антитела к CD3, к PSMA, к CD33 и/или к IL1RAP или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Кроме того, описаны клетки, способные экспрессировать описанные векторы. Эти клетки могут представлять собой клетки млекопитающих (например, клетки 293F, клетки CHO), клетки насекомых (например, клетки Sf7), клетки дрожжей, клетки растений или бактериальные клетки (например, *E. coli*). Описанные антитела также могут продуцироваться гибридомными клетками.

Создание моноспецифических антител

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP по изобретению являются человеческими.

В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP по изобретению являются гуманизированными.

Описанные в настоящем документе моноспецифические антитела по изобретению (например, антитела к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP) можно получать с использованием различных технологий. Например, для получения моноклональных антител можно использовать метод гибридом Kohler and Milstein, Nature 256: 495, 1975. В методе гибридом мышь или другое животное-хозяин, такое как хомяк, крыса или курица, иммунизируют PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3 человека, шимпанзе или макака или фрагментами PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3, такими как внеклеточный домен PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3, с последующим слиянием клеток селезенки от иммунизированных животных с клетками миеломы с использованием стандартных методов для получения клеток гибридомы (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Колонии, возникающие из одиночных клеток иммортализованной гибридомы, подвергают скринингу на основании продукции антител с желательными свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие и аффинность к антигену.

Различные животные-хозяева могут быть использованы для продуцирования антител к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 и/или к IL1RAP по изобретению, описанных в настоящем документе. Например, для получения мышинных антител к человеческому PSMA можно использовать мышей Balb/c. Антитела, полученные от мышей линии Balb/c

и от других животных, отличных от человека, могут быть гуманизированы с применением разнообразных технологий для создания последовательностей, имеющих большее сходство с человеческими последовательностями.

Примеры методик гуманизации, включающих отбор человеческих акцепторных каркасов, известны и включают в себя пересадку CDR (патент США № 5225539), пересадку SDR (патент США № 6818749), изменение поверхности (Padlan, (1991) *Mol Immunol* 28:489-499), изменение поверхности определяющих специфичность остатков (патентная публикация США № 2010/0261620), адаптацию человеческого каркаса (патент США № 8,748,356) или супергуманизацию (патент США № 7,709, 226). В этих способах CDR исходных антител переносят на человеческие каркасы, которые можно выбирать на основании их общей гомологии с исходными каркасами, на основании сходства длины CDR или идентичности канонической структуры либо их комбинации.

Гуманизированные антитела могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности к требуемому антигену посредством включения измененных остатков, поддерживающих каркас, с сохранением аффинности связывания (обратных мутаций) такими методиками, которые описаны в международных патентных публикациях № WO1090/007861 и WO1992/22653, или посредством встраивания вариации в любую из CDR, например, для улучшения аффинности антитела.

Для получения человеческих антител против белка-мишени можно применять трансгенных животных, несущих в своем геноме локусы иммуноглобулинов (Ig) человека, таких как мыши или крысы, которые описаны, например, в патенте США № 6150584, международной патентной публикации № WO99/45962, международных патентных публикациях №№ WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 и WO1990/04036, Lonberg et al (1994) *Nature* 368:856-9; Green et al (1994) *Nature Genet.* 7:13-21; Green & Jakobovits (1998) *Exp. Med.* 188:483-95; Lonberg and Huszar (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93; Bruggemann et al., (1991) *Eur J Immunol* 21:1323- 1326; Fishwild et al., (1996) *Nat Biotechnol* 14:845-851; Mendez et al., (1997) *Nat Genet* 15:146-156; Green (1999) *J Immunol Methods* 231:11-23; Yang et al., (1999) *Cancer Res* 59:1236-1243; Bruggemann and Taussig (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8:455-458. Эндогенные локусы иммуноглобулинов у таких животных можно разрывать или удалять, и в геном животного можно встраивать по меньшей мере один полный или частичный локус иммуноглобулина человека посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации, с применением трансхромосом или с применением минигенов. Для получения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением описанной выше технологии можно обратиться к таким компаниям, как Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) и Ablexis (http://_www_ablexis_com).

Антитела человека можно выбирать из библиотеки фагового дисплея, причем фаг сконструирован с возможностью экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их

участков, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные, или спаренные переменные области антител (Knappik et al., (2000) *J Mol Biol* 296:57-86; Krebs et al., (2001) *J Immunol Meth* 254:67-84; Vaughan et al., (1996) *Nature Biotechnology* 14:309-314; Sheets et al., (1998) *PITAS (USA)* 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter (1991) *J Mol Biol* 227:381; Marks et al., (1991) *J Mol Biol* 222:581). Антитела по изобретению могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей переменные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде гибридных белков с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в публикации Shi et al., (2010) *J Mol Biol* 397:385-96, и в международной патентной публикации № WO09/085462). В библиотеках можно проводить скрининг на связывание фагов PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2, или CD3 человека и/или яванского макака, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы; из лизатов клонов могут быть выделены Fab и экспрессированы в виде полноразмерных IgG. Такие способы использования фагового дисплея для выделения человеческих антител описаны, например, в патентах США №№ 5223409, 5403484, 5571698, 5427908, 5580717, 5969108, 6172197, 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081.

Получение иммуногенных антигенов и продукция моноклональных антител могут быть выполнены с применением любой приемлемой методики, такой как продукция рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животным в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих целые клетки или клеточные, или тканевые экстракты, или антиген может быть заново образован в теле животного из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его участок.

Создание и применение биспецифических и мультиспецифических антител к CD3

В изобретении предложены биспецифические и мультиспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген. Второй антиген может представлять собой опухолеассоциированный антиген (ТАА) или антиген на патогенных клетках.

Примеры антител к CD3, которые можно использовать для получения биспецифических и мультиспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, включают антитела к CD3, содержащие последовательности V_H/V_L и CDR тяжелой/легкой цепи, приведенные в таблицах 7A и 7B, соответственно, и их сконструированные варианты, описанные в таблице 10 и таблице 11, а также в сопроводительном тексте. Например, CDR и/или домены V_H/V_L антител к CD3 CD3B312, CD3B313, CD3B314, CD3B315, CD3B316, CD3B317, CD3B337, CD3B373, CD3B376, CD3B389, CD3B450 и CD3B467, описанных в настоящем документе, могут быть использованы для получения биспецифических и мультиспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

Описанные в настоящем документе CDR и/или домены V_H/V_L антител к CD3

могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

Описанные в настоящем документе CDR и/или домены VH/VL антитела к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие PSMA-связывающие домены VH/VL, описанные в настоящем документе и в таблице 23. Описанные в настоящем документе CDR и/или домены VH/VL антитела к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие IL1RAP-связывающие домены VH/VL, описанные в настоящем документе и в таблице 30. Описанные в настоящем документе CDR и/или домены VH/VL антитела к CD3 могут быть включены в биспецифические антитела, содержащие CD33-связывающие домены VH/VL, описанные в настоящем документе и в таблице 38. Например, домены VH/VL антител к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, и PSMB365, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для получения биспецифических антител к PSMA×CD3.

Иллюстративные ТАА представляют собой PSMA, CD33, TMEFF2 и IL1RAP. Иллюстративные мультиспецифические антитела к PSMA×CD3, CD33×CD3, TMEFF2,×CD3, и IL1RAP×CD3, предложенные в настоящем документе, имеют первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP. Иллюстративные антитела к PSMA, которые можно использовать для получения биспецифических молекул к PSMA×CD3, представляют собой описанные в настоящем документе антитела, которые могут содержать последовательности тяжелой и легкой цепей, включая, без ограничений, последовательности тяжелой и легкой цепей, перечисленные в таблице 23. Иллюстративные антитела к IL1RAP, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к IL1RAP×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи, включая, без ограничений, последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в таблице 35. Иллюстративные антитела к CD33, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к CD33×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи, включая, без ограничений, последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в таблице 43. Иллюстративные антитела к TMEFF2, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к TMEFF2×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать последовательности варибельной

области тяжелой и легкой цепи, включая, без ограничений, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в таблице 59, 66-68.

Созданные биспецифические антитела можно протестировать на их связывание с CD3 и/или вторым антигеном и/или на их желательные функциональные характеристики, такие как опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, которые экспрессируют второй антиген.

Предложенные в данном документе биспецифические антитела включают антитела, имеющие полноразмерную структуру антитела.

Термин «Fab-плечо» или «полумолекула» означает одну пару тяжелая цепь-легкая цепь, специфически связывающуюся с антигеном.

Полноразмерные биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, можно создать, например, путем обмена Fab-плечами (или обмена полумолекулами) между двумя моноспецифическими двухвалентными антителами, введя в поверхность взаимодействия СНЗ тяжелой цепи в каждой полумолекуле замены, способствующие образованию гетеродимера из двух полумолекул антител, имеющих разную специфичность, или *in vitro* в бесклеточной среде, или с использованием коэкспрессии. Реакция обмена Fab-плечами является результатом реакции дисульфидной изомеризации и диссоциации-ассоциации СНЗ-доменов. Восстанавливаются дисульфидные связи тяжелых цепей в шарнирных областях исходных моноспецифических антител. Полученные свободные цистеины одного из исходных моноспецифических антител образуют дисульфидную связь тяжелых цепей с цистеиновыми остатками второй молекулы исходного 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, каждая из которых связывает отдельный эпитоп, то есть эпитоп на CD3 и эпитоп на втором антигене.

Термин «гомодимеризация» относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих идентичные аминокислотные последовательности СНЗ. Термин «гомодимер» относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с идентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

Термин «гетеродимеризация» относится к взаимодействию двух тяжелых цепей, имеющих неидентичные аминокислотные последовательности СНЗ. «Гетеродимер» относится к антителу, имеющему две тяжелые цепи с неидентичными аминокислотными последовательностями СНЗ.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела включают конструкторы, такие как Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), «выступы во впадины» (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически-спариваемые (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), LUZ-Y (Genentech), сконструированное посредством

обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) и DuoBody[®] Technology (Genmab A/S).

Технологию Triomab quadroma можно применять для получения полноразмерных биспецифических антител, включающих VH и VL антител к CD3 по изобретению. Технология Triomab стимулирует обмен Fab-плечами между двумя исходными химерными антителами, одним исходным mAb, имеющим IgG2a, и вторым исходным mAb, имеющим крысиные константные области IgG2b, с получением химерных биспецифических антител.

Для получения полноразмерных биспецифических антител можно применять стратегию «выступ во впадину» (см., например, международную публикацию № WO 2006/028936). Вкратце выбранные аминокислоты, образующие интерфейс между доменами СН3 в человеческом IgG, можно подвергать мутации в положениях, влияющих на взаимодействия доменов СН3, 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 СН3, образующих выступ и впадину, являются следующие (указаны как модифицированное положение в первом домене СН3 первой тяжелой цепи/модифицированное положение во втором домене СН3 второй тяжелой цепи): T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Для получения полноразмерных биспецифических антител по изобретению можно использовать технологию CrossMAb. Антитела CrossMAb дополнительно к применению стратегии обмена Fab-плечами в промоторе по типу «выступ во впадину» имеют в одной из половин плеч обмен доменами СН1 и CL для обеспечения правильного объединения в пары легкой цепи полученного биспецифического антитела (см., например, патент США № 8,242,247).

Для создания полноразмерных биспецифических антител могут быть использованы другие стратегии перенаправления путем обмена переменного или константного или обоих доменов между тяжелой цепью и легкой цепью или в пределах тяжелой цепи биспецифических антител, либо в одном, либо в обоих плечах. Такие обмены включают в себя, например, обмены VH-CH1 с VL-CL, VH с VL, CH3 с CL и CH3 с CH1, как описано в патентных публикациях № WO2009/080254, WO2009/080251, WO2009/018386 и WO2009/080252.

Можно использовать другие стратегии, такие как стимулирование гетеродимеризации тяжелых цепей с использованием электростатических взаимодействий путем введения замен положительно заряженных остатков на одной поверхности СН3 и отрицательно заряженных остатков на другой поверхности СН3, 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_F405A_Y407V/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.

Для получения биспецифических антител можно использовать технологию LUZ-Y. В этой технологии к С-концам доменов СНЗ присоединяют последовательность типа лейциновой застежки для контроля сборки гетеродимера из исходных мкАт, которую удаляют после очистки, как описано Wranik et al., (2012) J Biol Chem 287(52): 42221-9.

Для получения биспецифических антител можно использовать технологию SEEDbody. Для стимуляции гетеродимеризации антитела SEEDbody в своих константных доменах имеют замену выбранных остатков IgG остатками IgA, как описано в патенте США № US20070287170.

Биспецифические антитела, описанные в настоящем документе, можно получать *in vitro* в бесклеточной среде, вводя асимметричные мутации в области СНЗ двух моноспецифических гомодимерных антител и образуя биспецифическое гетеродимерное антитело из двух исходных моноспецифических гомодимерных антител в восстанавливающих условиях для обеспечения изомеризации дисульфидной связи, в соответствии со способами, описанными в международной патентной публикации № WO2011/131746). В способах первое моноспецифическое двухвалентное антитело (т.е. антитело, которое специфически связывается со вторым антигеном; например, антитело к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP) и второе моноспецифическое двухвалентное антитело (т.е. антитело к CD3) сконструированы так, чтобы иметь определенные замены в домене СНЗ, который способствует стабильности 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 вернуть к невозстанавливающим. Иллюстративные восстанавливающие агенты, которые могут применяться, представляют собой 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиозритритол (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (ТСЕР), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол. Например, можно использовать инкубирование в течение по меньшей мере 90 мин при температуре по меньшей мере 20°C 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.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, содержит по меньшей мере одну замену в константном домене СН3 антитела.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, по меньшей мере одна замена в константном домене СН3 антитела представляет собой замену K409R, F405L или F405L и R409K, где нумерация остатков соответствует индексу EU.

Домены антитела и нумерация являются хорошо известными. Термин «асимметричный» относится к неидентичным заменам в двух доменах СН3 в двух отдельных тяжелых цепях антитела. Область СН3 IgG1, как правило, состоит из остатков 341-446 на IgG1 (нумерация остатков соответствует каталогу EU).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изолипу IgG1 и содержит замену F405L в первой тяжелой цепи (НС1) антитела и замену K409R во второй тяжелой цепи (НС2) антитела по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изолипу IgG1 и содержит замену K409R в первой тяжелой цепи (НС1) антитела и замену F405L во второй тяжелой цепи (НС2) антитела по сравнению с IgG1 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело представляет собой изолипу IgG4 и содержит замену S228P в НС1 и замены S228P, F405L и R409K в НС2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изолипу IgG4 и содержит замены S228P, F405L и R409K в НС1 и замену S228P в НС2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изолипу IgG4 и содержит замены S228P, F234A и L235A в заменах НС1 и S228P, F234A, L235A, F405L и R409K в НС2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело относится к изолипу IgG4 и содержит замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K в НС1 и замены S228P, F234A и L235A в НС2 по сравнению с IgG4 дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь или восемь асимметричных замен в НС1 и НС2 в положениях остатков 350, 366, 368, 370, 399, 405, 407 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе,

биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну, две, три или четыре асимметричных замены в HC1 и HC2 в положениях остатков 350, 370, 405 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, биспецифическое антитело по изобретению содержит по меньшей мере одну асимметричную замену в HC1 и HC2 в положениях остатков 405 или 409, если нумерация остатков соответствует индексу EU.

Как правило, замены вводят в молекулу, например, в константный домен антитела, на уровне ДНК с помощью стандартных способов.

Антитела по изобретению могут быть сконструированы в виде разнообразных известных форм антител.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой кросс-тело (англ.: cross-body).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела по изобретению включают рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием, в которых 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.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные IgG-подобные молекулы с двойным нацеливанием включают молекулы (DT)-Ig с двойным нацеливанием (GSK/Domantis), антитело «два в одном» (Genentech) и mAb2 (F-Star).

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

В некоторых вариантах осуществления Fc-слитые молекулы включают слитые белки ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics).

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 (Biotecno) и Fab-Fv (UCB-Celltech). Антитела на основе ScFv, диател и доменные антитела включают 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), гибриды ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack), и COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), доменные антитела с двойным нацеливанием, имеющие только тяжелую цепь. Различные форматы биспецифических антител были описаны, например, в Chames and Baty (2009) *Curr Opin Drug Disc Dev* 12: 276 и в Nunez-Prado et al., (2015) *Drug Discovery Today* 20(5):588-594.

В таблице 2 приведены иллюстративные описанные в данном документе моноклональные антитела, которые можно использовать для создания биспецифических антител по изобретению.

Таблица 2. Иллюстративные моноклональные антитела, которые можно использовать для создания биспецифических антител по изобретению

Первый домен	Второй домен		
	анти-GITR	анти-CD33	анти-IL1RAP
анти-CD3			
CD3B312	PSMB87	C33B760	IAPB3
CD3B313	PSMB119	C33B777	IAPB9
CD3B314	PSMB120	C33B778	IAPB17
CD3B315	PSMB121	C33B782	IAPB23
CD3B316	PSMB122	C33B792	IAPB25
CD3B317	PSMB123	C33B799	IAPB29
CD3B337	PSMB124	C33B806	IAPB38
CD3B373	PSMB126	C33B830	IAPB47
CD3B376	PSMB127	C33B836	IAPB55
CD3B389	PSMB129	C33B903	IAPB57
CD3B450	PSMB130	C33B904	IAPB61
CD3B467	PSMB344	C33B905	IAPB62
	PSMB345	C33B907	IAPB63
	PSMB346	C33B908	IAPB64
	PSMB347		IAPB65
	PSMB349		
	PSMB358		
	PSMB359		
	PSMB360		
	PSMB361		
	PSMB362		
	PSMB363		
	PSMB365		

Иллюстративные антитела к TMEFF2, которые можно использовать для конструирования биспецифических молекул к TMEFF2×CD3, представляют собой антитела, описанные в настоящем документе, которые могут содержать

последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, включая, без ограничений, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепи, представленные в таблице 59, 66-68.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 представляет собой мультиспецифическое антитело, например, биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген. В некоторых вариантах осуществления второй или целевой антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффекторной клетки. В некоторых вариантах осуществления второй антиген представляет собой ТАА. Иллюстративные ТАА представляют собой PSMA, CD33, TMEFF2 и IL1RAP.

В изобретении предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно. В некоторых вариантах осуществления первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения при лечении клеточного пролиферативного расстройства.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения при лечении злокачественного новообразования.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически

связывает второй антиген по изобретению, для применения при лечении аутоиммунного заболевания.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения в производстве лекарственного препарата для лечения злокачественного новообразования.

В изобретении также предложено биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, для применения в производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунного расстройства.

Дополнительным аспектом изобретения является способ лечения клеточного пролиферативного расстройства, или аутоиммунного расстройства у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к CD3 по изобретению. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят субъекту в дозе от около 0,01 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят субъекту в дозе от около 0,1 мг/кг до около 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят субъекту в дозе около 1 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят подкожно, внутривенно, внутримышечно, местно, перорально, трансдермально, внутривентрикулярно, интратекально, интранизально. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят интратекально, интравентрикулярно или интраназально. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, вводят внутривенно.

В любом из предшествующих применений или способов клеточное пролиферативное расстройство представляет собой злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудка, рака тонкого кишечника, рака толстого кишечника, колоректального рака,

рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, неходжкинской лимфомы (НХЛ), В-клеточной лимфомы, В-клеточного лейкоза, множественной миеломы, рака почки, рака предстательной железы, рака печени, рака головы и шеи, меланомы, рака яичников, мезотелиомы, глиобластомы, В-клеточной карциномы, ДВКЛ из В-клеток герминативного центра (ГСВ), ДВКЛ из активированных В-клеток (АВС), фолликулярной лимфомы (ФЛ), мантийноклеточной лимфомы (МКЛ), острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), хронического лимфоидного лейкоза (ХЛЛ), лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), лимфоплазмочитарной лимфомы (ЛЛ), макроглобулинемии Вальденстрема (МВ), лимфомы центральной нервной системы (ХНЛ), лимфомы Беркитта (ЛБ), В-клеточного пролимфоцитарного лейкоза, лимфомы из клеток маргинальной зоны, лейкоза ворсистых клеток, лимфомы/лейкоза из клеток селезенки, не поддающегося классификации, диффузной мелкоклеточной В-клеточной лимфомы красной пульпы селезенки, варианта волосатоклеточного лейкоза, макроглобулинемии Вальденстрема, заболевания тяжелых цепей, плазмочелочной миеломы, солитарной плазмочитомы кости, экстраоссальной плазмочитомы, экстранодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (МАЛТ-лимфомы), нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, детской нодальной лимфомы из клеток маргинальной зоны, детской фолликулярной лимфомы, первичной кожной лимфомы из клеток фолликулярного центра, Т-клеточной/гистиоцитарной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, первичной ДВКЛ ЦНС, первичной кожной ДВКЛ, ножного типа, EBV-положительного ДВКЛ пожилых, ДВКЛ, ассоциированной с хроническим воспалением, лимфогранулематоза, первичной медиастинальной (тимусной) В-крупноклеточной лимфомы. Внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфомы, ALK-позитивной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, плазмобластной лимфомы, крупноклеточной В-клеточной лимфомы, возникающей при HHV8-ассоциированной многоочаговой болезни Кастанмана, первичной выпотной лимфомы: В-клеточной лимфомы, не поддающегося классификации, с признаками, промежуточными между диффузной В-крупноклеточной лимфомой и лимфомой Беркитта, и В-клеточной лимфомы, не поддающейся классификации, с признаками, промежуточными между диффузной В-крупноклеточной лимфомой, классической лимфомой Ходжкина, и амилоидоза легких цепей.

В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой аденокарциному, например, метастатическую аденокарциному (например, колоректальную аденокарциному, аденокарциному желудка или аденокарциному поджелудочной железы).

В любом из предшествующих применений или способов аутоиммунное расстройство может быть выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, системной красной волчанки (СКВ), болезни Вегенера, воспалительного заболевания кишечника, идиопатической

тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), тромботической тромбоцитопенической пурпуры (ТТП), аутоиммунной тромбоцитопении, рассеянного склероза, псориаза, IgA-нефропатии, IgM-полинейропатии, миастении гравис, васкулита, сахарного диабета, синдром Рейно, синдром Шегрена, гломерулонефрита, оптикомиелита (NMO), IgG -нейропатии.

В другом аспекте изобретение относится к набору, содержащему: (а) композицию, содержащую любое из предшествующих антител к CD3 или биспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению, и (b) листок-вкладыш в упаковке, содержащий инструкции по введению композиции субъекту для лечения или задержки прогрессирования клеточного пролиферативного расстройства. Термин «листок-вкладыш в упаковке» используется для обозначения инструкций, которые обычно вкладывают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов для продажи, содержащие информацию о показаниях, использовании, дозах, приеме, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или предупреждениях, которые касаются использования таких терапевтических продуктов.

В любом из предшествующих применений или способов субъектом может представлять собой человека.

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

Также описаны выделенные полинуклеотиды, которые кодируют антитела к CD3 по изобретению или биспецифические антитела, содержащие первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению. Выделенные полинуклеотиды, способные кодировать переменные домены, предложенные в настоящем документе, могут быть включены в одни и те же или разные векторы для получения антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды по изобретению включают полинуклеотид, кодирующий лидерную последовательность. Можно использовать любую лидерную последовательность, известную в данной области. Полинуклеотид, кодирующий лидерную последовательность, может включать сайт расщепления рестрикционной эндонуклеазы или сайт инициации трансляции.

Также предложены векторы, содержащие полинуклеотиды по изобретению. Векторы могут представлять собой экспрессионные векторы. Экспрессионный вектор может содержать одну или более дополнительных последовательностей, например, без ограничений, регуляторные последовательности (например, промотор, энхансер), маркер селекции и сигнал полиаденилирования. Векторы для трансформации широкого спектра клеток-хозяев широко известны, и к ним относятся, без ограничений, плазмиды, фагмиды, космиды, бакуловирусы, бакмиды, искусственные бактериальные хромосомы (BAC), искусственные дрожжевые хромосомы (YAC), а также другие бактериальные, дрожжевые и вирусные векторы.

К рекомбинантным векторам экспрессии, входящим в объем описания, относятся

синтетические или происходящие от кДНК фрагменты нуклеиновых кислот, которые кодируют по меньшей мере один рекомбинантный белок, который может быть функционально связан с приемлемыми регуляторными элементами. К таким регуляторным элементам могут относиться промотор транскрипции, последовательности, кодирующие приемлемые участки связывания мРНК с рибосомой, и последовательности, контролируемые терминацию транскрипции и трансляции. Экспрессионные векторы, особенно экспрессионные векторы млекопитающих, также могут включать в себя один или более нетранскрибируемых элементов, например точку начала репликации, приемлемый промотор и энхансер, связанные с экспрессируемым геном, другие 5' или 3' фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5' или 3' нетранслируемые последовательности (например, необходимые участки связывания с рибосомой), сайт полиаденилирования, донорный и акцепторный сайты сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Кроме того, может быть встроена точка начала репликации, обеспечивающая способность к репликации в клетке-хозяине.

Последовательности контроля транскрипции и трансляции в экспрессионных векторах, предназначенных для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Примеры векторов, которые можно сконструировать, описаны в публикации Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983).

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

Векторы, описанные в настоящем документе, могут содержать один или более участков внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезно для усиления экспрессии некоторых белков. В

некоторых вариантах осуществления векторная система может включать в себя один или более участков полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть шиты друг с другом или расположены так, чтобы обеспечить оптимальное разнесение в пространстве для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения «спейсерных» нуклеотидов между открытыми рамками считывания (ORF)), или расположены другим способом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены с возможностью обеспечения оптимального разнесения в пространстве для экспрессии.

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

Векторы, описанные в настоящем документе, можно использовать для трансформации различных клеток генами, кодирующими описанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты. Например, векторы можно использовать для создания антител к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP или клеток, продуцирующих антигенсвязывающий фрагмент. Таким образом, в изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая векторы по изобретению.

В данной области известны многочисленные способы внедрения в клетки чужеродных генов, и их можно использовать для конструирования рекомбинантных клеток в целях осуществления описанных способов в соответствии с различными вариантами осуществления, описанными и подтвержденными примерами в настоящем документе. Используемая методика должна обеспечивать стабильный перенос гетерологичной последовательности гена в клетку-хозяина таким образом, чтобы гетерологичная последовательность гена могла наследоваться и экспрессироваться потомством клетки, и таким образом, чтобы не нарушалось необходимое развитие и физиологические функции клеток-реципиентов. К методикам, которые можно использовать, относятся, без ограничений, перенос хромосом (например, слияние клеток, опосредованный хромосомами перенос генов, опосредованный микроклетками перенос генов), физические способы (например, трансфекция, слияние со сферопластом, микроинъекция, электропорация, липосомный носитель), вирусный перенос вектора (например, рекомбинантные ДНК-вирусы, рекомбинантные РНК-вирусы) и т. п. (описано

в публикации Cline, 29 Pharmac. Ther. 69-92 (1985)). Для трансформации клеток также можно применять кальций-фосфатную преципитацию и индуцированное полиэтиленгликолем (ПЭГ) слияние бактериальных протопластов с клетками млекопитающих.

К клеткам, подходящим для применения в экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, предпочтительно относятся эукариотические клетки, более предпочтительно клетки, происходящие от растения, грызуна или человека, например, без ограничений, клеточные линии NSO, CHO, CHO-K1, perC.6, Tk-ts13, ВНК, клетки НЕК293, COS-7, T98G, CV-1/EBNA, L-клетки, C127, 3T3, HeLa, NS1, миеломные клетки Sp2/0, ВНК и др. Кроме того, экспрессию антител можно осуществлять с применением гибридных клеток. Способы получения гибридом хорошо известны в данной области.

Клетки, трансформированные векторами экспрессии по изобретению, можно подвергнуть селекции или скринингу в отношении рекомбинантной экспрессии антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. Положительные по рекомбинации клетки размножают и проводят скрининг субклонов, проявляющих нужный фенотип, например высокий уровень экспрессии, усиленные характеристики роста или способность вырабатывать белки с нужными биохимическими свойствами, например, вследствие модификации белков или видоизмененных посттрансляционных модификаций. Эти фенотипы могут быть обусловлены внутренними свойствами данного субклона или мутацией. Мутации можно осуществлять путем применения химических агентов, УФ-света, радиации, вирусов, инсерционных мутагенов, ингибирования восстановления ошибок спаривания ДНК или комбинации таких способов.

Фармацевтические композиции/введение

В изобретении также предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Для терапевтического применения возможна подготовка антител по изобретению в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту, эксципиенту или несущей среде, с которыми вводят антитело настоящего изобретения. Такие несущие среды могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла минерального, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно применять 0,4%-й солевой раствор и 0,3%-й раствор глицина. Эти растворы стерильны и по существу не содержат твердых частиц. Их стерилизацию можно проводить с использованием общепринятых, хорошо известных способов стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как регулирующие рН и буферные агенты, стабилизирующие, загущающие, увлажняющие и окрашивающие

агенты и т. д. Концентрация антител по изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее около 0,5%, обычно по меньшей мере около 1% и до 15 или 20% вес., и может выбираться преимущественно на основании необходимой дозы, объемов текучей среды, значений вязкости и т. д. в соответствии с конкретным выбранным способом введения. Приемлемые несущие среды и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21-е издание, под ред. Troy, D.B., Lipincott Williams and Wilkins, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, 2006 г., часть 5, Pharmaceutical Manufacturing стр. 691-1092, см. особенно стр. 958-989.

Способом введения для терапевтического применения антител по изобретению может служить любой приемлемый путь доставки антитела в организм-хозяин, такой как парентеральное введение, например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, легочное, чресслизистое (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), в виде состава в таблетке, капсуле, растворе, порошке, геле, частице; и введение антитела, содержащегося в шприце, имплантированном устройстве, осмотическом насосе, картридже, микронасосе или же с помощью других средств, которые хорошо известны в данной области и очевидны для квалифицированного специалиста. Локализованное введение можно обеспечить, например, посредством доставки в опухоль, сустав, бронхи, брюшную полость, капсулу, хрящ, полость, мозжечок, желудочек мозга, толстую кишку, шейку матки, желудок, печень, миокард, кость, таз, перикард, полость живота, плевру, предстательную железу, легкие, прямую кишку, почку, сетчатку, позвоночник, суставную сумку, грудную клетку, матку, сосуд, внутрь мочевого пузыря, поврежденную ткань, вагинально, ректально, буккально, сублингвально, интраназально или трансдермально.

Антитела по изобретению можно вводить субъекту любым подходящим путем, например, парентерально путем внутривенной (в/в) инфузии или болюсной инъекции, внутримышечно, подкожно или внутрибрюшинно. Внутривенная инфузия может продолжаться, например, 15, 30, 60, 90, 120, 180 или 240 минут или от 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 часов.

Доза, вводимая субъекту, является достаточной для ослабления или, по меньшей мере, частичного торможения заболевания, лечение которого осуществляется («терапевтически эффективное количество»), и может иногда составлять от 0,005 мг до около 100 мг/кг, например, от около 0,05 мг до около 30 мг/кг, или от около 5 мг до около 25 мг/кг, или около 4 мг/кг, около 8 мг/кг, около 16 мг/кг или около 24 мг/кг, или, например, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг, но может быть даже выше, например, около 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг.

Также можно вводить фиксированную стандартную дозу, например, 50, 100, 200, 500 или 1000 мг, или доза может быть основана на площади поверхности тела пациента, например, 500, 400, 300, 250, 200 или 100 мг/м². Для лечения пациенту обычно можно вводить от 1 до 8 доз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8), но можно вводить и 9, 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более доз.

Введение антител по изобретению можно повторять через одни сутки, двое суток, трое суток, четверо суток, пять суток, шесть суток, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев или более. Также возможны повторные курсы лечения в виде длительного введения. Повторное введение можно проводить в той же дозе или в другой дозе. Например, описанные в данном документе антитела по изобретению можно вводить в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг с недельным интервалом в течение 8 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые две недели в течение дополнительных 16 недель с последующим введением в дозе 8 мг/кг или 16 мг/кг каждые четыре недели путем внутривенной инфузии.

Например, антитела в способах, описанных в настоящем документе, могут быть предоставлены в виде суточной дозы в количестве около 0,1-100 мг/кг, например, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/кг в сутки, по меньшей мере в одни из суток 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 или альтернативно по меньшей мере в одну из недель 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 после начала лечения или в любой их комбинации с применением одной или разделенных доз каждые 24, 12, 8, 6, 4 или 2 часа, или в любой их комбинации.

Антитела в способах, описанных в настоящем документе, также можно вводить профилактически, чтобы снизить риск развития злокачественного новообразования, замедлить начало развития событий при прогрессировании злокачественного новообразования и/или снизить риск рецидива в случае ремиссии злокачественного новообразования.

Предложенные в данном документе антитела могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Было показано, что эта методика эффективна для стандартных белковых препаратов и можно использовать хорошо - известные методики лиофилизации и восстановления.

Способы обнаружения CD3, PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или целевого антигена и CD3

В данном документе предложены способы обнаружения CD3, PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP в образце, включающие получение образца, приведение образца в контакт с антителом к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP по изобретению и обнаружение антитела, связанного с CD3, PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP в образце.

Дополнительно предложены способы обнаружения CD3 и второго антигена (например, PSMA, CD33, TMEFF2 или IL1RAP) в образце, включающие получение образца, приведение образца в контакт с биспецифическим антителом, содержащим первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, и обнаружение антитела, связанного с CD3 и

вторым антигеном в образце.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, образец можно получать из мочи, крови, сыворотки, плазмы, слюны, асцитной жидкости, циркулирующих клеток, циркулирующих опухолевых клеток, клеток, не связанных с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически иссеченной ткани опухоли, биоптатов, включая полученные с помощью тонкоигольной аспирационной биопсии), гистологических препаратов и т. п.

Антитела изобретения могут быть обнаружены с использованием известных способов. Примеры способов включают в себя прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиоактивных меток или присоединение к антителам по изобретению легко обнаруживаемой функциональной группы, такой как биотин, ферменты или эпитопные метки. Примерами меток и функциональных групп являются рутений, ^{111}In -DOTA, ^{111}In -диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (HIS-метка), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Предложенные в настоящем документе антитела могут быть использованы в различных анализах для обнаружения CD3, PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 или CD3 и второго антигена в образце. Примерами анализов являются анализ методом вестерн-блоттинга, радиоиммунологический анализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, электрохемилюминесцентный (ECL) иммуноанализ, иммуногистохимический анализ, сортировка флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или твердофазный ИФА.

Наборы антител

В изобретении также предложен набор, содержащий одно или более из антител к CD3, к PSMA, к CD33, к TMEFF2 или к IL1RAP, или биспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген по изобретению или его антигенсвязывающие фрагменты. Описанные наборы можно использовать для осуществления способов применения антител к CD3, к PSMA, к CD33, антител к TMEFF2 или к IL1RAP, или биспецифических антител, содержащих первый домен, который специфически связывается с CD3, и второй домен, который специфически связывается со вторым антигеном по изобретению, или других способов, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления описанные наборы могут содержать антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, и реагенты, предназначенные для применения в обнаружении присутствия CD3 или второго антигена, такого как PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2, в биологическом образце. Соответственно, описанные наборы могут содержать одно или более антител, или его(их) антигенсвязывающий(-ые) фрагмент(-ы), описанный(-ые) в настоящем документе, и сосуд

для хранения антитела или фрагмента, когда они не применяются, инструкции по применению антитела или фрагмента, антитело или фрагмент, иммобилизованные на твердой подложке, и/или меченые с возможностью обнаружения формы антитела или фрагмента, как описано в настоящем документе.

В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает PSMA. В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает CD33. В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает IL1RAP. В изобретении также предложен набор, содержащий описанное в настоящем документе антитело, которое специфически связывает TMEFF2.

Набор можно применять для терапевтических областей применения и в виде диагностических наборов.

Набор можно применять для обнаружения присутствия CD3, PSMA, CD33, IL1RAP, TMEFF2 и/или второго антигена в биологическом образце.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, описанное в настоящем документе, и реактивы для обнаружения антитела. Набор может содержать один или более из других элементов: инструкцию по применению; другие реагенты, например метку, терапевтический агент или агент, используемый для хелатирования или иного сочетания, антитело для мечения, или терапевтический агент, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для подготовки антитела к введению; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антитело по изобретению, находящееся в контейнере, и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антитело в наборе является меченым.

CD3-специфические антитела

В настоящем документе описаны выделенные антитела к CD3. Антитела к CD3 по изобретению связывают CD3 человека и необязательно CD3 яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD3 по изобретению и их фрагменты связывают CD3 человека и яванского макака с аффинностями в пределах 5 раз относительно друг друга. Другими словами, кратность разницы в связывании антител равна менее 5. В этом случае антитело к CD3 по изобретению можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля CD3 у приматов, так и в качестве лекарственного средства для людей. Другими словами, одна и та же CD3-специфическая молекула может применяться в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях с участием людей. Эта перекрестная реактивность между человеком и макаком приводит к очень сопоставимым результатам и значительно более высокой прогностической способности исследований на животных по сравнению с видоспецифическими суррогатными молекулами. В некоторых

вариантах осуществления антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению связывают эпитоп, образованный субъединицами CD3 ϵ /d. CD3-специфические антитела могут быть человеческими, гуманизированными или химерными. В качестве примера в настоящем документе также приводятся человеческие антитела, полученные в OmniRat (Open Monoclonal Technologies («ОМТ»), г. Пало-Альто, штат Калифорния, США, omniab.com).

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антитело к CD3 или его фрагмент имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а) связывает CD3⁺ Т-лимфоциты человека и *Mасаса fascicularis* с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Mасаса fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3⁺ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Mасаса fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии;

б) связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691) или связывает рекомбинантный CD3 ϵ от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3 ϵ от *Mасаса fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации (K_D) 12 нМ или менее, причем K_D измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °C;

с) демонстрирует отсутствие окисления метионина или триптофана, или отсутствие деамидирования аспарагина, или демонстрирует отсутствие изомеризации аспарагина по результатам анализа методом пептидного картирования;

д) связывает остатки 1-6 CD3 ϵ при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

е) активирует Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

Антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению имеют аффинность связывания *in vitro* (K_d) с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3 человека, которая составляет от около 5 нМ до около 1000 нМ, предпочтительно от около 5 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ и от около 900 нМ до около 1000 нМ, более предпочтительно от около 5 нМ до около 300 нМ при определении с помощью проточной цитометрии.

В некоторых аспектах антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению представляют собой двухвалентные антитела, имеющие аффинность связывания *in vitro* (K_d) с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3 человека, которая составляет от около 5 нМ до около 1000 нМ, предпочтительно от около 5 нМ до около 50 нМ, от

около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ и от около 900 нМ до около 1000 нМ, более предпочтительно от около 5 нМ до около 300 нМ, наиболее предпочтительно около 100 нМ при определении с помощью проточной цитометрии.

В некоторых аспектах антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению представляют собой одновалентные конструкторы, имеющие аффинность связывания *in vitro* (K_d) с человеческими Т-клетками, экспрессирующими CD3 человека, которая составляет от около 5 нМ до около 1000 нМ, предпочтительно от около 5 нМ до около 50 нМ, от около 50 нМ до около 100 нМ, от около 100 нМ до около 200 нМ, от около 200 нМ до около 300 нМ, от около 300 нМ до около 400 нМ, от около 400 нМ до около 500 нМ, от около 500 нМ до около 600 нМ, от около 600 нМ до около 700 нМ, от около 700 нМ до около 800 нМ, от около 800 нМ до около 900 нМ и от около 900 нМ до около 1000 нМ, более предпочтительно от около 100 нМ до около 250 нМ, наиболее предпочтительно около 250 нМ при определении с помощью проточной цитометрии.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты, описанные в настоящем документе, конкурируют с коммерческим антителом к CD3 SP34-2 (BD Biosciences 551916) за связывание с CD3, как определено с помощью анализа конкурентного связывания с использованием конъюгированного с AlexaFluor 488 антитела SP34-2 на первичных человеческих Т-клетках при измерении с помощью проточной цитометрии.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты не демонстрируют посттрансляционной модификации, включая отсутствие окисления, отсутствие деамидирования и отсутствие изомеризации аспартата при определении методом пептидного картирования.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты эффективны для активации Т-клеток и индуцирования экспрессии CD69 в той же степени, что и SP34-2, в Т-клетках человека и яванского макака и сОКТ3 в Т-клетках человека, при определении посредством Т-клеточного анализа с использованием проточной цитометрии.

В одном аспекте антитела к CD3 и их фрагменты, описанные в настоящем документе, имеют общую энтальпию разворачивания около 400 ккал/моль или более, около 410 ккал/моль или более, около 420 ккал/моль или более, около 430 ккал/моль или более, около 440 ккал/моль или более, около 45 ккал/моль или более, около 460 ккал/моль или более, около 470 ккал/моль или более, около 480 ккал/моль или более, около 490 ккал/моль или более, около 500 ккал/моль или более, около 510 ккал/моль или более, около 520 ккал/моль или более, около 530 ккал/моль или более, около 540 ккал/моль или более или около 550 ккал/моль или более. В определенных аспектах антитела к CD3 и их фрагменты по изобретению имеют общую энтальпию разворачивания около 418 ккал/моль, 545 ккал/моль, около 402 ккал/моль или около 406 ккал/моль, а антитела к CD3 представляют собой молекулы CD3B376 (IgG4 PAA), CD3B450 (IgG4 PAA), CD3B389

(IgG1sigma) и CD3B467 (IgG1sigma), соответственно.

Примеры таких антител включают CD3B311, CD3B312, CD3B313, CD3B314, CD3B315, CD3B316, CD3B317, CD3B334, CD3B376 CD3B389, CD3B450 и CD3B467, и CD3B376 и CD3B450, сконструированные в одновалентный формат.

Антитела к CD3 или антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут присутствовать в различных формах, но будут содержать один или более сегментов переменного домена или CDR антитела, приведенных в таблице 7А, и их сконструированных вариантов, например, приведенных или описанных в таблице 9 и таблице 10, и в сопровождающих их описаниях.

В изобретении также предложено антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 любого из антител, описанных в таблице 7В. В изобретении также предложено антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 любого из антител, описанных в таблице 7В, и легкую цепь, содержащую LCDR1, а LCDR2 и LCDR3 любого из антител, описанных в таблице 7В. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению конкурирует за связывание с CD3 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, содержащим тяжелую цепь, содержащую HCDR1, HCDR2 и HCDR3 любого из антител, описанных в таблице 7В, и легкую цепь, содержащую LCDR1, LCDR2 и LCDR3 любого из антител, описанных в таблице 7В.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в переменной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 651, 652, 653, 654, 655, 687 или 656, при этом HCDR1, HCDR2 и HCDR3 определены по Chothia, Kabat или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в переменной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 658, 659, 694, 660, 688, или 661, при этом LCDR1, LCDR2 и LCDR3 определены по Chothia, Kabat или IMGT.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 662, 665, или 666;
HCDR2 с SEQ ID NO: 663, 689, или 695; и
HCDR3 с SEQ ID NO: 664.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит

LCDR1 с SEQ ID NO: 773, 710, 674 или 671;
LCDR2 с SEQ ID NO: 669 или 673; и
LCDR3 с SEQ ID NO: 670.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его

антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит

HCDR1 с SEQ ID NO: 662, 665, или 666;

HCDR2 с SEQ ID NO: 663, 689, или 695;

HCDR3 с SEQ ID NO: 664;

LCDR1 с SEQ ID NO: 773, 710, 674 или 671;

LCDR2 с SEQ ID NO: 669 или 673; и

LCDR3 с SEQ ID NO: 670.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 с

SEQ ID NO: 662, 663, и 664, соответственно;

SEQ ID NO: 662, 695, и 664, соответственно;

SEQ ID NO: 665, 663, и 664, соответственно;

SEQ ID NO: 665, 695 и 664, соответственно;

SEQ ID NO: 662, 689, и 664, соответственно;

SEQ ID NO: 666, 663, и 664, соответственно;

SEQ ID NO: 666, 695, и 664, соответственно

SEQ ID NO: 665, 689, и 664, соответственно; или

SEQ ID NO: 666, 689, 664, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 773, 669, и 670, соответственно;

SEQ ID NO: 773, 673, и 670, соответственно;

SEQ ID NO: 710, 673, и 670, соответственно;

SEQ ID NO: 674, 673, и 670, соответственно;

SEQ ID NO: 671, 673, и 690, соответственно;

SEQ ID NO: 773, 673, и 690, соответственно;

SEQ ID NO: 671, 669, и 670, соответственно; или

SEQ ID NO: 776, 673, и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 669, и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 669, и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 663, 664, 773, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 663, 664, 776, 669 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 663, 664, 671, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 695, 664, 773, 669 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 695, 664, 773, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 695, 664, 671, 669 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 666, 695, 664, 671, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 689, 664, 671, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 710, 673 и 670, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит последовательность тяжелой цепи (HC) с SEQ ID NO: 709, 640, 641, 642, 643, 675 или 644 и/или последовательность легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 645, 716, 649, 676, 677, или 650. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HC, 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: 709, 640, 641, 642, 643, 675 или 644,

и LC, 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: 645, 716, 649, 676, 677 или 650. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит HC, 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: 709, 640, 641, 642, 643, 675 или 644, и LC, 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: 645, 716, 649, 676, 677 или 650, причем изменение последовательности не происходит в области CDR.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 651, 652, 657, 653, 654, 655, 687 или 656, и/или последовательность вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 658, 659, 694, 660, 688, 678 или 661. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит VH, 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: 651, 652, 657, 653, 654, 655, 687 или 656, и VL, 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 658, 659, 694, 660, 688, 678 или 661. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит VH, 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: 651, 652, 657, 653, 654, 655, 687, или 656, и VL, 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: 658, 659, 694, 660, 688, 678, или 661, причем изменение последовательности не происходит в области CDR.

PSMA-специфические антитела

Антитела и их фрагменты, которые связываются с PSMA, связываются с целевым антигеном шимпанзе. В одном варианте осуществления антитела и их фрагменты связываются с целевыми антигенами PSMA человека и макака с аффинностями в пределах 5 раз относительно друг друга. Другими словами, кратность разницы в связывании антител равна менее 5. В этом случае идентичную молекулу антитела можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля PSMA у приматов, так и в качестве лекарственного средства для людей. Другими словами, одна и та же PSMA-специфическая молекула может применяться в

доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях с участием людей. Это приводит к очень сопоставимым результатам и значительно более высокой прогностической способности исследований на животных по сравнению с видоспецифическими суррогатными молекулами. Поскольку домен PSMA обладает межвидовой специфичностью, то есть реагирует с антигенами человека и макака, антитело или его фрагменты по изобретению можно использовать как для доклинической оценки безопасности, активности и/или фармакокинетического профиля этих связывающих доменов у приматов, так и - в идентичной форме - как лекарственное средство для людей.

В настоящем изобретении также предложены мультиспецифические антитела, которые специфически связываются с PSMA. Согласно изобретению биспецифическое, то есть бифункциональное, антитело можно использовать для воздействия на две разные терапевтические мишени или для выполнения двух разных функций. Такие антитела можно использовать, например, для рекрутирования иммунной эффекторной клетки, например, Т- или NK-клетки, к конкретной клетке-мишени. Известны и исследуются различные молекулы на основе фрагментов антител, например, для лечения злокачественного новообразования.

В настоящем изобретении также предложено биспецифическое антитело к PSMA×«эффекторному антигену». В одном варианте осуществления эффекторный антиген для биспецифического антитела к PSMA×«эффекторному антигену» представляет собой CD3. В настоящем изобретении было обнаружено, что можно получить биспецифическое антитело к PSMA×CD3, в котором идентичная молекула может быть использована в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях и даже в терапии у людей. Это связано с идентификацией биспецифического антитела к PSMA×CD3, которое, помимо связывания с PSMA человека и CD3 человека, соответственно, также связывается с гомологами антигенов шимпанзе и макака. Биспецифическое антитело к PSMA×CD3 по изобретению можно использовать в качестве терапевтического агента против различных заболеваний, включая, но не ограничиваясь, злокачественное новообразование. Ввиду вышеизложенного отпадает необходимость в конструировании суррогатного целевого биспецифического антитела к PSMA×CD3 для тестирования на филогенетически далеких (от человека) видах. В результате идентичная молекула может использоваться в доклинических исследованиях на животных, поскольку предназначена для введения людям в клинических испытаниях, а также после регистрации и одобрения Управлением по контролю за изделиями медицинского назначения.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в данном документе, выделенное антитело или его фрагмент антитела, которое специфически связывает PSMA, имеет одно, два, три, четыре или пять из следующих свойств:

а. связывает внеклеточный домен (BKД) PSMA Pan troglodytes с равновесной константой диссоциации (K_D) 25 нМ или менее, при этом K_D измеряется с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °С,

b. связывает клетки LNCaP с расчетной EC50 20 нМ или менее и связывает клетки HEK, экспрессирующие PSMA *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 40 нМ или менее, при этом разница в расчетных EC50 между связыванием клеток LNCaP и связыванием клеток HEK, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°C с использованием проточной цитометрии,

c. связывает ВКД рекомбинантного PSMA от человека (SEQ ID NO: 55), Pan troglodytes (SEQ ID NO: 52) и *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 53) с равновесной константой диссоциации (K_D) 12 нМ или менее, при этом K_D измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25°C;

d. демонстрирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток LNCaP, клеток C42, клеток HEK, экспрессирующих PSMA человека, или клеток HEK, экспрессирующих PSMA *Macaca fascicularis*, при объединении в пару биспецифического антитела с антителом к CD3, при этом опосредованное Т-клетками уничтожение измеряется по высвобождению хрома-51 или при помощи анализа активации каспазы 3/7, или

e. распознает конформационный эпитоп, при этом эпитоп состоит из остатков I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326 PSMA человека (SEQ ID NO: 51)

Примеры таких антител или их фрагментов представляют собой антитела к PSMA PSMB119, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB87, PSMB126, PSMB127, PSMB128, PSMB129, PSMB130, PSMB120, PSMB121, PSMB122, PSMB123, PSMB127, PSMB128, PSMB130, PSMB344, PSMB345, PSMB346, PSMB347, PSMB349, PSMB358, PSMB359, PSMB360, PSMB361, PSMB362, PSMB363, и PSMB365, описанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 56, 57, 58, 59, 60, и 61, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 60, и 66, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 67, 68, 69, 70, 71 и 72, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 73, 74, 75, 76, 60, и 61,

соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82, и 83, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 84, 85, 86, 87, 60, и 88, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 89, 90, 91, 92, 93, и 94, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанного в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 95, 96, 97, 65, 60, и 66, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 84, 98, 99, 100, 82, и 101, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 89, 90, 102, 103, 104, и 105, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 89, 90, 106, 103, 104, и 105, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 107, 108, 109, 76, 60 и 88, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 1, 80, 81, 82 и 83, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 1, 80, 81, 82 и 83,

соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 683, 80, 81, 792 и 686, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA, по изобретению, содержит переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 6, 7, 8, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 121, 123, 125, 126, 128, 130 или 681. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в данном документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит переменную область легкой цепи (VL) SEQ ID NO: 9, 111, 113, 115, 117, 119, 122, 124, 127, 129, 131, или 682.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в настоящем документе, антитело, которое специфически связывает PSMA, по изобретению, содержит последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 12, 13, 132, 134, 136, 138, 140, 141, 143, 145, 146, 148, 150, 151, или 679.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в данном документе, антитело, которое специфически связывает PSMA по изобретению, содержит последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 14, 15, 75, 133, 135, 137, 139, 142, 144, 147, 149 или 680.

CD33-специфические антитела

CD33-специфические антитела согласно настоящему 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.

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. Полноразмерный человеческий CD33 представлен компанией Uniprot P20138 (SEQ ID NO: 244).

В контексте настоящего документа антитело, которое «специфически связывается с CD33», относится к антителу, которое связывается с CD33, предпочтительно с CD33 человека, предпочтительно с C2-доменом CD33, с $KD 1 \times 10^{-7}$ 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.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут содержать одну или более CDR антитела, как показано в таблице 39 и 40.

В настоящем документе описаны рекомбинантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD33. В некоторых вариантах осуществления CD33-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя CD33-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 39. В некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 39, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 40.

В некоторых вариантах осуществления предложено CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, приведенную в таблице 38. В некоторых вариантах осуществления предложено CD33-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область легкой цепи, приведенную в таблице 38.

Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи антител, обсуждаемых в этом разделе и приведенных в таблице 38, подходят для включения в биспецифические конструкторы. Например, в некоторых вариантах осуществления биспецифических антител к CD33, эффекторное плечо представляет собой плечо к CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33xCD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 670, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33xCD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33xCD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33xCD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 670, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33xCD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к CD33xCD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления 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:267, 260, 275, 270, 262, 258, 257, 281, 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: 287, 314, 309, 301, 298, 297, 290, 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.

IL1RAP-специфические антитела

Используемые в настоящем документе термины «аксессуарный белок рецептора интерлейкина-1», «IL1RAP» и «IL1-RAP» конкретно включают человеческий белок IL1RAP (SEQ ID NO:576), например, как описывается в каталоге Genbank под номером доступа AAB84059, эталонная последовательность NCBI: NP_002173.1 и UniProtKB/учетный номер Swiss-Prot Q9NPH3-1 (см. также Huang et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (24), 12829-12832). В научной литературе IL1RAP также известен как IL1 R3, C3orf13, FLJ37788, IL-1 RAcP и EG3556.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, могут иметь различные формы, но будут включать в себя одну или более CDR антитела, как показано в таблице 29.

В настоящем документе описаны рекомбинантные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, специфически связывающиеся с IL1RAP. В некоторых вариантах осуществления IL1RAP-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты представляют собой человеческий IgG или его производные. Хотя IL1RAP-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера в настоящем документе, являются человеческими, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, приведенные в качестве примера, можно подвергнуть химеризации.

В некоторых вариантах осуществления предлагается IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 29. В некоторых вариантах осуществления предлагается IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее тяжелую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 29, и легкую цепь, содержащую CDR1, CDR2 и CDR3 любого одного из антител, описанных в таблице 29.

В некоторых вариантах осуществления предложено IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи любого из антител, приведенных в таблице 30. В некоторых вариантах осуществления предложено IL1RAP-специфическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи любого из антител, приведенных в таблице 30. В некоторых вариантах осуществления

предложено IL1RAP-специфическое антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи по любому одному из антител, приведенных в таблице 30.

Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антител, обсуждаемых в этом разделе и приведенных в таблице 30, подходят для включения в биспецифические конструкторы, в которых нацеливающее плечо представляет собой плечо к IL1RAP. Например, в некоторых вариантах осуществления биспецифических антител к IL1RAP, эффекторное плечо представляет собой плечо к CD3. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAPxCD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 670, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAPxCD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAPxCD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAPxCD3, плечо к CD3 содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673, и 670, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAPxCD3, плечо к CD3 содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно. В некоторых вариантах осуществления биспецифического антитела к IL1RAPxCD3, плечо к CD3 содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

TMEFF2-специфические антитела

В изобретении предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью с SEQ ID NO: 629 TMEFF2. Антитела к TMEFF2 по изобретению, которые связывают мембранную проксимальную область TMEFF2, не интернализируются клетками. Не желая связывать себя какой-либо конкретной теорией, можно ожидать, что неинтернализирующие антитела к TMEFF2 имеют повышенный онкогенный эффект, опосредованный эффекторными функциями антитела, в результате отсутствия интернализации и деградации TMEFF2 по сравнению с интернализирующими антителами к TMEFF2.

«Связывается с мембранной проксимальной областью» означает, что 90% остатков эпитопа антитела, идентифицированных с использованием водород-дейтериевого обмена (H/D обмен), находятся в мембранной проксимальной области TMEFF2. Остатки эпитопа представляют собой те, которые защищены тестируемым антителом за счет разницы в уровнях дейтерирования в по меньшей мере 5% посредством H/D обмена. Примерами таких антител являются TMEB675, TMEB570, TMEB674, TMEB565, TMEB762 и TMEB757, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC

(SEQ ID NO: 592) или DAGYTGQHCSEKKDYSVL (SEQ ID NO: 600) с мембранной проксимальной областью TMEFF2. Иллюстративное связывание антитела к TMEFF2 в пределах остатков HGKCEHSINMQEPSC (SEQ ID NO: 592) представляет собой TMEB570. Иллюстративное связывание антитела к TMEFF2 в пределах остатков DAGYTGQHCSEKKDYSVL (SEQ ID NO: 600) представляет собой TMEB675. Ожидается, что варианты TNEB675 TMEB762 и TMEB757 будут связываться с мембранной проксимальной областью TMEFF2 в пределах остатков DAGYTGQHCSEKKDYSVL (SEQ ID NO: 600).

При анализе Н/Д обмена ВКД рекомбинантно экспрессированного TMEFF2 инкубируют в присутствии или в отсутствие антитела в дейтерированной воде в течение предварительно заданных периодов времени, что приводит к включению дейтерия в обмениваемые атомы водорода, не защищенные антителом, с последующим расщеплением белка протеазой и анализом пептидных фрагментов с использованием методом ЖХ-МС. Анализ Н/Д обмена можно проводить с использованием известных протоколов. Иллюстративный протокол описан в примере 5.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607, или VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

Конкуренцию за связывание исследуемого антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 и эталонного антитела можно анализировать *in vitro* с использованием хорошо известных способов. Например, связывание меченого сложным эфиром NHS MSD Sulfo-TagTM исследуемого антитела с мембранной проксимальной областью TMEFF2 в присутствии немеченого эталонного антитела можно оценить при помощи анализов методом твердофазного ИФА, или Bioacore или при помощи проточной цитометрии могут быть использованы для демонстрации конкуренции. Исследуемое антитело конкурирует за связывание с TMEFF2 с эталонным антителом, если исследуемое антитело ингибирует связывание эталонного антитела с проксимальной мембранной областью TMEFF2 на 85% или более, например, на 90% или более, или 95% или более.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22, соответственно;

SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21 и 23 соответственно;

SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24, соответственно;

SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22, соответственно; или

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с равновесной константой диссоциации (K_D) около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

Аффинность антитела к мембранной проксимальной области TMEFF2 может быть определена экспериментально с использованием любого подходящего способа. Иллюстративный способ включает применение оборудования ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, твердофазный иммуносорбентный ферментный анализ (ИФА) или анализы конкурентного связывания, известные специалистам в данной области. Измеренное значение аффинности антитела к TMEFF2 может изменяться при измерении в различных условиях (например, осмолярности, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D , K_{on} , и K_{off}), как правило, выполняют в стандартизированных условиях и с применением стандартизированного буферного раствора, такого как буферный раствор, описанный в настоящем документе. Специалистам в данной области будет понятно, что внутренняя ошибка измерений аффинности, например, с применением Biacore 3000 или ProteOn (измеряемая как стандартное отклонение, CO), как правило, для измерений может находиться в пределах 5-33%, оказываясь в границах типичных пределов обнаружения. Следовательно, термин «около» в отношении значения K_D характеризует типичное стандартное отклонение в анализе. Например, типичное СОС для K_D , равной 1×10^{-9} М, составляет до $\pm 0,33 \times 10^{-9}$ М.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас области тяжелой цепи (VH), полученный из VH3_3-23 (SEQ ID NO: 53) или VH1_1-69 (SEQ ID NO: 54).

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас вариабельной области легкой цепи (VL), полученный из VKI_L11 (SEQ ID NO: 55) или VKIII_A27 (SEQ ID NO: 591).

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас VH и каркас VL, полученный из VH3_3-23 с SEQ ID NO: 53 и VKI_L11 с SEQ ID NO: 55, соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной

областью TMEFF2, содержащей каркас VH и каркас VL, полученный из VH1_1-69 SEQ ID NO: 54 и VKIII_A27 с SEQ ID NO: 591, соответственно.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с мембранной проксимальной областью TMEFF2, содержащей каркас VH и каркас VL, полученный из VH1_1-69 SEQ ID NO: 54 и VKI_L11 с SEQ ID NO: 55, соответственно.

Антитела, содержащие переменные области тяжелой или легкой цепи, «полученные из» конкретной последовательности каркаса или зародышевой линии, относятся к антителам, полученным из системы, которая использует гены иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, например, от трансгенных мышей, крыс или кур, или из библиотек фагового дисплея, как обсуждается в данном документе. Антитело, содержащее конкретный каркас, полученную из последовательности зародышевой линии, может содержать аминокислотные различия по сравнению с последовательностью, из которой оно было получено, из-за, например, естественно возникающих соматических мутаций или намеренно введенных замен.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 39, и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 42.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 32 и LC с SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 46, и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 49.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21 и 23, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 40, и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 43.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 33 и LC с SEQ ID NO: 36.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 47, и LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 50.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 30.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 41, и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 44.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 34 и LC с SEQ ID NO: 37.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 48, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 51.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 40, и VL кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 33 и LC с SEQ ID NO: 38.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 47, и LC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 590.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 618, а VL кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 619.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 614 и LC с SEQ ID NO: 615.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 620, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 621.

В изобретении также предложено выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

В некоторых вариантах осуществления VH кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 622, а VL кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную

последовательность с SEQ ID NO: 623.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC с SEQ ID NO: 616 и LC с SEQ ID NO: 617.

В некоторых вариантах осуществления HC кодируется полинуклеотидом с SEQ ID NO: 624, а LC кодируется полинуклеотидом, содержащим полинуклеотидную последовательность с SEQ ID NO: 625.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой биспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает Т-клеточный антиген.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает CD3-эпсилон.

Последовательности VH, VL, HCDR, LCDR, HC и LC иллюстративных антител к TMEFF2 по настоящему изобретению показаны в **таблицах 60-67**.

Хотя варианты осуществления, проиллюстрированные в примерах, включают пары переменных доменов, одну из тяжелой цепи и одну из легкой цепи, специалисту в данной области техники будет понятно, что альтернативные варианты осуществления могут включать одиночные переменные домены тяжелой или легкой цепи. Одиночный переменный домен можно использовать для скрининга переменных доменов, способных образовывать двухдоменный специфический антигенсвязывающий фрагмент, способный связываться с TMEFF2. Скрининг можно проводить посредством скрининга фагового дисплея, например, с применением иерархического двойного комбинаторного подхода, раскрытого в международной патентной публикации № WO1992/01047. Согласно этому подходу отдельную колонию, содержащую клон либо с VH-, либо с VL-цепью, применяют для инфицирования полной библиотеки клонов, кодирующих другую цепь (VL или VH), и полученный двухцепочечный специфичный антигенсвязывающий домен отбирают в соответствии с методиками фагового дисплея, применяя известные способы и способы, описанные в настоящем документе. Следовательно, отдельные полипептидные цепи VH и VL можно использовать для идентификации дополнительных антител к TMEFF2 с использованием способов, раскрытых в международной патентной заявке № WO1992/01047.

Биспецифические антитела к TMEFF2/CD3

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, причем антитело связывается с мембранной проксимальной мембранной TMEFF2. Не желая

ограничиваться какой-либо конкретной теорией, биспецифические антитела, которые связываются с мембранной проксимальной областью TMEFF2, могут быть более эффективными в опосредованном Т-клетками уничтожении опухолевых клеток.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом антитело конкурирует за связывание с мембранной проксимальной областью TMEFF2 с эталонным антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 25 и переменную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 28, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29, VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30, VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31, VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607, или VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мембранную проксимальную область TMEFF2 с константой диссоциации (K_D) около $0,4 \times 10^{-9}$ М или менее, при этом K_D измеряют методом поверхностного плазмонного резонанса в ацетатном буфере при pH 4,5-5,0 при комнатной температуре.

В некоторых вариантах осуществления выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент связывает мембранную проксимальную область TMEFF2 с K_D от около $0,1 \times 10^{-10}$ М до около $0,4 \times 10^{-9}$ М.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22, соответственно;

SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21 и 23, соответственно;

SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24, соответственно; о

SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22, соответственно; или

SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603, соответственно.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом первый домен содержит

VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28;

VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29;

VH с SEQ ID NO: 27 и VL с SEQ ID NO: 30;

VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31;

VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607; или

VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, при этом второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661.

В некоторых вариантах осуществления второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 658.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 22, соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 25 и VL с SEQ ID NO: 28, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 32, LC1 с SEQ ID NO: 35, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585, 16, 19, 21, и 23, соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 29, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678, и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 36, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к

TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 586, 17, 18, 588 и 24, соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 30, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 27 и VL SEQ ID NO: 30, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678, и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 34, LC1 с SEQ ID NO: 37, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 583, 585, 16, 18, 588 и 22, соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 589 и VL с SEQ ID NO: 31, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 33, LC1 с SEQ ID NO: 38, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603, соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 604 и VL с SEQ ID NO: 607, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 614, LC1 с SEQ ID NO: 615, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 614, LC1 с SEQ ID NO: 615, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

В изобретении также предложено выделенное биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее первый домен, который связывает TMEFF2, и второй домен, который связывает CD3, при этом

первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 582, 584, 587, 18, 588 и 603, соответственно, а второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661;

первый домен содержит VH с SEQ ID NO: 612 и VL с SEQ ID NO: 613, и второй домен содержит VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678; и/или

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 616, LC1 с SEQ ID NO: 617, HC2 с SEQ ID NO: 640 и LC2 с SEQ ID NO: 676;

биспецифическое антитело к TMEFF2/CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит HC1 с SEQ ID NO: 616, LC1 с SEQ ID NO: 617, HC2 с SEQ ID NO: 675 и LC2 с SEQ ID NO: 677.

Варианты осуществления:

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

1. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

а) тяжелую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR), содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR), содержащую SEQ ID NO: 671, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690;

б) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 652, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 661;

с) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 640, и легкую цепь, содержащую SEQ ID

NO: 676;

d) тяжелую цепь, содержащую HCDR1, содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую LCDR1, содержащую SEQ ID NO: 773, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690;

e) переменную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 657, и переменную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 678; или

f) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 675, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 678.

2. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD3d, или CD3e, или CD3e и CD3d *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью связывания около 300 нМ или менее.

3. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2, в котором аффинность связывания составляет около 100 нМ или менее.

4. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 2 или 3, в котором аффинность связывания измеряют с помощью проточной цитометрии или анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °С.

5. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет одно, два, три или четыре из следующих свойств:

a) связывает CD3+ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 300 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 300 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3+ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°С с использованием проточной цитометрии;

b) связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691), или связывает рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692), или связывает рекомбинантный CD3e от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации (K_D) 300 нМ или менее, в котором K_D измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °С;

c) связывает остатки 1-6 CD3e при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

d) активирует Т-клетки или индуцирует экспрессию CD69 в той же степени, что

и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих вариантов осуществления, содержащее по меньшей мере одну замену в константном домене антитела, причем по меньшей мере одна замена включает:

a) замены в тяжелой цепи K409R, F405L или F405L и R409K;

b) замены в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A;

c) замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, A330 и P331S, при этом антитело относится к изотипу IgG1; или

d) замену в тяжелой цепи S228P, при этом антитело относится к изотипу IgG4;

в котором нумерация остатков соответствует индексу EU.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащие вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, содержащие последовательность тяжелой цепи (HC) и последовательность легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673, и 690, соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, содержащие VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из вариантов осуществления 1-5, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 773, 673 и 690, соответственно.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором антитело является человеческим или гуманизированным.

20. Антитело по варианту осуществления 19, в котором антитело относится к изотипу IgG4 или IgG1.

21. Антитело по варианту осуществления 20, содержащее одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в Fc антитела.

22. Антитело по варианту осуществления 18, содержащее:

a) замены в легкой цепи D43G, L49M, L50I, S62N, Q85E;

b) замены в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E, H89Y;

c) замены в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R70K, T83S, L96V;

d) любую одну из замен в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E или H89Y; или

e) любую одну из замен в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R79K, T83S или L96V,

при этом нумерация остатков для замен в легкой цепи соответствует SEQ ID NO: 661, а для замен в тяжелой цепи соответствуют SEQ ID NO: 652.

23. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, в котором антитело является биспецифическим или мультиспецифическим.

24. Биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно.

25. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, и при этом первый или второй домен содержит замены в тяжелой цепи S228P, F234A, L235A, F405L и R409K, а другой домен из первого или второго домена содержит замену в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

26. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором первый и/или второй домен содержит по меньшей мере одну замену в константном домене CH3, содержащем замену F405L или F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

27. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи F405L, а другой из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи K409R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

28. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 24, в котором первый

домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, при этом один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи S228P, а другой из первого или второго доменов содержит замены в тяжелой цепи S228P, F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

29. Биспецифическое антитело по п. 24, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно.

30. Биспецифическое антитело по п. 24, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

31. Биспецифическое антитело по п. 24, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно.

32. Биспецифическое антитело по п. 24, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

33. Биспецифическое антитело по п. 24, в котором второй антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффекторной клетки.

34. Биспецифическое антитело по п. 33, в котором антиген клеточной поверхности представляет собой опухолеассоциированный антиген.

35. Биспецифическое антитело по любому из пп. 24-34, в котором второй антиген представляет собой CD33, IL1RAP, PSMA или TMEFF2.

36. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 35, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 683, 80, 81, 792 и 686, соответственно.

37. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 681 и 682, соответственно.

38. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно; и в котором второй домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 679 и 680, соответственно.

39. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 3, 80, 81, 792 и 686, соответственно.

40. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 8 и 682, соответственно. .

41. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно; и в котором второй

домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 13 и 680, соответственно.

42. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 78, 79, 80, 81, 82 и 83, соответственно.

43. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 116 и 117, соответственно.

44. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 33, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно; и в котором второй домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 138 и 139, соответственно.

45. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670, соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 164, 165, 166, 167, 168 и 169, соответственно.

46. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 215 и 216, соответственно.

47. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670, соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 349, 390, 341, 471, 513 и 555, соответственно.

48. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и в котором второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 267 и 306, соответственно.

49. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 670, соответственно; и в котором второй домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 363, 404, 445, 485, 527 и 569, соответственно.

50. Биспецифическое антитело по варианту осуществления 31, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно; и где второй домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 281 и 320, соответственно.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

52. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из вариантов осуществления 1-50.

53. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 52.

54. Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 53.

55. Способ получения антитела по любому из вариантов осуществления 1-50, включающий культивирование клетки-хозяина согласно варианту осуществления 52 в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

56. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из вариантов осуществления 1-50 субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

57. Способ согласно варианту осуществления изобретения 56, в котором злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

58. Способ по варианту осуществления 57, в котором солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени.

59. Способ по варианту осуществления 58, в котором рак предстательной железы представляет собой рефрактерный рак предстательной железы, внутриэпителиальную неоплазию предстательной железы, андроген-независимый рак предстательной железы или злокачественный рак предстательной железы.

60. Способ по варианту осуществления 57, в котором гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазмцитоподобных дендритических клеток (ОБПДК).

61. Способ по любому из пп. 56-60, в котором антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

62. Антитело по любому из вариантов осуществления 1-50 для применения в терапии.

63. Связывание антиидиотипического антитела с антителом по любому из вариантов осуществления 1-50.

Примеры

1 Создание de novo и определение функциональных характеристик мкАт к CD3

1-1 Иммунизация OmniRat® антигенами CD3 для получения моноклональных антител к CD3

OmniRat® иммунизировали патентованными векторами (Aldevron, г. Фарго, штат Северная Дакота, США), кодирующими: CD3ε человека и Cd3d человека; CD3ε яванского

макака и CD3d яванского макака. Животные получали чередующиеся бусты ДНК человека и яванского макака. Начиная с 6-го применения животные получали оптимизированные векторы с той же вставкой. Клетки из лимфатических узлов сливали с клеточной линией миеломы Ag8. После истощения IgM 40 миллионов клеток из гибридной BLW помещали в три 96-луночных планшета. 133 миллионов клеток из гибридной BLX помещали в девять 96-луночных планшетов без истощения IgM.

Супернатанты гибридом из гибридов BLW (с магнитными гранулами, истощающими лимфоциты) и BLX (без магнитных гранул, истощающих лимфоциты) анализировали а) с помощью клеточного ИФА (CELISA) на клетках, временно трансфицированных кДНК человека и яванского макака, клонированными в векторы для скрининга: pOPT-CD3e-hum-epsilon-TCE.OMT+pOPT-CD3d-hum-delta.OMT, 1:1 (pOPT-CD3e/d-hum-mix) и pcDNA3.1-CD3e-cyn-delta+pcDNA3.1-CD3d-cyn-delta, 1:1 (pcDNA3.1-CD3e/d-cyn-mix). Последовательности кДНК человека и яванского макака (и соответствующие аминокислотные последовательности) представлены в таблице 4. Для CELISA-отрицательного контроля нетрансфицированные клетки млекопитающих инкубировали с супернатантами гибридом и детектировали с помощью вторичных антител Bethyl. Для CELISA-контроля трансфекции клетки млекопитающих, трансфицированные вышеописанными конструктами, детектировали с помощью антител к метке.

Супернатанты гибридом дополнительно анализировали методом проточной цитометрии (FACS) на CD3-положительных и CD3-отрицательных клетках Jurkat: Jurkat CD3+ (E6-1) и Jurkat CD3- (J.RT3-T3.5). Для FACS-отрицательного контроля CD3-отрицательные клетки Jurkat (J.RT3-T3.5) инкубировали с буфером для разведения и обнаруживали с помощью конъюгированных с ПХ вторичных антител к крысиному Ig крысы от Southern и с помощью конъюгированных с ПХ вторичных антител к крысиному IgG1, 2a, 2b, 2c.

Специфичность антител в супернатантах гибридом из гибридной BLW и гибридной BLX для комплекса CD3e/d человека и яванского макака, презентруемого на временно трансфицированных клетках, или, в случае комплекса CD3e/d человека на клетках Jurkat CD3+ (E6-1), была продемонстрирована с помощью CELISA на временно трансфицированных клетках, а также при исследовании с помощью FACS на клеточных линиях Jurkat (таблица 3). В экспериментальных образцах, которые служили в качестве отрицательных контролей, значимый сигнал не обнаруживали.

Таблица 3. Тестирование специфичности отдельных супернатантов гибридом с помощью клеточного ИФА (сверху) и проточной цитометрии (снизу). Значения CELISA отражают относительные единицы флуоресценции (ОЕФ) каждого образца. Значения FACS представляют собой геометрические средние (геом. среднее) относительных интенсивностей флуоресценции каждого образца.

		Клеточный ИФА (относительные единицы флуоресценции)
		Супернатанты гибридом, инкубированные с клетками,

		трансфицированными:					
		рOPT-CD3e/d-hum-mix	pcDNA3.1-CD3e/d-syn-mix		Нетрансфицированные CHO в виде отрицательного контроля		
		BLW: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (применяли истощение IgM+ с использованием магнитных гранул)					
Нет	Клон	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных
1	BLW-2B4	689	101	230	47	30	
2	BLW-2E6	231	34	121	25	20	
3	BLW-3B4	867	127	320	66	24	
		BLX: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (без истощения IgM+ с использованием магнитных гранул)					
Нет	Клон	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных	ОЕФ	% положительных
4	BLX-1F8	689	101	230	47	30	
5	BLX-2E9	867	127	320	66	24	
6	BLX-3F4	896	131	371	76	17	
7	BLX-3G8	759	111	340	70	22	
8	BLX-4D9	1042	153	483	99	24	
9	BLX-6A2	110	16	38	8	19	
	Положительный контроль	682	100	488	100	-	
	Отрицательный контроль	25	4	42	9	-	
		Проточная цитометрия (FACS)					
		Супернатанты гибридом, инкубированные на клеточной линии Jurkat					
		Jurkat CD3+ (E6-1)		Jurkat CD3- (J.RT3.T3.5) в виде отрицательного контроля			
		BLW: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (применяли истощение IgM+ с использованием магнитных гранул)					
Нет	Клон	геометрическое среднее	% положительных	геометрическое среднее	% положительных		
1	BLW-2B4	148034	53	4012			
2	BLW-2E6	7503	3	687			
3	BLW-3B4	198849	72	2884			

		BLX: слияние с лимфоцитами из группы MR14-379 крыс 1 и 2 (без истощения IgM+ с использованием магнитных гранул)			
Нет	Клон	геометрическое среднее	% положительных	геометрическое среднее	% положительных
4	BLX-1F8	148034	53	4012	
5	BLX-2E9	198849	72	2884	
6	BLX-3F4	181963	66	4613	
7	BLX-3G8	214697	77	3096	
8	BLX-4D9	25839	9	1471	
9	BLX-6A2	3385	1	1219	
	Положительный контроль	277338	100	2051	
	Отрицательный контроль	869	0	599	

Таблица 4. Последовательности CD3, используемые для иммунизации

CD3d человека	NP_000723.1 (www.uniprot.org/uniprot/P04234) (SEQ ID NO:691)
CD3e человека	(NP_000724.1 (www.uniprot.org/uniprot/P07766) (SEQ ID NO:636)
CD3d яванского макака	XP_001097302 (www.uniprot.org/uniprot/Q95LI8) (SEQ ID NO:692)
CD3e яванского макака	CD3e+TCE (www.uniprot.org/uniprot/Q95LI5) (SEQ ID NO:693)

1-2 Клонирование антител к CD3

Антитела к CD3 человека получали в OmniRat (OMT, г. Пало-Альто, штат Калифорния, США). Последовательности варибельной области (V-области) этих клонов экстрагировали из геномных последовательностей и анализировали. Все полученные последовательности представляли собой или тяжелую цепь, или легкую цепь лямбда человеческого IgG, а последовательности, в особенности LC, демонстрировали высокую гомологию. Выравнивание последовательностей относительно последовательностей зародышевой линии продемонстрировало некоторые мутации в каркасной области (**Фиг. 1**). Последовательности ДНК V-области синтезировали и клонировали в векторы экспрессии млекопитающего, последовательности тяжелой цепи - в вектор человеческого IgG1, а последовательности легкой цепи - в вектор человеческой лямбда. Последовательности показаны в таблицах 6 и 7. Семи мкАт были присвоены идентификаторы белка (таблица 5А).

CD3B312 выбирали в качестве наиболее репрезентативного клона, а последовательности тяжелой цепи клонировали в человеческий IgG1sigma и IgG4 РАА с мутациями S228P, F234A, L235A и назначали идентификаторы белка, как показано в таблице 5В. Их использовали для получения биспецифических антител и для

демонстрации функциональности перенаправления Т-клеток посредством цитотоксичности.

Таблица 5А. ID пептида и ID белка для клонов

ID клона	ID пептида HC	ID пептида LC	ID белка
BLW-2B4	CD3H218	CD3L123	CD3B311
BLW-2E6	CD3H219	CD3L124	CD3B312
BLW-3B4	CD3H218	CD3L125	CD3B313
BLX-1F8	CD3H220	CD3L126	CD3B314
BLX-2E9	CD3H221	CD3L124	CD3B315
BLX-3F4	CD3H222	CD3L124	CD3B316
BLX-3G8	CD3H223	CD3L124	CD3B317

Таблица 5В. CD3B312 выбирали в качестве наиболее репрезентативного клона, а последовательности тяжелой цепи клонировали в человеческий IgG1sigma и IgG4 PAA с мутациями и назначали идентификаторы белка.

IgG1	IgG1sigma	IgG4PAA
CD3B312	CD3B337	CD3B373

Таблица 6. Последовательности тяжелых и легких цепей 7 моноклональных антител к CD3

ID белка по а.к.	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO:
CD3B311 (BLW-2B4)	ID пептида HC: CD3H218 QVQLQQSGPGLVKPSQTL TCAISGDSVFNNNAAWT WIRQSPSRGLEWLGRTYYR SKWLYDYAVSVKSRITV NPDTSRNQFTLQLKSVTP EDTALYCSRGYSSSF DYWGQGLVTVSASTK GPSVFLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEP VTVSNWNGALTS GVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVY TLPSSREEMTKNQV SLTCLVKGFPYPSDIA VEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRW QKGNVFC SVMHEALHNHYT	(637)	ID пептида LC: CD3L123 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYK FVSWYQQHPDKAPK VLLYEVSKRPSGVSS RFSGSKSGNTASLT ISGLQAEDQADYHCC SYAGSGTLLF GGGTKLTVLGQPKA APSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFY PGA VTVW KADSSPVKAGVETTT PSKQSNKYAASSYLSL TPEQW KSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVA PTECS	(645)

	QKSLSLSPGK			
CD3B312	ID пептида HC: CD3H219 QVRLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAISGDSVFNNNAASWIR QPSRGGLEWLGRTYYRSKW LYDYAVTVKSRITVNPDTSR NQFTLQLTSVTPEDTALYYC ARGYSSSFYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	(640)	ID пептида LC: CD3L124 QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKVV SWYQQHPDKAPKVLLY EVSKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	(646)
CD3B313	ID пептида HC: CD3H218		ID пептида LC: CD3L125	

(BLW-3B4)	<p>QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVFNNNGAW SWIRQSPSRGLEWLGRTY YRSKWLYDYAVSVKSRIT VNPDTSRNQFTLQLNSV TPEDTALYYCARGYSS SFDYWGGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPK KSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTEPVTCTVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVHLQDWNL GKEYCKVSNKALPAPIE KTIKAKGQPREPQVYTL PPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>	(638)	<p>QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKFV SWYQQHPDKAPKVLLY EVSKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS</p>	(649)
(BLX-1F8)	<p>ID пептида HC: CD3H220</p> <p>QVQLQQSGPGLVKPSQTL SLTCAISGDSVFNNNA AWSWIRQSPSRGLEWLG RTYRSKWLYDYAVSVK SRITVNPDTSRNQFTL QLKSVTPEDTALYYC SRGYSSSFDYWGGQGL VTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWSN SGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHHKPS NTKVDKKVEPKSCDKT HTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVHLQDWNL GKEYCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSL SPGK</p>	(641)	<p>ID пептида LC: CD3L126</p> <p>QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSDIGTYKFV SWYQQHPDKAPKVLLY EVSKRPSGVSSRFSGSK SDNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS</p>	(650)
CD3B315	ID пептида HC: CD3H221		ID пептида LC: CD3L124	

(BLX-2E9)	<p>QVQLQQSGPGLVKPSQTL TCAISGDSVFNNNAASWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKW LYDYAVSVKSRITVNPDTSR NQFTLQLNSVTPEDTALYYC VRGYSSSFYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p>	(642)	<p>QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSRDIGTYKVF SWYQQHPDKAPKVLLY EVSKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS</p>	(647)
<p>CD3B316</p> <p>(BLX-3F4)</p>	<p>ID пептида HC: CD3H222</p> <p>QVQLQQSGPRLVRPSQTL TCAISGDSVFNNNAASWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKW LYDYAVSVKSRITVNPDTSR NQFTLQLNSVTPEDTALYYC ARGYSSSFYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</p>	(643)	<p>ID пептида LC: CD3L124</p> <p>QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSSNIGTYKVF SWYQQHPDKAPKVLLY EVSKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLLF GGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS</p>	(646)
CD3B317	<p>ID пептида HC: CD3H223</p>		<p>ID пептида LC: CD3L124</p>	

(BLX-3G8)	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTL TCAISGDSVFNNNAAWSWIR QSPSRGLEWLGRTYYRSKW LYDYAVSVKSRITVNPDTSR NQFTLQLNSVTPEDTALYIC VRGYSSSFYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSKVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	(644)	QSALTQPASVSGSPGQS ITISCTGTSRDIGTYKFFV SWYQQHPDKAPKVLLY EVNKRPSGVSSRFSGSK SGNTASLTISGLQAEDQ ADYHCCSYAGSGTLFF GGGKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVA WKADSSPVKAGVETTT PSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVT HEGSTVEKTVAPTECS	(648)
-----------	--	-------	--	-------

Таблица 7А. Последовательности VH и VL с изотипом HC и LC 7 моноклональных антител к CD3 из первой панели 9, описанной выше (см. таблицу 3). Все изотипы HC представляли собой huIgG1_G1m(17). Все изотипы LC представляли собой huLambda 2.

ID Fab	ID пептида	VH (SEQ ID NO:)	ID пептида	VL (SEQ ID NO:)
CD3B311	CD3H218	qvqlqqsgpplvkpsqtlstlcai sgdsvfnnnaawswirqpsr glewlgertyyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycvrgysssfdywgqg tlvtvss (651)	CD3L123	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtsrd igtykfvswyqqhpdkapkvlllyev nkrpsgvssrfsksgsgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (658)
CD3B312	CD3H219	qvqlqqsgprlvrsqtlstlcai sgdsvfnnnaawswirqpsr glewlgertyyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycargysssfdywgqg tlvtvss (652)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtsn igtykfvswyqqhpdkapkvlllyev skrpsgvssrfsksgsgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (659)
CD3B313	CD3H218	qvqlqqsgpplvkpsqtlstlcai sgdsvfnnnaawswirqpsr glewlgertyyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycvrgysssfdywgqg tlvtvss (687)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtsrd igtykfvswyqqhpdkapkvlllyev skrpsgvssrfsksgsgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (688)

CD3B314	CD3H220	qvqlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnaawswirqpsr glewlgertyyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlksvtp edtalyycsrgysssfdywgqg tlvtvss (653)	CD3L126	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtssd igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsqsksdntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (660)
CD3B315	CD3H221	qvqlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnngawswirqpsr glewlgertyyrskwlydyavsv ksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp edtalyycargysssfdywgqg tlvtvss (654)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtssn igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsqsksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (659)
CD3B316	CD3H222	qvrlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnaawswirqpsr glewlgertyyrskwlydyavtv ksritvnpdtsrnqftlqltsvtp dtalyycargysssfdywgqgtl vtvss (655)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtssn igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsqsksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (659)
CD3B317	CD3H223	qvqlqqsgpglvkpsqtlslcai sgdsvfnnaawtwirqpsrg lewlgrtyyrskwlydyavsvk sritvnpdtsrnqftlqlksvtp dtalyycsrgysssfdywgqgtl vtvss (656)	CD3L124	qsaltqpasvsgspgqsitiscgtssn igtykfvswyqqhpdkapkvlliev skrpsgvssrfsqsksgntasltisglq aedqadyhccsyagsgtllfgggtklt vl (659)

Таблица 7В. Последовательности CDR с изотипом HC и LC 7 моноклональных антител к CD3 из первой панели 9, описанной выше (см. таблицу 3). Последовательности определены по Kabat. Все изотипы HC представляли собой huIgG1_G1m(17). Все изотипы LC представляли собой huLambda 2.

ID FAB	ID пептида	CDR (SEQ ID NO:)		
		CDR1	CDR2	CDR3
CD3B311	HC CD3H218	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L123	TGTSRDIGTYKFVS (667)	EVNKRPS (669)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B312	HC CD3H219	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC	TGTSSNIGTYKFVS	EVSKRPS	CSYAGSGTLL

	CD3L124	(671)	(673)	(670)
CD3B313	HC CD3H218	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSRDIGTYKFVS (672)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B314	HC CD3H220	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L126	TGTSSDIGTYKFVS (674)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B315	HC CD3H221	NNNGAWS (665)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B316	HC CD3H222	NNNAAWS (662)	RTYYRSKWLYDY AVTVKS (689)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)
CD3B317	HC CD3H223	NNNAAWT (666)	RTYYRSKWLYDY AVSVKS (663)	GYSSSFYD (664)
	LC CD3L124	TGTSSNIGTYKFVS (671)	EVSKRPS (673)	CSYAGSGTLL (670)

1-3 Скрининг гибридом в отношении их связывания с очищенными Т-клетками человека и яванского макака

Был разработан клеточный анализ связывания для оценки способности отдельных супернатантов гибридом крыс к CD3⁺ Т-лимфоцитам человека (**Фиг. 2**) и яванского макака (**Фиг. 3**). Т-клетки подсчитывали, разбавляли до 1×10^6 клеток/мл и инкубировали с 0,5 мкл/мл Live/Dead Fixable Green Dead Cell Stain (Life Technologies, L-2301). Затем клетки разделяли на аликвоты в планшете с U-образным дном (Falcon 353077) по 100 мкл/лунка (1×10^5 клеток/лунка). Планшеты центрифугировали при 300g в течение 5 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) до концентрации 4,5 мкг/мл, а затем последовательно разбавляли 6 раз при разведениях 1:3 до самой низкой концентрации 0,006 мкг/мл. Положительный контроль мышинового антитела к CD3 (SP34-2, BD Biosciences 551916) и отрицательного изотипического контроля (мышинный IgG1, BD Biosciences 556648) также разводили до 4,5 мкг/мл. 50 мкл каждого образца добавляли к

Т-клеткам и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. Клетки однократно промывали окрашивающим буфером и добавляли конъюгированные с AF647 вторичные козы антитела к мышинному IgG (Life Technologies, A21235) или конъюгированные с AF647 козы антитела к крысиному IgG (Life Technologies, A21247) в концентрации 10 мкг/мл в 50 мкл в соответствии с соответствующими видами (антикрысиные антитела для образцов гибридомы и антимышиные антитела для контрольных антител). Планшеты инкубировали при 4°C в течение 45 минут и дважды промывали окрашивающим буфером. Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера (окрашивающий буфер +1 mM ЭДТК (Life technologies, AM9260G) + 0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)) и считывали на системе Intellicyt (Intellicyt Corp.). Результаты приведены на **Фиг. 2 и 3**.

В других экспериментах очищенные человеческие Т-клетки высевали с плотностью $1,1 \times 10^5$ клеток/лунка в планшеты с U-образным дном. Планшеты центрифугировали при 300g в течение 5 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) до концентрации 30 мкг/мл, а затем последовательно разбавляли 11 раз при разведениях 1:3 до самой низкой концентрации 0,00017 мкг/мл. 50 мкл каждого образца добавляли к Т-клеткам и инкубировали при 4 С в течение 1 часа. Клетки однократно промывали окрашивающим буфером и добавляли конъюгированное с DyLight 650 козые вторичное анти тело к крысиному IgG (Bethyl, A110-239D5) в концентрации 10 мкг/мл в 50 мкл. Планшеты инкубировали при 4 С в течение 1 часов и дважды промывали окрашивающим буфером. Клетки ресуспендировали в 30 мкл буфера для FACS и считывали на проточном цитометре Hypercyte (Intellicyt Corp.). Репрезентативные кривые доза-эффект для клонов анти тела к CD3, связывающихся с первичными человеческими Т-клетками, показаны на **Фиг. 5**.

Репрезентативные кривые конкурентного связывания с SP34-2 (коммерческое анти тело к CD3 человека, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака) показаны на **Фиг. 6**. Результаты начального скрининга представлены в Таблице 8. Шесть клонов продемонстрировали положительное связывание, а также конкурируют с SP34-2 за связывание с первичными человеческими Т-клетками.

1-4 Конкурентный анализ с коммерческим анти телом к CD3 SP34-2

Супернатанты гибридом также оценивали на их способность конкурировать с коммерческим анти телом к CD3 человека SP34-2, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского макака. Сначала была построена кривая титрования концентрации флуоресцентно меченного AF488 SP34-2 (BD, 557705), для определения фиксированной концентрации SP34-2 для следующих конкурентных анализов. Вкратце, очищенные Т-клетки человека разводили до 1×10^6 клеток/мл в PBS. Fc Block (Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302) добавляли к 5 мкл/100 мкл клеток и высевали по 100 мкл/лунка в планшеты с U-образным дном. AF488 SP34-2 и меченный AF488 изотипический контроль (мышиный IgG1 AF488, BD, 400129) последовательно

разводили от 50 мкг/мл до 0,049 мкг/мл по схеме разведения 1:2. Планшеты центрифугировали при 300xg в течение 5 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет осторожно кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. К клеткам добавляли по 50 мкл каждого разведения AF488 SP34-2 и инкубировали при 4 °C в течение 1 часа. Планшеты дважды промывали окрашивающим буфером и один раз промывали рабочим буфером (окрашивающим буфером+1 mM ЭДТК (Life technologies, AM9260G) + 0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)). Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера и считывали на HTFC Screening System (IntelliCyt Corporation). На основании кривой доза-эффект для конкурентного анализа была выбрана фиксированная концентрация 2 мкг/мл SP34-2.

Семь гибридом, которые демонстрировали связывание с очищенными Т-клетками, анализировали на предмет конкуренции с SP34-2 в отношении связывания с человеческими Т-клетками (Фиг. 4). Контрольные антитела были включены в конкурентный анализ. Немеченные мышиные антитела к CD3 человека, SP34-2 и мышиные антитела к CD3 человека, UCHL1 использовали в качестве положительных контролей, а крысиный IgG и мышиный изотип использовали в качестве отрицательных контролей для AF488-меченных SP34-2. Очищенные человеческие Т-клетки разбавляли до концентрации 1×10^6 клеток/мл в PBS. К клеткам добавляли Fc Block в концентрации 5 мкл на 100 мкл клеток (Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302) и Live/Dead Fixable Far Red Dead Cell Stain в концентрации 0,5 мкл на мл клеток (Life Technologies L10120) и инкубировали в течение 15 минут при 4 °C. Затем аликвоты по 10^5 клеток на лунку (1×10^5 клеток/лунку) помещали в 96-луночный планшет с U-образным дном (Falcon 353077). Планшеты центрифугировали при 300xg в течение 5 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет осторожно кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом и контрольные антитела разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) в 2X желаемой конечной концентрации. 35 мкл 2X супернатантов гибридом и контрольных антител смешивали с 35 мкл 2X AF488 SP34-2 (4 мкг/мл) с получением желаемой концентрации 1X супернатантов гибридом, контрольных антител в концентрации 1X и 2 мкг/мл AF488 SP34-2. Супернатанты гибридом и контрольные антитела анализировали с использованием титрования по 7 точкам в диапазоне концентраций. Супернатанты гибридом анализировали от 200 мкг/мл до 0,08 мкг/мл, а контрольные антитела анализировали от 100 мкг/мл до 0,04 мкг/мл. 50 мкл супернатантов гибридом в концентрации 1X или контрольных антител в концентрации 1X с 2 мкг/мл AF488 SP34-2 добавляли к Т-клеткам и инкубировали при 4°C в течение 2 часов. Планшеты дважды промывали окрашивающим буфером и один раз промывали рабочим буфером (окрашивающим буфером+1 mM ЭДТК (Life technologies, AM9260G) + 0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)). Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера и считывали на HTFC Screening System (IntelliCyt Corporation). Репрезентативные кривые конкурентного связывания с SP34-2 (коммерческое антитело к CD3 человека, для которого известен эпитоп, и перекрестно реагирует с CD3 яванского

макака) показаны на **Фиг. 4** и **Фиг. 6**. Результаты начального скрининга представлены в Таблице 8. Шесть клонов продемонстрировали положительное связывание, а также конкурировали с SP34-2 за связывание с первичными Т-клетками человека.

Как показано на **Фиг. 4**, семь антител, которые конкурировали с SP34-2, имели аналогичные кривые. Смещение кривых вправо относительно контрольного SP34-2 указывает на более слабую аффинность связывания. Как и ожидалось, изотипический контрольный крысиный IgG не конкурировал с SP34-2.

Таблица 8. Сводные данные по связыванию антитела к CD3 с первичными Т-клетками человека. Клоны к CD3, **BLX-4E5**, **BLX-5H7**, **BLX-8B4**, **BLX-8B6**, **BLX-8G8** and **BLW-1E3**, оказались положительными в отношении связывания с Т-клетками человека и конкурировали со связыванием SP34-2

Клон Ат	Связывает Т-клетки человека	Конкурирует с SP34-2
BLW-2B4	+	+
BLW-2E6	+	+
BLW-3B4	+	+
BLX-1F8	+	+
BLX-2E9	+	+
BLX-3F4	+	+
BLX-3G8	+	+
BLX-1G10	-	-
BLX-3H6	-	-
BLX-4E5	+	+
BLX-5H7	+	+
BLX-8B4	+	+
BLX-8B6	+	+
BLX-8G8	+	+
BLW-1E3	+	+
BLW-1F1	+	-
BLW-2C4	-	-
BLW-2C11	-	-
BLW-2F9	-	-
BLW-3B5	-	-
BLW-3H5	-	-

1-5 Скрининг отобранных соединений из гибридом в отношении Т-клеточной активации, измеренной по повышению экспрессии CD69

Для определения способности отобранных соединений из гибридом активировать Т-клетки использовали первичный анализ на основе Т-клеток человека и яванского

макака. Этого достигали путем нанесения антител на планшет для имитации перекрестного эффекта активации TCR. Известно, что при активации T-клетки усиливают поверхностную экспрессию белка CD69. Эксперимент проводили путем нанесения 50 мкл препарата антител с концентрацией 10 мкг/мл с неизвестными образцами или контролями (положительный контроль: собственной разработки, Okt-3 BISB264.002, BD Bioscience SP-34-2 №551916; отрицательный контроль: анти-CD20, разработанный самостоятельно, BISB266.004) на 96-луночный планшет (Costar № 3361). Клетки инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. На следующий день планшеты дважды промывали PBS. Замороженные первичные T-клетки (человеческие, полученные от компании Biological Specialties или Nemascare; яванского макака, полученные от компании WorldWide Primates), размораживали, оценивали на жизнеспособность и ресуспендировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде RPMI 1640 (Gibco № 11875 с 10% HI FBS (Gibco №10062)). 100 мкл клеток добавляли в планшет и инкубировали в течение ночи (приблизительно 16 часов) при 37 °С, 5% CO₂. На следующий день планшеты центрифугировали при 1300 об/мин в течение 3 минут для осаждения клеток и отделяли супернатанты. Клетки однократно промывали в PBS и центрифугировали так же, как и ранее. В каждую лунку добавляли по 10 мкл 2,5% раствора Live/Dead Green Fixable Dye (Life Technologies, № L23101) в PBS и инкубировали при комнатной температуре и в темноте в течение 10 минут. Затем добавляли 50 мкл 1% раствора анти-CD69 AF488 (Biolegend, № 310916, партия № B125271) в буфере для FACS (BD Biosciences, № 554657) и инкубировали планшеты в течение 45 минут при 4 °С. Планшеты дважды промывали путем осаждения клеток, как прежде, и удаления супернатанта, и ресуспендирования в 150 мкл буфера для FACS. После последней промывки клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS и считывали на FACS Canto. Как видно на **Фиг. 20**, положительные контроли сOkt3 и SP34-2 индуцировали повышение экспрессии CD69 на T-клетках человека, о чем свидетельствует измеренная средняя интенсивность флуоресценции при окрашивании анти-CD69. Только SP34-2 индуцировало экспрессию CD69 в T-клетках яванского макака, так как оно связывается с областью последовательности CD3, которая является консервативной у обезьяны и человека. Клон антитела к CD3 OKT3 не связывался с CD3 яванского макака и не индуцировал повышение экспрессии CD69. Отрицательный контроль как в T-клетках человека, так и в T-клетках яванского макака представлял собой антитело к CD20, который не экспрессируется на T-клетках. Из клонов гибридом, которые были протестированы в отношении активации T-клеток, несколько индуцировали экспрессию CD69 в той же степени, что и положительный контроль, а именно 2B4, 2E6, 3B4, 1F8, 2E9, 3F4, 3G8, 4E5, 5H7, 8B4, 8G8 и 1F1. Большинство из них также связывало и активировало T-клетки яванского макака, за исключением 5H7, 8B4 и 8G8.

1-6 Конструирование каркаса BLW-2E6

Клоны продемонстрировали высокую гомологию и несли мутации каркаса относительно последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии

(Фиг. 1А и 1В). Клон 2Е6 был выбран для модификации стандартной последовательности каркаса. Все 6 мутаций в НС и 7 мутаций в LC подвергали обратной мутации до последовательности человеческой зародышевой линии, или по отдельности, или в комбинации (таблица 9). Мутировавшие последовательности ДНК V-области были синтезированы и клонированы в те же векторы экспрессии млекопитающих, что и их исходные конструкции. Конструкции НС и LC соединяли посредством матричного формата для получения белков, несущих отдельные или комбинаторные мутации, и тестировали активность белка. V48 на LC не может быть изменен обратно до последовательности зародышевой линии. Все другие обратные мутации не имели решающего значения, но до некоторой степени снижали активность.

Таблица 9. Варианты каркаса BLW-2Е6.

Обратная мутация в тяжелой цепи до человеческой зародышевой линии	ID пептида
WT	CD3H219
R10G	CD3H225
R13K	CD3H226
V73I	CD3H227
R79K	CD3H228
T83S	CD3H229
L96V	CD3H230
R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V	CD3H231
Обратная мутация в легкой цепи до человеческой зародышевой линии	ID пептида
WT	CD3L124
D43G	CD3L128
V48L	CD3L129
L49M	CD3L130
L50I	CD3L131
S62N	CD3L132
Q85E	CD3L133
H89Y	CD3L134
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E	CD3L135
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y	CD3L137
D43G/V48L/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y	CD3L136
D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y/C91V	CD3L197

Мутации в каркасе были выполнены для одного клона гибридомы, BLW-2Е6, в результате чего получили 80 мутантных клонов, некоторые из которых указаны в таблице 10. 80 мутантных клонов анализировали на связывание с первичными Т-клетками

человека (Фиг. 7 и 8). Т-клетки подсчитывали, разбавляли до 1×10^6 клеток/мл и инкубировали с 5 мкл Fc Block (Human TruStain Fc Block, Biolegend, 422302) на 100 мкл клеток и 0,5 мкл на мл Live/Dead Fixable Green Dead Cell Stain (Life Technologies, L-2301) на 100 мкл клеток. Затем клетки разделяли на аликвоты в 96-луночном планшете с U-образным дном (Falcon 353077) по 100 мкл/луночка (1×10^5 клеток/луночка). Планшеты центрифугировали при 300xg в течение 5 минут для осаждения клеток и удаляли супернатант. Планшет осторожно кратковременно встряхивали для ресуспендирования клеток. Супернатанты гибридом разводили в окрашивающем буфере для FACS (BSA, BD Biosciences 554657) до концентрации 7,5 мкг/мл, 1,5 мкг/мл, 0,3 мкг/мл и 0,06 мкг/мл. 50 мкл каждого образца добавляли к Т-клеткам и инкубировали при 4 °С в течение 1 часа. Клетки промывали один раз окрашивающим буфером и к клеткам добавляли 50 мкл меченого AF647 вторичного козьего антитела к F(ab')₂ IgG в концентрации 5 мкг/мл (Jackson ImmunoResearch, кат.: 109-605-097). Планшеты инкубировали при 4°С в течение 45 минут, и дважды промывали окрашивающим буфером и один раз промывали рабочим буфером (окрашивающим буфером+1 mM ЭДТК (Life technologies, AM9260G) + 0,1% Pluronic F-68 (Life Technologies 24040-032)). Клетки ресуспендировали в 25 мкл рабочего буфера и считывали на HTFC Screening System (IntelliCyt Corporation). Результаты демонстрируют, что изменение LC в положении 48 устраняет связывание, так что мутация не переносили. Небольшое снижение связывания наблюдали в HC со всеми положениями, возвращенными до зародышевой линии (CD3H231).

1-7 Сканирование C91 LC BLW-2E6

Клон 2E6 и его производные экспрессировались слабо, и наблюдалась агрегация белка. Один остаток, C91 легкой цепи, предположительно имел риск посттрансляционной модификации (ПТМ) и его подвергали мутации до всех других возможных аминокислот для улучшения стабильности белка (таблица 10). Мутировавшие последовательности ДНК V-области были синтезированы и клонированы в тот же вектор экспрессии человеческой лямбда, что и их исходный конструктор. Результаты ППР продемонстрировали, что изменение валина или лейцина в положении 91 не приводило к резкому изменению аффинности связывания. Это изменение также включалось в последовательность дикого типа и адаптацию каркаса, что приводило к получению антител CD3B376 (CD3H219/CD3L150) и CD3B450 (CD3H231/CD3L197). CD3B376 и CD3B450 клонировали как IgG4PAA (IgG4 с мутациями S228P, F234A, L235A).

Информация о последовательности для CD3B376 представлена ниже:

Аминокислотная последовательность HC CD3H219 (SEQ ID NO:640):
 QVQLQSQGPRLVRPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSK
 WLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFQYWGQGTLV
 TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV
 LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS

QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYSKLTVD
KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Нуклеотидная последовательность HC CD3H219 (SEQ ID NO: 712)

caggtgcagctgcagcagctctggccctagactcgtgcggcctcccagaccctgtctctgacctgtgccatctccggcgactcc
gtgtcaacaacaacgccgctgtctggatccggcagagccctctagaggcctggaatggctgggcccggacctactaccggccaag
tggtgtacgactacgccgtgtccgtgaagtcccggatcacctgaacctgacacctcccgaaccagttcacctgcagctgaactccg
tgacctgaggacaccgccctgtactactgccagaggctactcctcctcctcgactattggggccaggggaccctcgtgacctgtcc
tct

Аминокислотная последовательность LC CD3L150 (SEQ ID NO:676):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLEYVSKRPSGV
SSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKAAPSV
TLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKYAA
SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Нуклеотидная последовательность LC CD3L150 (SEQ ID NO: 713)

cagtctgtctgaccagcctgctcctgctgtctggctctcccggccagtcaccatcaccatcagctgtaccggcacctcctccaacat
cggcacctacaagttcgtgtcctggatcagcagcaccgccacaaggccccaaagtgtgtgtgtacgaggtgtccaagcggccctctgg
cgtgtcctccagattctccggctccaagtgtgcaacaccgctcctgaccatcagcggactgcaggctgaggaccaggccgactacca
ctgtgtgtcctacgctggctctggcacctcgtgtttggcggaggcaccagaagctgacctgtctg

Аминокислотная последовательность VH CD3H219 (SEQ ID NO:652):

qvqlqqsgprlvrsqtlsltcaisgdsvfnnnaawswirqsprglewlgtrtyrskwlydyavsvksritvnpdtsrnqftlqlnsvtp
edtalyycargysssfdywgqtlvtvss

Аминокислотная последовательность VL CD3L150 (SEQ ID NO:661):

qsaltqpasvsgspgqsitiscgtssnigtykfvsyqqhpdkapkvlllyevskrpsvssrfsksgsgntasltisglqaedqadyhc
Vsyagsgtllfgggtklvtl

HCDR1 CD3H219 (SEQ ID NO:662): NNNAAWS

HCDR2 of CD3H219 (SEQ ID NO:663): RTYYRSKWLYDYAVSVKS

HCDR3 of CD3H219 (SEQ ID NO:664): GYSSSFYD

LCDR1 of CD3L150 (SEQ ID NO:671): TGTSSNIGTYKFVS

LCDR2 of CD3L150 (SEQ ID NO:673): EVSKRPS

LCDR3 of CD3L150 (SEQ ID NO:690): VSYAGSGTLL

Информация о последовательности для CD3B450 представлена ниже:

Аминокислотная последовательность HC CD3H231 (SEQ ID NO:675):

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPRGLWLGRTY
YRSKWLYDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGYSSSFYDYGWQ
GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAP
EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLLYS
KLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

Нуклеотидная последовательность HC CD3H231 (SEQ ID NO: 714):

caggtgcagctgcagcagagcggccccggcctggcaagcccagccagaccctgagcctgacctgcgccatcagcggcga
 cagcgtgtcaacaacaacgccgctgtctggatccgccagagccccagccgcgctggagtgctggccgcaactactaccgca
 gcaagtggctgtacgaactacgccgtgtccgtgaagtcccgcaccatcaaccccgacaccagcaagaaccagttctcctgcagctga
 acagcgtgacccccgaggacaccgccgtgtactactgcgccgcttacagcagcagcttcgactactggggccagggcacccctggt
 caccgtgtccagc

Аминокислотная последовательность LC CD3L197 (SEQ ID NO:677):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPGKAPKVMIIYEVSKR
 PSGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVLGQPKA
 APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
 KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Нуклеотидная последовательность LC CD3L197 (SEQ ID NO: 715):

Cagtctgctctgaccagcctgcctccgtgtctggctctcccgccagtcaccatcaccatcagctgtaccggcacctcctccaaca
 tcggcacctacaagttcgtgtcctgtatcagcagcaccgccgaagccccaaagtgatgatctacgaggtgtccaagcggccctccg
 gcgtgtccaacagattctccgctccaagtcggcaacaccgctccctgacaatcagcggactgcaggccgaggacaggccgactac
 tactgtgtgtcctacgccgctctggcaccctgctgttggcggcggaacaagctgaccgtgctg

Аминокислотная последовательность VH CD3H231 (SEQ ID NO:657):

qvqlqqsgplvkpsqtlsltcaisgdsfvnnaawswirqsprglewlgtrtyyrskwlydyavsvksritinpdtsknqfs
 lqlnsvtpedtavuyycargysssfdywgqgtlvtvss

Аминокислотная последовательность VL CD3L197 (SEQ ID NO:678):

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPGKAPKVMIIYEVSKR
 PSGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL

HCDR1 CD3H231 (SEQ ID NO:662): NNNAAWSHCDR2 CD3H231 (SEQ ID NO:663): RTYYRSKWLYDYAVSVKSHCDR3 CD3H231 (SEQ ID NO:664): GYSSSFYDLCDR1 CD3L197 (SEQ ID NO:671): TGTSSNIGTYKFVSLCDR2 CD3L197 (SEQ ID NO:673): EVSKRPSLCDR3 CD3L197 (SEQ ID NO:690): VSYAGSGTLL

Таблица 10. Сконструированные варианты LC BLW-2E6 путем сканирования C91

Сканирование C91	ID пептида
CD3 2E6 LC	CD3L124
CD3 2E6 LC, C91S	CD3L146
CD3 2E6 LC, C91G	CD3L147
CD3 2E6 LC, C91E	CD3L148
CD3 2E6 LC, C91D	CD3L149
CD3 2E6 LC, C91V	CD3L150
CD3 2E6 LC, C91A	CD3L151
CD3 2E6 LC, C91R	CD3L152
CD3 2E6 LC, C91K	CD3L153

CD3 2E6 LC, C91N	CD3L154
CD3 2E6 LC, C91M	CD3L155
CD3 2E6 LC, C91I	CD3L156
CD3 2E6 LC, C91T	CD3L157
CD3 2E6 LC, C91W	CD3L158
CD3 2E6 LC, C91Y	CD3L159
CD3 2E6 LC, C91L	CD3L160
CD3 2E6 LC, C91F	CD3L161
CD3 2E6 LC, C91Q	CD3L162
CD3 2E6 LC, C91H	CD3L163
CD3 2E6 LC, C91P	CD3L164

1-8Связывание мкАт к CD3 BLW-2E6 с конструктором hCD3ε при помощи ППР ProteOn

Связывание мкАт к CD3 BLW-2E6 с точечными мутациями в легкой и/или тяжелой цепях с рекомбинантным пептидом CD3ε(1-27) человека с С-концевым гибридным белком Tencon25 (продукция Janssen, называемая hCD3ε(1-27)-Tn25) измеряли при помощи ППР ProteOn (Bio-Rad). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-098) напрямую иммобилизованы по амино-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 6000 единиц ответа (RU) с менее чем 5% разбросом между разными каналами. Пять различных мкАт захватывали на поверхности антитела к человеческому Fc IgG в концентрации 1,5 мкг/мл (1000~ 1250 RU) в вертикальной ориентации лиганда, с отсутствием 6-го лигандного канала в качестве контроля поверхности лиганда. hCD3ε(1-27)-Tn25 при концентрации 1 мкМ в серии 3-кратных разведений из 5 концентраций применяли в качестве аналита для связывания с захваченными мкАт в горизонтальной ориентации. 6-й образец буфера также вводили для контроля диссоциации захваченного мкАт и стабильности базовой линии. Фазу диссоциации для всех концентраций hCD3ε(1-27)-Tn25 отслеживали при скорости потока 100 мкл/мин в течение 30 минут. Поверхность связывания регенерировали для следующего цикла взаимодействия с использованием 18 секундного импульса 0,8% фосфорной кислоты для удаления антигена и связанного мкАт. Необработанные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) сигналов между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) сигналов канала буфера для коррекции смещения базовой линии из-за диссоциации со временем захваченного мкАт с поверхности. Обработанные данные для всех концентраций для каждого мкАт в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1: 1 для получения оценок констант кинетики (k_{on} , k_{off}) и аффинности (K_D). Результаты

представлены на **Фиг. 11**.

Таблица 11. Сводные данные по кинетике/аффинности связывания вариантов BLW-2E6 с hCD3ε(1-27)-Tn25 (N=1)

ID белка по а.к.	Тяжелая цепь	Легкая цепь	ka (1/M*с)	kd (1/с)	KD (нМ)	Мутация(ии) в НС	Мутация(ии) в LC
СЗВ31 2	CD3H21 9	CD3L1 24	9.08E+0 4	1.87E- 03	20,6	Дикий тип	Дикий тип
CD3B3 76	CD3H21 9	CD3L1 50	1.02E+0 5	2.37E- 03	23,3	Дикий тип	С91V
Н/П	CD3H21 9	CD3L1 60	9.84E+0 4	4.05E- 03	41,1	Дикий тип	С91L
Н/П	CD3H21 9	CD3L1 37	6.13E+0 4	2.02E- 03	32,9	Дикий тип	D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y
CD3B3 34	CD3H23 1	CD3L1 37	6.96E+0 4	5.54E- 03	79,6	R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V	D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y

Н/П=не присвоен

1-9 Связывание моноклональных антител к CD3 с Т-клетками человека

Аффинность связывания CD3B376 и CD3B450 *in vitro* с Т-клетками человека определяли с помощью проточной цитометрии после скрещивания с антигенспецифическим целевым плечом. Проводили предварительное исследование человеческих Т-клеток для определения константы насыщения связывания меченой молекулы к CD3 (K_dT). Фиксированную концентрацию меченого соединения ($[T]$) затем использовали в анализе конкурентного связывания с титрованными концентрациями исследуемых мкАт. Значение IC50 (концентрация, при которой достигается 50% ингибирования) для исследуемой молекулы использовали для определения аффинности связывания (K_d) по следующей формуле: $K_d=IC50/(1+([T]/K_dT))$. Для определения константы насыщения (K_dT) меченого соединения, имеющегося в продаже антитела к CD3 AlexaFluor488 SP34-2 (BioScience, № 557705), использовали пять доноров-людей (данные не показаны).

Определение константы насыщения связывания меченого соединения (K_dT)

Способы. Пан-Т-клетки человека подвергали криоконсервации в азотных емкостях до применения. Т-клетки размораживали, промывали PBS, ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, подсчитывали (с указанием жизнеспособности) и ресуспендировали при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Краситель Far Red Live/Dead (Life Technologies, также известный как Invitrogen № L34974) (50 мкл DMSO во флакон), добавляли по 1 мкл на 1×10^6 клеток; и блокатор FcR (Miltenyi Biotec, №130-059-901) (1 мл разведения 1:20 на $0,5 \times 10^6$ клеток) добавляли к клеткам в течение 10 минут каждый. Клетки высевали в количестве 50000 клеток/лунку и промывали. К Т-клеткам добавляли возрастающие концентрации антител к

CD3 AlexaFluor488 SP-34 в течение 2 часов при 4 °С. Клетки промывали для удаления несвязанного антитела, фиксировали в течение 15 минут, промывали и ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, содержащем 1 мМ ЭДТК.

Для измерения связывания применяли проточный цитометр iQue Intellicyte. Клетки гейтировали по популяции Т-клеток, затем по синглетам клеток, затем по живым клеткам (FL4). Для каждой лунки определяли среднее геометрическое окрашивания (FL1).

Полученные средние значения интенсивности флуоресценции наносили на график в виде зависимости от концентрации молекулы антитела и анализировали с помощью программного обеспечения Prism в анализе связывания с одним сайтом (общее связывание) (Фиг. 9). Программное обеспечение вычисляет соответствующее значение K_d , которое описывает связывание молекулы антитела с рецептором (CD3 на пан Т-клетках человека), которое подчиняется закону действия массы. Формула выглядит следующим образом: $Y = (B_{max} \times X) / (K_d + X)$; где: B_{max} представляет собой максимальное связывание; K_d представляет собой концентрацию лиганда, необходимую для достижения полумаксимального связывания.

Результаты. Для каждого донора получали значения K_d и получали среднее значение. Константа насыщения связывания (K_dT) для Т-клеток человека составила $5,6 \pm 1,0$ нМ ($n=4$) и была использована в ранее упомянутой формуле для определения аффинности связывания K_d .

Определение аффинности связывания мкАт к CD3 с помощью конкурентного анализа

Способы. Исследования конкурентного связывания проводили с использованием двухвалентных антител к CD3:

Двухвалентные антитела к CD3: CD3B376 и CD3B450 (Фиг. 10)

Для определения аффинности связывания исследуемых мкАт использовали пан Т-клетки человека. Используемое меченое соединение представляло собой коммерчески доступное конъюгированное с AlexaFluor488 антитело к CD3 SP-34 (BioScience, № 557705), и для этого меченого вещества выше описана константа насыщения связывания.

Т-клетки подвергали криоконсервации в азотных емкостях до применения. Т-клетки размораживали, промывали PBS, ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, подсчитывали с указанием жизнеспособности и ресуспендировали при $0,5 \times 10^6$ клеток/мл. Краситель Far Red Live/Dead (Life Technologies, также известный как Invitrogen № L34974) (50 мкл DMSO во флакон), добавляли по 1 мкл на 1×10^6 клеток; и блокатор FcR (Miltenyi Biotec, №130-059-901) (1 мл разведения 1:20 на $0,5 \times 10^6$ клеток) добавляли к клеткам в течение 10 минут каждый. Клетки высевали в количестве 50000 клеток/лунку и промывали.

мкАт (и изотипический контроль) последовательно разводили 1:2 с начальной концентрации 1000 или 200 мкг/мл (2X) и фиксированной концентрации меченого соединения (5 мкг/мл; 2X) смешивали с получением 1X концентраций. Таким образом, конечная (1X) концентрация меченого соединения составляла $2,5 \text{ мкг/мл} = 16,6 \text{ нМ}$. Смесь добавляли к Т-клеткам в течение 2 часов при 4 °С. Клетки впоследствии промывали для

удаления несвязанного антитела, фиксировали в течение 15 минут, промывали и ресуспендировали в окрашивающем буфере для FACS, содержащем 1 мМ ЭДТК.

Для измерения связывания применяли проточный цитометр iQue Intellicyte. Клетки гейтировали по популяции T-клеток, затем по синглетам клеток, затем по живым клеткам (FL4). Для каждой лунки определяли среднее геометрическое окрашивания (FL1). Полученные средние значения интенсивности флуоресценции были нанесены на график в виде зависимости логарифмической концентрации молекулы антитела (преобразованной в нМ) и проанализированы с использованием программного обеспечения Prism в отношении сигмоидальной кривой доза-ответ (переменный угловой коэффициент), из которой получены значения EC50/IC50 (в нМ). Аффинность связывания (K_d) получали с использованием следующей формулы: $K_d = IC50 / (1 + ([T] / K_d T))$, где: K_d представляет собой аффинность конкурента (немеченая молекула); IC50 в нМ исследуемого соединения; [T] представляет собой концентрацию меченого соединения (16,6 нМ); $K_d T$ представляет собой K_d меченого соединения, определяемого по связыванию с насыщением (5,6 нМ для человека).

Получение моноклональных и биспецифических антител

Биспецифические антитела к CD3 по настоящему изобретения можно создавать посредством контролируемого обмена Fab-плечами (FAE), как описано в Labrijn et al., 2013, PNAS, vol. 110(13): 5145-5150; публикации PCT WO 2011/131746; или в Labrijn et al., 2014, Nat Protoc, 9(10):2450-63. Вкратце, в этом способе *in vitro* предложены два полноразмерных исходных двухвалентных антитела, каждое из которых содержит мутацию в области СН3 антитела, способствующую образованию гетеродимера, что приводит к получению биспецифических антител, содержащих полуплечо, из каждого исходного антитела. Мутации, которые могут использоваться для содействия образованию гетеродимеров, представляют собой F405L в одном исходном антителе и R409K в другом исходном антителе для антител IgG1 или F405L и K409R в одном исходном антителе при сохранении СН3 дикого типа для антител IgG4.

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

Исходные антитела очищали с применением колонки с белком А с элюирующим буфером с 100 мМ NaAc, pH 3,5, а также нейтрализующим буфером с 2 М Tris pH 7,5 и 150 мМ NaCl. мкАт обессоливали с использованием колонки PD10 (Sephadex G25M) и диализовали в буфере D-PBS при pH 7,2.

После очистки исходные антитела смешивали в восстанавливающих условиях в 75 мМ цистеамин-HCl и инкубировали при 31 °C в течение 4 часов. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, где заданное количество целевого исходного антитела (например, 10 мг или ~ 71,8 наномолей) было объединено с антителом к CD3 (например, ~ 67,8 наномолей), при этом целевое исходное антитело было добавлено при 6% избытке антитела к CD3. Затем продукты рекомбинации диализовали против PBS для удаления восстановителя. Реакции с биспецифическим антителом выполняли с избытком

целевого исходного антитела (соотношение) для сведения к минимуму количества непрореагировавшего исходного антитела к CD3, оставшегося после рекомбинации. После частичного восстановления исходных мкАт восстановитель удаляли посредством диализа в течение ночи в PBS.

Результаты. На **Фиг. 10** показаны кривые ингибирования для двухвалентных и одновалентных конструкторов к CD3, CD3B376 и CD3B450, конкурирующих за связывание с меченым антителом к CD3 AlexaFluor488 SP-34. Возрастающие концентрации исследуемых антител к CD3 снижали связывание меченого AlexaFluor488 антитела, таким образом снижая среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ). Были получены значения IC50, и с помощью вышеупомянутой формулы были рассчитаны аффинности K_d и сведены в таблицу 13.

Сайт связывания CD3B376 был плотнее, чем CD3B450 как в двухвалентной, так и в одновалентной форме.

Таблица 13. Значения IC50 и аффинности K_d для двухвалентных и одновалентных конструкторов CD3B376 и CD3B450

Конструктор	анти-CD3	IC50 (нМ)	K_d (нМ)
Двухвалентный	CD3B376	29	7,3
	CD3B450	60	15
Одновалентный конструктор	CD3B376	409	103
	CD3B450	1011	254

1-10 Конформационная стабильность моноклональных антител к CD3

Конформационная стабильность антител к CD3 CD3B376, CD3B389 (версия IgG1 от Sigma CD3B376; тяжелая цепь представляет собой SEQ ID NO: 729; легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 676), CD3B450 и CD3B467 (версия IgG1 от Sigma CD3B450; тяжелая цепь представляет собой SEQ ID NO: 728; легкая цепь представляет собой SEQ ID NO: 677) определяли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Среднюю точку теплового перехода, T_m , определяли по профилям тепловой денатурации каждого из АТ-кандидатов. На **Фиг. 12А - Фиг. 12Е** показаны профили тепловой денатурации антител к CD3 в PBS. В таблице 14 приведена сводная информация по T_m и значениям энтальпии (ΔH) теплового разворачивания антител к CD3 при определении с помощью ДСК.

Результаты ДСК демонстрируют, что все антитела к CD3 CD3B376, CD3B389, CD3B450 и CD3B467 имеют свернутые домены. На основании начала разворачивания относительная стабильность каждого антитела была следующей: CD3B389 < CD3B467 < CD3B376 < CD3B450. Молекулы антител к CD3, протестированные с помощью ДСК, продемонстрировали некоторые различия в их термостабильности. Молекула CD3B376 (IgG4 PAA) демонстрировала три частично неразрешенных перехода при 59,7, 62,4 и 69,2°C с общей энтальпией разворачивания 417,6 ккал/моль, тогда как молекула CD3B450 (IgG4 PAA) демонстрировала два неразрешенных перехода при 62,5 и 66,3°C с общей

энтальпией разворачивания 545,1 ккал/моль. Молекула CD3B389 (IgG1sigma) демонстрировала четыре перехода при 54,6, 58,2, 73,1 и 77,1°C с общей энтальпией разворачивания 401,7 ккал/моль, тогда как молекула CD3B467 (IgG1sigma) демонстрировала четыре перехода при 56,3, 59,6, 66,5 и 75,6°C с общей энтальпией разворачивания 406,2 ккал/моль.

Таблица 14. Сводные данные по тепловому переходу для антител к CD3 в PBS. Значения представляют собой средние по результатам повторных измерений. Информация о последовательности представлена для пептидов HC и LC (SEQ ID NO в скобках).

	CD3B376		CD3B450		CD3B389		CD3B467	
	HC: SEQ ID NO: 640		HC: SEQ ID NO: 675		HC: SEQ ID NO: 729		HC: SEQ ID NO: 728	
	LC: SEQ ID NO: 676		LC: SEQ ID NO: 677		LC: SEQ ID NO: 676		LC: SEQ ID NO: 677	
	Средн. значени е	Ошиб ка	Средн. значени е	Ошибк а	Средн. значени е	Ошиб ка	Средн. значени е	Ошибк а
Tm1 (°C)	59,7	0,1	62,5	0,9	54,6	0,1	56,3	0,1
ΔH1 (кал/моль)	151900,0	4200,0	158175,0	64025,0	166150,0	2450,0	98160,0	17840,0
Tm2 (°C)	62,4	0,1	66,3	0,2	58,2	0,1	59,6	0,0
ΔH2 (кал/моль)	202200,0	4300,0	386900,0	71000,0	62050,0	1290,0	72900,0	370,0
Tm3 (°C)	69,2	0,0	Н/д	Н/д	73,5	0,1	66,5	0,0
ΔH3 (кал/моль)	63450,0	2080,0	Н/д	Н/д	101900,0	1600,0	92785,0	6785,0
Tm4 (°C)	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	77,1	0,0	75,6	0,1
ΔH3 (кал/моль)	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д	71560,0	2500,0	142400,0	4800,0
Общее ΔH	601000,0	Н/д	545075,0	Н/д	401660,0	Н/д	406245,0	Н/д

Два антитела IgG1 демонстрируют более низкую стабильность по сравнению с соответствующими антителами IgG4 PAA (при сравнении молекул с одними и теми же переменными доменами) с Tm первого перехода ниже на 5-6 °C (Фиг. 13А и Фиг. 13В и таблица 14).

1-11 Кристаллическая структура Fab CD3B334 в комплексе с N-концевым пептидом CD3e

мкАт к CD3 CD3B334 (CD3H231/CD3L137) модифицировали для повышения индекса «человечности» путем замены ряда каркасных остатков в антителе остатками из человеческой зародышевой линии. В результате этой процедуры было получено антитело CD3B334 со следующими мутациями: D43G/L49M/L50I/S62N/Q85E/H89Y в VL по сравнению с исходной VL CD3L124 и R10G/R13K/V73I/R79K/T83S/L96V в VH по сравнению с исходной VH CD3H219. Меченный гистицином Fab-фрагмент CD3B334

экспрессировали в клетках НЕК 293Ехр1 и очищали с использованием аффинной и эксклюзионной хроматографии. N-концевой 9-мерный пептид человеческого CD3ε синтезировали на пептиде New England (партия V1108-19/21) и смешивали с Fab в молярном соотношении 10:1 (избыток пептида). Комплекс кристаллизовали методом диффузией паров из раствора, содержащего 4 М натрий формиата в 0,1 М Трис, pH 8,5. Указанные кристаллы имеют орторомбическую пространственную группу P212121 с размерами элементарной ячейки 66,5×69,4×100,4 Å и одной молекулой комплекса в асимметричной единице. Структуру комплекса определяли с разрешением 1,8 Å методом молекулярного замещения с использованием кристаллической структуры Fab в качестве поисковой модели.

CD3В334 связывал остатки 1-6 CD3ε. N-концевой Gln пептида находился в форме пироглутамата и в гидрофобной среде между F107 HCDR3 и L99 LCDR3 (**Фиг. 18**). Два остатка аргинина, R52 и R56, из HCDR2, взаимодействовали с электростатическими взаимодействиями с кислыми остатками CD3. Всего, 16 остатков образовывали паратоп CD3В334. Остатки всех CDR, за исключением LCDR2, находились в непосредственном контакте (расстояние в пределах 4 Å) с пептидом CD3 (см. **Фиг. 19**).

2 Антитела к PSMA

2-1 Создание клеточных линий PSMA

Векторы экспрессии, представляющие полноразмерный PSMA шимпанзе (H2Q3K5_PANTR, SEQ ID NO: 49) или полноразмерный PSMA яванского макака (EHH56646.1, SEQ ID NO: 50), были созданы для применения в качестве инструментов скрининга при оценке лидерных антител к PSMA с применением вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Векторы временно трансфицировали в клетки НЕК293F в суспензии с использованием стандартных способов. Трансфицированные суспензионные клетки 293F помещали в среду роста с сывороткой, чтобы они стали прикрепленными, и отбирали для стабильной интеграции плазмиды. Популяции отдельных клеток были отобраны путем серийных разведений, и экспрессия поверхностного рецептора PSMA была количественно определена с помощью FACS с использованием аффинно очищенного кроличьего поликлонального антитела (антитело PSMAL (Центр) (каталог № ОААВ02483, Aviva Systems Biology) в качестве первичного антитела с конъюгированным с R-PE антикроличьим вторичным антителом (каталожный № 111-116-144, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) и кроличьим поликлональным IgG (каталожный № SC-532, Santa Cruz Biotechnology) в качестве изотипического контроля).

Для отбора PSMA-положительных клеток создавали клеточные линии, экспрессирующие человеческий PSMA, с применением лентивируса (Genесороеia, кат. № EX-G0050-Lv105-10), содержащего полноразмерный PSMA человека (FOLH1_HUMAN, SEQ ID NO: 51) и пурамицин. Клетки НЕК293F (ATCC), отрицательные по PSMA, трансдуцировали лентивирусными частицами для сверхэкспрессии PSMA человека. После трансдукции клетки, положительно экспрессирующие PSMA и маркер устойчивости,

отбирали обработкой объединенных клеток, выращивали в среде DMEM+10% HI FBS (Life Technologies) и дополняли различными концентрациями пуромицина (Life Technologies).

Кроме полученных с помощью НЕК линий клеток, для анализов методом фагового пэннинга, и анализов связывания, и клеточной токсичности использовали несколько коммерческих линий клеток. Клетки LNCaP клона FGC (ATCC кат. № CRL-1740) представляют собой коммерчески доступные линии клеток рака предстательной железы человека. Клетки C4-2B были первоначально созданы в MD Anderson, и получены из LNCaP FGC, выращенных *in vivo* и метастазирующих в костный мозг (Thalmann, et al., 1994, Cancer Research, 54, 2577-81).

2-2 Получение растворимого белка ВКД PSMA

Рекомбинантный белок внеклеточный домен (ВКД) PSMA шимпанзе (ВКД PSMA шимпанзе, SEQ ID NO: 52) создавали для пэннинга и оценки лидерных антител к PSMA с применением вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методики молекулярной биологии. Фрагмент гена ВКД PSMA шимпанзе (аминокислоты 44-750 из SEQ ID NO: 49) с N-концевой сигнальной последовательностью (SEQ ID NO: 594), N-концевую авидиновую метку (SEQ ID NO: 595) и 6-гистидиновыми метками (SEQ ID NO: 596) клонировали с использованием вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV, используя стандартные методы молекулярной биологии и временно экспрессировали в клетки 293Expi (Invitrogen). кДНК получали с использованием методов генного синтеза (патент США № 6670127; патент США № 6,521,427). Супернатанты собирали и очищали путем центрифугирования. Белки очищали с использованием двухэтапного способа очистки: 1) очистка IMAC с помощью колонки HisTrap HP (GE Healthcare) и 2) очистка исключения размера (Superdex 200, Ge Healthcare), где элюирующий буфер представляет собой фосфатно-солевой буфер Дульбекко, кальций, магний (ThermoFisher, № 14040), содержащий 0,5 мМ ZnCl₂ для стабилизации димеризации PSMA. Фракции, содержащие интересующий белок, объединяли и определяли концентрацию белка посредством A280. Этот материал использовали для измерения связывания и аффинности и обозначили как PSMG8.

ВКД PSMA шимпанзе также биотинилировали для пэннинга. Плазмиду BirA, которую котрансфицировали в клетки млекопитающих в биотинилированные белки, содержащие авидиновую метку, получали самостоятельно. Кодировующую область BirA (SEQ ID NO: 597) сливали с сигнальным пептидом из тяжелой цепи мышиного IgG (SEQ ID NO: 598) и сигналом удерживания ЭР (KDEL (SEQ ID NO: 716)) добавляли к C-концу для получения плазмиды BirA (SEQ ID NO: 599). Сконструированный ген клонировали в вектор экспрессии под контролем промотора CMV. Для получения биотинилированного антигена PSMA плазмидную ДНК PSMA добавляли в 4-кратном избытке (мас./мас.) к плазмиде BirA в смесь для трансфекции.

Биотинилирование белка ВКД PSMA шимпанзе проводили с помощью авидиновой метки путем котрансфекции конструкции экспрессии BirA, и полученный

секретированный белок очищали с применением двухэтапного процесса очистки: 1) очистка ИМАС с помощью колонки HisTrap HP (GE Healthcare) и 2) очистка исключения размера (Superdex 200, Ge Healthcare), где элюирующий буфер представляет собой фосфатно-солевой буфер Дульбекко, кальций, магний (ThermoFisher, № 14040), содержащий 0,5 мМ ZnCl₂ для стабилизации димеризации PSMA. Перед использованием в исследованиях методом фагового пэннинга белок был протестирован на эндотоксин.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен (ВКД) PSMA (ВКД PSMA яванского макака, SEQ ID NO: 53), соответствующий аминокислотам 44-750 SEQ ID NO: 50 с N-концевым сигналом (SEQ ID NO: 594), N-концевые авидиновые (SEQ ID NO: 595) и 6-гистидиновые (SEQ ID NO: 596) метки клонировали и экспрессировали, как описано ранее для ВКД PSMA шимпанзе. Биотинилирование белка ВКД PSMA яванского макака выполняли с помощью авидиновой метки путем котрансфекции конструкта экспрессии BirA, и полученный секретированный белок очищали двухэтапной очисткой с использованием колонки ИМАС HisTrap HP (GE Healthcare) и колонок MonoAvidin. Перед использованием в исследованиях методом фагового пэннинга белок был протестирован на эндотоксин. Этот материал также использовали для измерения связывания и аффинности и обозначили как PSMG1.

Второй рекомбинантный белок ВКД PSMA яванского макака (PSMA яванского макака с Fc, SEQ ID NO: 54) с Fc IgG1 (SEQ ID NO: 593) клонировали и экспрессировали с использованием вектора экспрессии собственной разработки с промотором CMV с использованием стандартных методов молекулярной биологии. Белок PSMA яванского макака с Fc временно экспрессировался в клетках 293НЕК-expr1. Продукт временной трансфекции PSMG3 в клетках НЕК293.Еxр1 собирали через 5 суток после трансфекции, осветляли центрифугированием (30 мин, 6000 об/мин) и фильтровали (0,2 мкм мембрана из полиэфирсульфона, Corning). Относительное количество IgG определяли с помощью прибора Octet (ForteBio) с использованием очищенного известного IgG (того же изотипа), добавленного в отработанную среду для построения стандартной кривой.

Осветленный супернатант с PSMA яванского макака с Fc загружали в уравновешенную (dPBS, pH 7,2) колонку HiTrap MabSelect Sure Protein A (GE Healthcare) при относительной концентрации ~ 30 мг белка на мл смолы. После загрузки колонку промывали в dPBS при pH 7,2, и белок элюировали с использованием 10 объемов колонки 0,1 М натрий ацетата, pH 3,5. Фракции пика объединяли, нейтрализовали 2М трис, pH 7, и фильтровали (0,2 мкм). Нейтрализованный образец белка подвергали диализу против 3 замен dPBS, содержащего Ca²⁺, Mg²⁺ и 0,5 мМ ZnCl₂, pH 7,2, в течение ночи при 4 °С. На следующий день образец снимали с диализа, фильтровали (0,2 мкм) и определяли концентрацию белка по оптической плотности при 280 нМ на спектрофотометре BioTek SynergyHTTM. Качество очищенных белков оценивали методами ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (система ВЭЖХ Dionex). Уровни эндотоксина измеряли с помощью LAL-теста (Pyrotell-T, Associates of Cape Cod). Очищенные белки хранили при 4 °С.

Рекомбинантный белок внеклеточный домен PSMA человека (ВКД) (ВКД PSMA человека, SEQ ID NO: 55), соответствующий аминокислотам 44-750 из SEQ ID NO: 51 с N-концевыми авидиновыми и б-гистиридиновыми метками (SEQ ID NO: 596) клонировали, экспрессировали и очищали так, как описано ранее для белков ВКД PSMA шимпанзе и яванского макака.

2-3 Идентификация Fab к PSMA шимпанзе и человека

Пэннинг с рекомбинантным белком

Пэннинг в растворе полученных de novo библиотек человеческого Fab-pIX [Shi, L., et al J Mol Biol, 2010. 397(2): p. 385-396. WO 2009/085462], состоящую из библиотек тяжелых цепей VH1-69, 3-23 и 5-51, спаренных с четырьмя библиотеками генов VL человеческой зародышевой линии (A27, B3, L6, O12), выполняли с использованием подхода чередующегося пэннинга с одним циклом захвата фага на стрептавидиновых гранулах (Invitrogen, кат. № 112.05D, партия № 62992920), покрытых биотинилированным ВКД PSMA шимпанзе в соответствии с протоколом производителя, с последующим захватом фага на гранулах ProtG (Invitrogen, кат. № 10003D), покрытых PSMA яванского макака с Fc в соответствии с протоколом производителя с последующим захватом фага на магнитных нейтравидиновых гранулах Sera-mag Double Speed (Thermo, кат. № 7815-2104-011150), покрытых биотинилированным ВКД PSMA шимпанзе в соответствии с протоколом производителя. В результате пэннинга получили два отобранных соединения: PSMM18 и PSMM25.

Цельноклеточный пэннинг Fab к PSMA

Дополнительные эксперименты с пэннингом проводили на целых клетках с использованием выходных данных Раунда № 1 описанных выше экспериментов с пэннингом ВКД шимпанзе или только полученных библиотек фагов de novo в качестве входных данных. Вкратце, фаг получали посредством инфекции хелперного фага и концентрировали посредством осаждения с помощью ПЭГ/NaCl в соответствии со стандартными протоколами, известными в данной области техники. Фаговые библиотеки предварительно очищали на нетрансфицированных исходных клетках HEK293F в течение ночи при 4°C с осторожным покачиванием. После осаждения с помощью ПЭГ/NaCl предварительно очищенные библиотеки инкубировали с PSMA-экспрессирующими клетками HEK293 или клетками LNCAP при осторожном покачивании в течение 2 ч при 4 °C. Удаление несвязанного фага и выделение связанных с фагом клеток проводили с помощью градиента фикола, и после нескольких стадий промывки клетки, несущие связанный фаг, инкубировали с 1 мл культуры TG-1 E. coli при 37°C в течение 30 минут без встряхивания. Полученную смесь высевали на чашки с лизогенным бульоном с карбенициллином и 1% глюкозой и выращивали в течение ночи при 37 °C. Затем процесс повторяли для последующих раундов пэннинга.

Преобразование фага Fab-pIX в Fab-His для получения супернатантов E. coli

Полученные отобранные соединения из фагов Fab-pIX превращали в Fab-His с использованием стандартной процедуры. Плазмидную ДНК выделяли из E. coli,

используемой в фаговом пэннинге, (набор Plasmid Plus Maxi Kit, Qiagen, кат. № 12963) и подвергали расщеплению рестриктазами NheI/SpeI. Полученные фрагменты размером 5400 и 100 п. н. разделяли на агарозном геле с концентрацией 0,8% и фрагмент из 5400 п. н. очищали на геле (набор MinElute PCR Purification Kit, Qiagen, кат. № 28006). Очищенную полосу размером 5400 п.н. подвергали самолигированию с использованием лигазы T4, и полученный продукт (кодирующий гибрид Fab-his) снова трансформировали в штамм E.coli TG-1 и клонировали. Супернатанты Fab-His создавали из клонов путем индукции в течение ночи культур с помощью 1 mM IPTG. После центрифугирования культивируемой в течение ночи культуры осветленные супернатанты были готовы для использования в последующих анализах. Для определения относительных уровней экспрессии различных супернатантов Fab-his проводили ИФА к каппа (Southern Biotech, кат. № 2061-05) на серийно разведенных супернатантах. Все протестированные клоны продемонстрировали сходную экспрессию Fab-his (данные не показаны).

Клеточное связывание гибридов Fab-his из E. coli

Для оценки способности связывания отдельных гибридов Fab-his из супернатантов E.coli с клетками, экспрессирующими PSMA, был разработан клеточный анализ связывания. Отдельные клоны Fab выделяли из раунда 3 всех экспериментов с пэннингом после вырезания pIX. Клоны Fab тестировали на связывание с клетками НЕК, экспрессирующими PSMA шимпанзе и яванского макака, а также с PSMA человека на клетках LNCaP. Вкратце, клетки, экспрессирующие PSMA, помещали в аликвоты планшета с V-образным дном (CoStar 3357) при плотности 200000 на лунку и инкубировали с (100 мкл) супернатантами, экспрессирующими Fab-фрагменты, в течение 1 часа на льду. Клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS, и окрашивали конъюгированным с RPE мышинным антителом к человеческой легкой цепи каппа (Life Technologies, кат. № MH10514) в течение 1 часов на льду. Клетки дважды промывали PBS, содержащим 2% FBS, и ресуспендировали в 100 мкл того же промывочного буфера. Планшеты считывали на проточном цитометре BD FACS. Данные FACS были проанализированы в программном обеспечении FlowJo путем гейтирования нормальной популяции клеток в реальном времени с использованием прямого и бокового рассеяния, а затем анализа клеток внутри этого гейта на окрашивание PE. Рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ) и экспортировали в Microsoft Excel. Клоны Fab, которые проявляли ≥ 3 -кратный фон связывания для всех трех видов PSMA (яванского макака, шимпанзе и человека) и не проявляли связывания с линией клеток НЕК293, были помечены как «предварительно положительные». Fab секвенировали и переносили для клонирования в вектор экспрессии млекопитающих для повторного скрининга. Истинно положительные результаты были выбраны из связывания супернатантов Fab, экспрессируемых клетками млекопитающих, с линиями клеток, экспрессирующими PSMA.

Получение Fab млекопитающих

Для преобразования Fab E.coli в экспрессируемый млекопитающими Fab

использовали In-Fusion HD Cloning (ClonTech, кат. № 638918) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, нуклеотидные последовательности клонов, которые прошли первичный скрининг и должны быть переведены в формат Fab млекопитающих, загружаются в программу «InFu Primer Finder v1.2.3» (программное обеспечение, разработанное самостоятельно), которая генерирует перечень изотип-специфических праймеров для ПЦР, используемых для создания ПЦР-фрагментов для клонирования In-Fusion в векторы экспрессии huKappa_muIgGSP и huG1 Fab. Эти векторы представляют собой векторы собственной разработки с промоторами CMV на основе pcDNA3.1. После процесса In-fusion клоны E. coli выделяли, последовательность проверяли и трансфицировали в клетки HEK293, используя стандартные протоколы. Fab к PSMA млекопитающих для подтверждения связывания с линиями клеток, экспрессирующими PSMA, получали путем сбора 20 мл супернатантов через 5 суток после трансфекции.

Повторный скрининг отобранных вариантов из цельноклеточного скрининга в формате супернатантов клеток млекопитающих

Подтверждение наличия супернатантов Fab, экспрессируемых клетками млекопитающих, выполняли с использованием анализа связывания целых клеток, описанного ранее. Исследовали связывание Fab с клетками PSMA человека (LNCaP), шимпанзе и яванского макака, а также проводили обратный скрининг на отсутствие связывания с исходной клеточной линией HEK. В таблице 19 показан профиль отобранных соединений в отношении связывания супернатанта Fab млекопитающих с PSMA-экспрессирующими клетками. Многие отобранные соединения из супернатантов E. coli не подтверждаются белками, экспрессируемыми млекопитающими. PSMM48 продемонстрировало высокое связывание с клетками, экспрессирующими PSMA яванского макака, и некоторое связывание с клетками, экспрессирующими PSMA шимпанзе, но отсутствие связывания с клетками LNCaP, экспрессирующими PSMA человека. PSMM56 продемонстрировал аналогичный профиль, но с некоторым связыванием с клетками LNCaP. PSMM69-80 связывается с клетками LNCaP, но не с клетками, экспрессирующими PSMA шимпанзе или яванского макака. Супернатанты Fab млекопитающих PSMM52, M56 и M57 связывались со всеми тремя клеточными линиями. PSMM50, M51 и M54 демонстрируют большее связывание с клетками шимпанзе или яванского макака. M58 демонстрировало незначительное связывание с клетками шимпанзе и яванского макака.

Таблица 19. Профиль отобранных соединений связывания белка Fab млекопитающих с клетками, экспрессирующими PSMA по данным измерения гео-СИФ (средняя флуоресцентная интенсивность)

<u>ID Fab (ID ДНК Fab)</u>	<u>Яванский макак</u>	<u>Шимпанзе</u>	<u>LNCaP</u>	<u>Исходная HEK</u>
PSMB10 (PSMM10)	244	81,6	-	248
PSMB11 (PSMM11)	19	6,6	-	8,14
PSMB12 (PSMM12)	31,6	8,05	-	12,6

PSMB13 (PSMM13)	57,8	18,2	-	50,5
PSMB14 (PSMM14)	32,6	13,1	-	22,2
PSMB15 (PSMM15)	40,4	18,5	-	38
PSMB16 (PSMM16)	175	220	-	6,39
PSMB17 (PSMM17)	34,9	22,4	-	40,1
PSMB18 (PSMM18)	696	439	-	8,71
PSMB19 (PSMM19)	53,7	-	5,15	4,47
PSMB20 (PSMM20)	5,75	-	5,85	41,3
PSMB21 (PSMM21)	94,4	-	20,7	372
PSMB22 (PSMM22)	9,07	-	7,92	54,9
PSMB23 (PSMM23)	16,4	-	6,66	164
PSMB24 (PSMM24)	14,6	9,6	4,09	3,96
PSMB25 (PSMM25)	15,2	11,3	16,9	4,09
PSMB26 (PSMM26)	9,48	-	7,26	114
PSMB27 (PSMM27)	20	-	7,56	136
PSMB28 (PSMM28)	29,7	-	8,88	302
PSMB29 (PSMM29)	6,87	-	5,7	72,8
PSMB30 (PSMM30)	5,16	-	4,58	45
PSMB31 (PSMM31)	5,99	-	-	25,5
PSMB32 (PSMM32)	4,81	-	-	27,1
PSMB33 (PSMM33)	5,14	-	-	40,1
PSMB34 (PSMM34)	17,9	-	-	107
PSMB35 (PSMM35)	58,5	-	-	231
PSMB36 (PSMM36)	5,05	-	-	6,96
PSMB37 (PSMM37)	23,4	-	-	178
PSMB38 (PSMM38)	4,05	-	-	7,7
PSMB39 (PSMM39)	10,2	-	-	166
PSMB40 (PSMM40)	66,9	-	-	348
PSMB41 (PSMM41)	5,39	-	-	12
PSMB42 (PSMM42)	7,35	-	-	25,8
PSMB43 (PSMM43)	8,73	-	-	7,18
PSMB44 (PSMM44)	12,6	-	-	48,9
PSMB45 (PSMM45)	22,4	-	-	43,1
PSMB46 (PSMM46)	3,88	-	-	5,29
PSMB47 (PSMM48)	101	25,5	3,46	2,85

PSMB48 (PSMM49)	2,72	3,18	2,68	2,72
PSMB49 (PSMM50)	51,6	22	3,22	3,48
PSMB51 (PSMM52)	285	231	41,5	2,68
PSMB52 (PSMM53)	39,2	6,89	2,67	2,56
PSMB53 (PSMM54)	27,6	17,8	4	2,6
PSMB54 (PSMM55)	2,7	2,75	2,65	2,79
PSMB55 (PSMM56)	226	180	17,2	2,58
PSMB56 (PSMM57)	95,6	34,7	24,5	2,52
PSMB57 (PSMM58)	19,8	11	3,26	2,68
PSMB58 (PSMM59)	121	192	25,3	2,67
PSMB59 (PSMM60)	4,96	9,69	6,04	3
PSMB60 (PSMM61)	2,28	3,07	87,3	4,64
PSMB61 (PSMM62)	2,1	3,16	135	2,98
PSMB62 (PSMM63)	7,17	4,43	54,9	9,09
PSMB63 (PSMM64)	2,07	2,95	27	2,82
PSMB64 (PSMM65)	2,39	3,26	70,5	3,05
PSMB65 (PSMM66)	2,3	3,13	32,4	4,25
PSMB66 (PSMM67)	2,14	3	24,6	2,83
PSMB67 (PSMM68)	2,23	2,95	21	2,95
PSMB68 (PSMM69)	5,44	-	134	35,3
PSMB69 (PSMM70)	2,29	3,38	25,5	3,35
PSMB70 (PSMM71)	2,22	3,49	15,5	3,26
PSMB71 (PSMM72)	2,54	4,4	18,5	3,07
PSMB72 (PSMM73)	2,13	3,53	227	3,02
PSMB73 (PSMM74)	2,97	4,13	125	11,1
PSMB74 (PSMM75)	120	-	178	132
PSMB75 (PSMM76)	2,99	3,04	173	7,89
PSMB76 (PSMM77)	3,75	3,99	138	3,95
PSMB77 (PSMM78)	4,68	3,96	144	4,71
PSMB78 (PSMM79)	25,2	-	378	24,4
PSMB79 (PSMM80)	38,4	-	512	157
PSMB80 (PSMM81)	19,6	18,6	20,9	6,61
PSMB81 (PSMM82)	2,63	2,06	4,07	2,69
PSMB82 (PSMM83)	2,79	2,23	4,11	2,76
PSMB83 (PSMM84)	2,59	2,28	4,09	2,74

PSMB84 (PSMM85)	750	729	192	3,15
PSMB85 (PSMM86)	2,84	2,59	2,33	3,24
PSMB86 (PSMM87)	224	176	31,7	2,82
PSMB87 (PSMM88)	2,63	2,27	4,23	2,91
PSMB88 (PSMM89)	37,7	29,7	30,3	7,6
PSMB89 (PSMM90)	27,1	27,3	53,2	39,5
PSMB90 (PSMM91)	26,7	24,7	47,1	36,4
PSMB91 (PSMM92)	8,97	6,16	13	6,63
PSMB92 (PSMM93)	20	16,5	57,1	50
PSMB93 (PSMM94)	5,13	9,62	2,5	3,66
PSMB94 (PSMM95)	5,12	2,67	2,22	3,57
PSMB95 (PSMM96)	8,9	8,82	13,4	11,4
PSMB96 (PSMM97)	2,4	3,25	2,53	4,03
PSMB97 (PSMM98)	2,57	4,73	2,52	3,7
PSMB99 (PSMM100)	9,95	2,4	2,39	4,03
PSMB100 (PSMM101)	4,03	2,52	2,33	3,37
PSMB100 (PSMM101)	3,5	2,86	2,48	4,57
PSMB101 (PSMM102)	5,49	3,18	2,23	3,33
PSMB102 (PSMM103)	2,4	2,42	2,16	3,2
PSMB103 (PSMM104)	3,52	3,26	2,58	4,44
PSMB104 (PSMM105)	2,15	2,5	2,34	3,95
PSMB105 (PSMM106)	2,03	2,39	2,18	3,39
PSMB106 (PSMM107)	2	2,4	2,27	3,59
PSMB107 (PSMM108)	2	2,47	2,33	3,49
PSMB108 (PSMM109)	2	2,58	2,28	3,46
PSMB109 (PSMM110)	321	326	34,9	6,11
PSMB110 (PSMM111)	2,3	2,31	2,31	3,4
PSMB111 (PSMM112)	2,32	2,31	-	3,21
PSMB112 (PSMM113)	6,28	5,7	2,71	3,28
PSMB113 (PSMM114)	2,82	2,95	2,32	3,29
PSMB114 (PSMM115)	2,78	2,47	4,3	3,14
PSMB115 (PSMM116)	2,66	2,59	2,2	3,14
PSMB46 (PSMM117)	4,54	3,18	2,21	4,79
PSMB67 (PSMM118)	3,95	4,3	3	6,13
PSMB74 (PSMM119)	7,94	13	3,16	12,5

PSMB78 (PSMM120)	5,08	4,79	22,3	6,82
PSMB81 (PSMM121)	3,66	3,83	3,05	5,11
PSMB82 (PSMM122)	15,1	28,4	10,8	24,3
PSMB83 (PSMM123)	37,5	42,1	3,04	4,88
PSMB85 (PSMM124)	34,6	52,9	20,7	46,8
PSMB87 (PSMM125)	4,23	3,74	2,26	4,73
PSMB89 (PSMM126)	51,8	53,1	11,7	6,27
PSMB90 (PSMM127)	42,8	30,2	7,74	5,99
PSMB91 (PSMM128)	3,9	27,6	2,37	4,32
PSMB92 (PSMM129)	45,7	37,3	12,1	7,4
PSMB93 (PSMM130)	5,13	7,85	4,11	7,82
PSMB94 (PSMM131)	3,67	3,23	2,32	4,72
PSMB95 (PSMM132)	4,05	3,64	2,56	5,57
PSMB96 (PSMM133)	3,91	4,54	2,37	4,65
PSMB97 (PSMM134)	3,22	3,16	4,08	4,22
PSMB98 (PSMM135)	15,6	12,7	2,22	4,21
PSMB99 (PSMM136)	4,08	3,26	2,22	5,04
PSMB100 (PSMM137)	5,24	3,82	2,16	4,83
PSMB101 (PSMM138)	3,84	3,14	2,23	4,52
PSMB102 (PSMM139)	4,51	3,82	2,23	4,59
PSMB103 (PSMM140)	6,81	4,27	2,21	5,41
PSMB104 (PSMM141)	7,52	4,35	2,26	4,39
PSMB105 (PSMM142)	5,03	11,2	4,87	7,28
PSMB106 (PSMM143)	3,87	3,8	2,73	4,9
PSMB107 (PSMM144)	3,3	3,35	2,3	4,64
PSMB108 (PSMM145)	6,78	3,83	2,33	4,98
PSMB110 (PSMM146)	4,03	3,23	2,28	5,3
PSMB111 (PSMM147)	3,71	3,26	2,36	5,11
PSMB112 (PSMM148)	4,54	3,26	2,26	4,86
PSMB113 (PSMM149)	84,3	104	51,7	94,2
PSMB114 (PSMM150)	3,31	3,26	2,21	5,14
PSMB115 (PSMM151)	3,55	3,43	2,3	4,21

Кривые доза-ответ для Fab, экспрессируемых млекопитающими

После подтверждения положительного связывания клонов Fab, экспрессируемых млекопитающими, в виде чистых супернатантов Fab с линиями клеток, экспрессирующих

PSMA, супернатанты нормализовали по концентрации белка с помощью Octet или белкового геля, и строили кривые доза-ответ для подтверждения связывания PSMA с использованием протокола, описанного ранее. На **Фиг. 23 - Фиг. 25** показаны кривые титрования для отобранных соединений, которые продемонстрировали связывание со всеми тремя PSMA-экспрессирующими клетками. На **Фиг. 23А, 23В, 23С и 23D** показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток LNCaP. На **Фиг. 24А, 24В, 24С и 24D** показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток HEK, экспрессирующих PSMA шимпанзе. На **Фиг. 25А, 25В, 25С и 25D** показаны кривые титрования для отобранных при помощи фагового пэннинга соединений к PSMA и клеток HEK, экспрессирующих PSMA яванского макака. Профили связывания среди отобранных соединений сравнивали между линиями клеток, экспрессирующими различные виды PSMA. В экспериментах в качестве положительного контроля использовали супернатант PSMM52. Некоторые отобранные соединения были лишены приоритета из-за N-связанных сайтов гликозилирования в CDR, связывания с PSMA-отрицательной исходной клеточной линией HEK или отсутствия связывания с PSMA-положительными клеточными линиями. Оставалось одиннадцать отобранных Fab, а 10 последовательностей отобранных соединений клонировали в конструкции тяжелой цепи человеческого IgG4 PAA и использовали для создания биспецифических антител к PSMA×CD3. Эти отобранные соединения продемонстрировали межвидовое связывание в пределах 3 раз относительно друг от друга и были перенесены в формат биспецифических антител для тестирования на предмет перенаправления Т-клеток, уничтожающих PSMA-положительные мишени. Антигены для пэннинга для каждого отобранного соединения показаны в таблице 20.

Таблица 20. Антиген для каждого из отобранных при помощи фагового пэннинга соединений

Антиген раунда 1	Антиген раунда 2-3	Отобранные соединения	Идентификация отобранных соединений
ВКД PSMA шимпанзе	ВКД PSMA яванского макака	2	PSMM18, PSMM25
ВКД PSMA шимпанзе	HEK, экспрессирующие PSMA шимпанзе	9	PSMM50, PSMM52, PSMM57, PSMM59, PSMM110, PSMM56, PSMM85, PSMM84
LNCaP	HEK, экспрессирующие PSMA шимпанзе	2	PSMM87, PSMM81

Получение мкАт к PSMA

Всего 12 клонов, которые продемонстрировали связывание со всеми тремя клетками, экспрессирующими PSMA, в конечном итоге были преобразованы в мкАт IgG4, имеющее замены в Fc изоформа S228P, F234A и L235A (PAA), посредством рестрикционного клонирования. Вкратце, конструкции, соответствующие клонам Fab,

прошедшим первоначальный скрининг, расщепляли HindIII и ApaI. Очищенные в геле фрагменты лигировали в вектор экспрессии с промотором CMV vDR000215, вектором экспрессии, управляемым CMV, содержащим человеческий Fc IgG4-ПАА, для экспрессии полноразмерного мкАт. Это позволило быстро получить биспецифические антитела. Ранее описанный вектор экспрессии использовали для экспрессии тяжелой и легкой цепей для каждого мкАт к PSMA, при этом оба вектора временно котрансфицировали в линии клеток 293Expi или CHO для экспрессии мкАт. Последовательности CDR межвидовых положительных Fab к PSMA, полученных в результате фагового пэннинга, показаны ниже в таблице 21. Последовательности VH и VL выбранных Fab приведены ниже в таблице 22. Последовательности тяжелой и легкой цепей мкАт, полученных из Fab, показаны в таблице 23.

Таблица 21. Последовательности CDR (определенные по Kabat) антител после фагового пэннинга (соответствующие SEQ ID NO перечислены в скобках)

ID FAB		CDR (SEQ ID NO:)		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB109	HC	NAWIS (62)	WINPESGRANYAQKF QG (63)	ELYLVYSTYYYAFDY (64)
	LC	RASQSIDRWLN (65)	AASSLQS (60)	QQSPRYPLT (66)
PSMB86	HC	SYDIS (67)	GIPIEGTANYAQKFQ G (68)	DYPAGYGFYD (69)
	LC	RASQSVSSSYLA (70)	GASSRAT (71)	QQYGSSPLT (72)
PSMB84	HC	SDWMS (73)	AISGNGGSTHEYADSV KG (74)	DPYYYYDGDSDSYGMD V (75)
	LC	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (60)	QQSYSTP (61)
PSMB83	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSV KG (79)	DSYDSSLYVGDYFDY (80)
	LC	RASQSVSSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB56	HC	SYAIS (84)	WISPYNGNANYAQKF QG (85)	DSDRSYNLDY (86)
	LC	RASQSIGWLN (87)	AASSLQS (60)	QQSYSTPLT (88)

PSMB55	HC	SYWIG (89)	IIPGSDSDTRYSPSFQG (90)	GLPIWYLDY (91)
	LC	RASQSVASDLA (92)	FASNRAT (93)	QQSITWPFT (94)
PSMB51	HC	SYAIS (95)	WIIPYNGNANYAQKF QG (96)	VNSAALVWERLDY (97)
	LC	RASQSIDRWLN (65)	AASSLQS (60)	QQSPRYPLT (66)
PSMB49	HC	SYAIS (84)	GIPIFGTANYAQKFQ G (98)	ASRVWHASYGYLDY (99)
	LC	RASQSVSKWLA (100)	DASNRAT (82)	QQRFTAPWT (101)
PSMB25	HC	SYWIG (89)	IIPGSDSDTRYSPSFQG (90)	GWAYDRGLDY (102)
	LC	KSSQSVLYSSNN KNYLA (103)	WASTRES (104)	QQYYSTPLT (105)
PSMB18	HC	SYWIG (89)	IIPGSDSDTRYSPSFQG (90)	AYHYSKGLDY (106)
	LC	KSSQSVLYSSNN KNYLA (103)	WASTRES (104)	QQYYSTPLT (105)
PSMB80	HC	DY AIS (107)	RIDPIEGTANYAQKFQ G (108)	DRYYYDGVYWYSDYF DY (109)
	LC	RASQSISSYLN (76)	AASSLQS (60)	QQSYSTPLT (88)
PSMB58	HC	SYWIS (56)	IIPGDSYTRYSPSFQG (57)	DYEWELFDSRLDY (58)
	LC	RASQSISSYLN (59)	AASSLQS (60)	QQSYSTP (61)

Таблица 22. Последовательности VH и VL Fab к PSMA

ID FAB	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB10 ⁹	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAIWVRQAPGQG LEWMGWISPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLR EDTAVYYCARVNSAALVWERL	110	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQSID RWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL	111

	DYWGQGTLTVSS		TISSLQPEDFATYYC QQSPRYPLTFGQGTK VEIK	
PSMB86	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFKSYDISWVRQAPGQG LEWMGGIPIEGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDYPAGYGFQDYWGQG TLTVSS	112	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSCRASQSVSS SYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQ QYGSSTPLTFGQGTK VEIK	113
PSMB84	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFSDWMSWVRQAPGKGL LEWVSAISGNGGSTEYADSVKGL RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDPYYYDGDSDYY GMDVWGQGTLLTVSS	114	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQ SYSTPLTFGQGKVE IK	115
PSMB83	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKGL LEWVSEISGSGGYTNYADSVKGL RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYF DYWGQGTLTVSS	116	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLNWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGK VEIK	117
PSMB80	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFDDYAIWVRQAPGQG LEWMGRIDPIEGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDRYYYDGVYVWYS DYFDYWGQGTLLTVS	118	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQ SYSTPLTFGQGKVE IK	119
PSMB58	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWISWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDSYTRYSPSFQGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYCARDYEWELFDSRLDYW GQGTLLTVSS	120	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQSISS YLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVP SRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQ SYSTPLTFGQGKVE IK	115
PSMB56	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSYAIWVRQAPGQG LEWMGWISPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARSDRSYNLDYW GQGTLLTVSS	121	DIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCRASQSISS GWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSYSTPLTFGQGK VEIK	122
PSMB55	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK	123	EIVLTQSPATLSLSPG	124

	GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARGLPIWYLDYWGQGT LTVVSSA		ERATLSCRASQSVAS DLAWYQQKPGQAP RLLIYFASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QSITWPFTFGQGTKV EIK	
PSMB51	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQG LEWMGWIIYPYNGNANYAQKFQ GRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARVNSAALVWERL DYWGQGT LTVVSS	125	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSID RWLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYC QQSPRYPLTFGQGTK VEIK	111
PSMB49	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC KASGGTFSSY AISWVRQAPGQG LEWMGGIIPFGTANYAQKFQGR VTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARASRVWHASYGYLDY WGQGT LTVVSS	126	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSK WLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRFTAPWTFGQGTK VEIK	127
PSMB25	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARGWAYDRGLDYWGQ GTLTVVSS	128	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIK	129
PSMB18	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCK GSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARAYHYSKGLDYWGQ GTLTVVSS	130	DIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQSVL YSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLIYWAS TRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAE DVAVYYCQQYYSTPL TFGQGTKVEIK	131

Таблица 23. Последовательности тяжелой и легкой цепей моноклональных антител к PSMA с соответствующими SEQ ID NO

ID мкАт	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB129 (FAB PSMB109)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSKKASGGTFSSY AISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSED TAVYYCA RVNSAALVWERLDYWGQG TLTVVSSASTKGPSVFPLAPC	132	DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRASQSIDRWLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSP RYPLTFGQGTKVEIKRTV AAPS VFIFPPSDEQLKSGT	133

	<p>SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDPHKPSNTKV DKRVEVKYGPCCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK</p>		<p>ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	
<p>PSMB130 (FAB PSMB86)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFKSYDISWVRQ APGQGLEWMGGIPIEGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAR DYPAGYGFYWGQGLVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPHKPSNTKVDKRV E SKYGPCCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ E GNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLGLGK</p>	134	<p>EIVLTQSPGTLSPGERA TLSCRASQVSSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	135
<p>PSMB128 (FAB PSMB84)</p>	<p>EVQLLESQGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFDSWMSWVRQ APGKGLEWVSAISGNGGSTE YADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRRAEDTAVYYCAR DPYVYDGDSDYGMVWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDPHKPSNT KVDKRVESKYGPCCPPCPAP</p>	136	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	137

	EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYK TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK			
PSMB127 (FAB PSMB83)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRRAEDTAVYYCAR DSYDSSLVGDYFDYWGGQ TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWXVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	138	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	139
PSMB126 (FAB PSMB80)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFDDYAIWVR QAPGQGLEWMGRIDPIEGTA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDVAVYYCA RDRYYDGVYWYSDYFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG	140	DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	137

	<p>LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLG K</p>			
<p>PSMB124 (FAB PSMB56)</p>	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWISPYNGNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDNAVYYCA RDSDRSYNLDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK</p>	<p>141</p>	<p>DIQMTQSPSSLSASVGRDR VTITCRASQSIGWLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSY STPLTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>142</p>
<p>PSMB123 (FAB PSMB55)</p>	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDSSTR YSPSFQGGVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARG LPIWYLDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSES TAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVDVVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFN NSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK</p>	<p>143</p>	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVASDLAWYQ QKPGQAPRLLIYFASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQSIT WPFTFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	<p>144</p>

	NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK			
PSMB122 (FAB PSMB51)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGWIPYNGNA NYAQKFQGRVTITADESTST AYMELSSLRSEDNAVYYCA RVNSAALVWERLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDPHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDPEVQF NRYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	145	DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCRASQSIDRWLNWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQSP RYPLTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	133
PSMB121 (FAB PSMB49)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIPIFGTAN Y AQKFQGRVTITADESTSTA Y MELSSLRSEDNAVYYCAR ASRVWHASGYLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNVDPHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSDPEVQF NRYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	146	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSKWLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQRF TAPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	147
PSMB120 (FAB	EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGIIYPGDS DTR	148	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI	149

PSMB25)	<p>YSPSFQGGQVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARG WAYDRGLDYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPHKPSNTKVDKRVE SKYGPPCPPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTP EVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK</p>	<p>YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPS VFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE C</p>	
PSMB119 (FAB PSMB18)	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGDS DTR YSPSFQGGQVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARA YHYSKGLDYWGQGLTVTVS SASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDPHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTP EVC VVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD S DGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSLGK</p>	<p>150</p> <p>DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPS VFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGE C</p> <p>149</p>	
PSMB87 (FAB PSMB58)	<p>EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWISWVRQ MPGKGLEWMGHIYPGDSYTR YSPSFQGGQVTISADKSISTAY LQWSSLKASDTAMYYCARD YEWELFDSRLDYWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPV</p>	<p>151</p> <p>DIQMTQSPSSLSASVGRD VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APS VFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ</p> <p>137</p>	

TVSWNSGALTSQVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSLGK	WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLTK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
--	--

Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB119, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 130 и VL с SEQ ID NO: 131 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A, и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB120, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 128 и VL с SEQ ID NO: 129 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB121, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 126 и VL с SEQ ID NO: 127 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB122, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 125 и VL с SEQ ID NO: 111 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB123, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 123 и VL с SEQ ID NO: 124 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB124, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 121 и VL с SEQ ID NO: 122 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB126, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 118 и VL с SEQ ID NO: 119 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело к CD3 PSMB127, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 116 и VL с SEQ ID NO: 117 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB128 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 114 и VL с SEQ ID NO: 115 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB129 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 110 и VL с SEQ ID NO: 111 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A. Было создано моноспецифическое антитело PSMB130 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 112 и VL с SEQ ID NO: 113 и константную область IgG4 с заменами S228P, F234A и L235A.

2-5 Кристаллическая структура ВКД PSMA человека, связанного с Fab к PSMA

PSMB83 (также известный как PSMM84)

PSMA представляет собой гомодимерный белок, экспрессируемый на клеточной поверхности. PSMA представляет собой интегральный гликопротеин типа II из 750 остатков на мономер, состоящий из большого домена ВКД (705 остатков) с пептидазной активностью, однопроходного ТМ домена и короткого внутриклеточного домена из 19 остатков. Кристаллическая структура внеклеточной области (ВКД) человеческого PSMA, связанного с Fab-плечом к PSMA из биспецифического антитела PS3B27, была определена с разрешением 3,15 Å, чтобы лучше охарактеризовать сайт объединения между PSMA и антителом.

Внеклеточную область человеческого PSMA (остатки 44-750) экспрессировали в клетках насекомых High FiveTM с N-концевым сигнальным пептидом gp67 с последующей расщепляемой гексагистидиновой меткой (SEQ ID NO: 596). Секретируемый белок очищали из супернатанта с помощью трехэтапной процедуры, включающей начальный Ni²⁺-NTA аффинный захват, TEV-опосредованное расщепление гистидиновой метки с последующей стадией обратной аффинной хроматографии и заключительной стадией эксклюзионной хроматографии. Очищенный PSMA-ВКД замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C в 10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 0,1 mM ZnCl₂

Fab PSMB83 (также известного как PSMM84), который является исходным Fab-плечом против PSMA в биспецифическом антителе PS3B27, экспрессировался в клетках HEK293 Expi с гексагистидиновой меткой (SEQ ID NO: 596) и очищали с помощью аффинной (HisTrap, GE Healthcare) и гель-фильтрационной хроматографии (SEC-300, Phenomenex Yarra). Fab хранили при 4°C в 50 mM NaCl, 20 mM Трис, pH 7,4.

Комплекс ВКД PSMA человека/Fab PSMB83 получали с помощью трехстадийной процедуры. Сначала Fab заменяли на 20 mM MES, pH 6,0, 150 mM NaCl. Затем Fab и PSMA смешивали (1,5 молярный избыток Fab по отношению к мономеру PSMA) и инкубировали в течение ночи при 4°C при диализе в 20 mM MES, pH 6,0. Наконец, комплекс связывали с колонкой monoS 5/50 в 20 mM MES, pH 6,0, и элюировали градиентом NaCl.

Кристаллы, подходящие для рентгеноструктурного анализа, были получены с использованием метода диффузии паров в сидячей капле при 20°C и робота Mosquito LCP (TTP Labtech). Кристаллы Fab PSMB83, связанного с ВКД PSMA человека, выращивали из 18% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M Трис, pH 8,5 с микростативами и комплексом PSMA/Fab первоначально в концентрации 7,3 мг/мл. Кристаллы несвязанного PSMB83 Fab получали из 25% ПЭГ 3 кДа, 0,2 M LiCl, 0,1 M ацетата pH 4,5, при этом Fab первоначально содержалось в концентрации 8,8 мг/мл.

Структуры были расшифрованы путем молекулярного замещения (MR) с помощью Phaser (программное обеспечение Phaser Crystallographic Software, Кембриджский университет). Поисковой моделью MR для структуры Fab PSMB83 (также называемой PSMM84) был код PDB 4M6O. Структуру комплекса PSMA/Fab определяли с использованием кристаллических структур PSMA (код PDB: 2C6G) и PSMB83 Fab (структура с разрешением 1,93 Å; данные не показаны) в качестве поисковых моделей MR. Структуры

были уточнены с помощью PHENIX (Adams, et al, 2004), а корректировки модели были выполнены с помощью COOT (Emsley and Cowtan, 2004). Все остальные кристаллографические расчеты проводили с помощью пакета программ CCP4 (Collaborative Computational Project Number 4, 1994). Все молекулярные графики были созданы с помощью PyMol (система молекулярной графики PyMOL, версия 1.4.1, Schrödinger, LLC), а определяющие комплементарность области (CDR) были определены с использованием определения по Kabat.

Структура PSMA/Fab включает остатки 1-211 легкой цепи Fab, остатки 1-224 тяжелой цепи Fab (за исключением остатков 138-146, которые неупорядочены) и остатки 56-750 PSMA, что соответствует протеазе (остатки 56-116 и 352-590), апикальный (остатки 117-351) и спиральный (остатки 591-750) домены и семь из десяти возможных N-связанных гликанов (в Asn-76, -121, -140, -195, -459, -476 и -638) на субъединицу димера PSMA. Активный участок PSMA яванского макака размещен на поверхности раздела между тремя доменами, и он содержит два атома цинка, скоординированных гистидином (H377 и H553) и остатками глутамата/аспартата (D387, каталитический E424, E425 и D453), и молекулу воды. Кристаллическое асимметричное звено содержит один димер PSMA, причем каждая субъединица связана аналогично Fab PSMB83. Сайт связывания Fab/PSMA хорошо определяется картой электронной плотности, что позволяет надежно позиционировать связывающие остатки. Молекулы Fab и PSMA последовательно пронумерованы на **Фиг. 26 - Фиг. 31**.

Эпитоп, паратоп и взаимодействия PSMB83. PSMB83, который является исходным Fab-плечом к PSMA в биспецифическом антителе PS3B27, распознает конформационный и прерывистый эпитоп в апикальном домене PSMA (**Фиг. 26**). Площадь поверхности PSMA, погруженная Fab, составляет около 700 \AA^2 . В частности, остатки эпитопа PSMB83 представляют собой I138, F235, P237, G238, D244, Y299, Y300, Q303, K304, E307 и K324-P326. Спираль $\alpha 7$ (остатки Y299-E307) является преобладающей областью эпитопа и связывается через CDR тяжелой и легкой цепей Fab. На одном конце спирали Y299 и Y300 образуют ароматический кластер с остатками Fab Y57^H, W94^L и остатками PSMA F235 и P237, тогда как E307 на другом конце спирали образует соляной мостик с R91^L и водородными связями Y32^L. На **Фиг. 27** и **Фиг. 28** показаны основные взаимодействия PSMA с легкой и тяжелой цепями PSMB83. Остатки эпитопа PSMB83 являются консервативными для человека и яванского макака (**Фиг. 29**), и было продемонстрировано, что биспецифическое антитело PS3B27 связывается со сходной аффинностью с PSMA человека и яванского макака. Напротив, ожидается, что мутации эпитопа G238A и особенно Y300D от человека к мышши будут снижать аффинность связывания PSMB83 с мышшиным PSMA по сравнению с человеческим. Мутация Y300D нарушает контакт водородной связи с N59^H и взаимодействие π -стэкинга с W94^L.

Паратоп PSMB83 состоит из остатков всех CDR, кроме CDR-L2 и CDR-H1 (**Фиг. 30**). В частности, остатки паратопа представляют собой S30^L, Y32^L, R91^L, S92^L, W94^L легкой цепи и G56^H-N59^H, K65^H, G66^H, Y101^H, V107^H и D109^H тяжелой цепи. На **Фиг. 31**

показаны контакты взаимодействия между PSMA и PSMB83. Удаленное расположение эпитопа способствует связыванию Fab-плеча к PSMB83 в биспецифическом антителе к PS3B27 с мембраносвязанным PSMA, а другое Fab-плечо по-прежнему связано с CD3 в Т-клеточной мембране. Предполагается, что PSMB83 не будет ингибировать ферментативную активность PSMA, поскольку антитело связывается с активным центром и не вызывает каких-либо значительных структурных изменений в PSMA, которые могут повлиять на ферментативную функцию, например, движения петли, которые закрывают активный центр, или смещение каталитических остатков (RMSD 0,3 Å для суперпозиции C α молекул PSMA в связанных и несвязанных Fab (Barinka et al, 2007) структурах).

2-6 Созревание аффинности антитела к PSMA

Созревание аффинности проводили на фаговых клонах Fab к PSMA из двух библиотек созревания аффинности PSMA для идентификации антитела с повышенной аффинностью связывания по сравнению с исходным PSMB127 (ID fab=PSMB83, также известное как PSMM84). Были созданы две библиотеки для созревания аффинности PSMB127). В первой библиотеке CDR1 и CDR2 тяжелой цепи рандомизировали в соответствии с дизайном, приведенным в таблице 24 (PH9H9L1). Фрагмент H-CDR3 амплифицировали с помощью ПЦР из pDR000024032 и расщепляли SacII+XhoI. Этот фрагмент клонировали в библиотеку PH9H9L1/PH9L3. Им трансформировали клетки E.coli MC1061F', и получали фаг, отображающий эту библиотеку Fab. Во второй библиотеке CDR легкой цепи были рандомизированы в соответствии с дизайном в таблице 25 (PH9L3L3). Тяжелую цепь из PSMB83 (PSMH360) амплифицировали с помощью ПЦР и расщепляли NcoI+XhoI. Этот фрагмент был клонирован в ДНК библиотеки PH9L3L3 (ELN: фаговая библиотека De Novo 2010 SRI-021). Его трансформировали в клетки E.coli MC1061F' и получили фаг, отображающий эту библиотеку Fab.

Таблица 24. Дизайн библиотеки PH9H9L1

Положение	Исходная а.к.	а.к. библиотеки
30	S	D, K, S
31	S	D, N, S, T
32	Д	A, D, S, Y
33	A	A, D, G, S, W, Y
35	S	H, N, S
50	A	A, E, L, N, R, T, W, Y
52	S	A, D, L, N, R, S
54	S	A, E, N, S, Y
57	S	D, N, R, S, T, Y
59	Д	E, G, N, Q, R, Y

Таблица 25. Дизайн библиотеки PH9L3L3

Положение	Исходная а.к.	а.к. библиотеки
30	S	D, N, R, S
31	S	N, S, T
32	Д	D, N, R, S, Y
49	Д	E, H, K, Y
50	D	D, G, S, W, Y
53	N	D, N, S, T, Y
91	R	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
92	S	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
93	N	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
94	W	A, D, E, G, H, N, R, S, W, Y
96	L	F, I, L, N, R, W, Y

Пэннинг в растворе для Fab-pIX-библиотек созревания аффинности к PSMA выполняли по отношению к биотинилированному ВКД PSMA человека в течение трех раундов. Связанный с фагом антиген захватывали нейтравидиновыми гранулами (GE Health Care Life Science, кат. № 78152104011150) в соответствии с протоколом производителя с последующими интенсивными промывками 1х PBST (0,05% Твин-20) и длительной инкубацией с немеченым ВКД PSMA в 500-кратном молярном избытке биотинилированного антигена. В результате пэннинга получили клоны, PSMXP46R3_59H09, PSMXP46R3_59H06, PSMXP46R3_59E03, PSMXP46R3_59C09, PSMXP46R3_59H01, PSMXP46R3_59F11, и PSMXP46R3_59F07.

Для определения уровня экспрессии клонов fab к PSMA 96-луночные планшеты Maxisorb покрывали в течение ночи при 4°C антитело к Fd IgG человека, промывали и блокировали 3% молоком-PBS-0,05% Твин в течение 1 часа. Образцы супернатанта фага были серийно разбавляли в 2 раза для 11 разведений в блокирующем буфере с последней лункой для контроля. 100 мкл этих растворов захватывали на покрытых планшетах в течение 1 часа. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к F(ab')₂ в течение 1 часа. Планшеты промывали и проявляли, используя 100 мкл реагента пероксидазы, а люминесценцию считывали на Envision (Фиг. 32).

Для определения связывания клонов Fab к PSMA с рекомбинантным белком человека и яванского макака 96-луночные планшеты Maxisorb покрывали 100 мкл 5 мкг/мл нейтравидина в течение ночи при 4 °C. Планшеты промывали и блокировали 3% водным раствором PBS-0,05% Твина в течение 1 часов. Рекомбинантные биотинилированные белки PSMA человека и яванского макака захватывали в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшеты промывали и 100 мкл 2-кратно серийно разведенного супернатанта Fab собирали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали, а затем инкубировали в течение 2,5 часов с 200 мкл 0,3% молока в PBST, чтобы смыть некоторые из Fab со слабой

аффинностью. Затем проводили еще 30 минут инкубации со свежеприготовленными 200 мкл 0,3% молока в PBST в для удаления Fab с более слабой аффинностью. Планшеты промывали и добавляли 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к F(ab ')₂ в течение 1 часа. Планшеты промывали и проявляли, используя 100 мкл реагента пероксидазы, а люминесценцию считывали на Envision (**Fig. 33** и **Fig. 34**).

На **Фиг. 32** показано, что белковая экспрессия исходного Fab и Fab с созревшей аффинностью была сходной. Значения оси Y представляют люминесценцию реагента обнаружения, которая соответствует содержанию белка fab на кривой разведения; чем выше показатель люминесценции, тем больше белка в лунке, которое уменьшается при последовательных двукратных разведениях. В лунках с fab со зрелой аффинностью было больше белка, но увеличение по сравнению с исходным было не более чем в пять раз больше, что демонстрируется значениями EC₅₀ (которые представляют собой концентрацию белка, которая дает половину максимального ответа). Эти данные демонстрируют, что различие в профилях связывания с PSMA на **Фиг. 33** и **Фиг. 34** не связано с различием в концентрации Fab.

На **Фиг. 33** показано улучшенное связывание Fab с созревшей аффинностью с человеческим рекомбинантным антигеном по сравнению с исходным Fab к PSMA (PSMB83). Опять же, ось Y графика представляет значения люминесценции. В этом случае чем больше значение, тем больше Fab связывается с белком PSMA человека. Оно представляет собой меру связывания, поскольку повышенные концентрации Fab (по оси X) приводят к более высоким значениям люминесценции. В этих условиях наблюдали пренебрежимо малое связывание исходного Fab, что подтверждается отсутствием сигнала даже при высоких концентрациях (незаштрихованные кружки вдоль оси X). Связывание Fab с созревшей аффинностью наблюдали для тестируемых концентраций, что соответствует более сильной способности связывания с человеческим белком PSMA. Учитывая, что связывание исходного Fab с белком PSMA человека было равно нулю, невозможно было получить EC₅₀.

На **Фиг. 34** показано улучшенное связывание Fab с созревшей аффинностью с рекомбинантным антигеном яванского макака по сравнению с исходным Fab к PSMA (PSMB83). Опять же, ось Y графика представляет значения люминесценции. В этом случае чем больше значение, тем больше Fab связывается с белком PSMA яванского макака. Оно представляет собой меру связывания, поскольку повышенные концентрации Fab (по оси X) приводят к более высоким значениям люминесценции. В этих условиях наблюдали пренебрежимо малое связывание исходного Fab, что подтверждается отсутствием сигнала даже при высоких концентрациях (незаштрихованные кружки вдоль оси X). Связывание Fab с созревшей аффинностью наблюдали для тестируемых концентраций, что соответствует более сильной способности связывания с человеческим белком PSMA. Учитывая, что связывание исходного Fab с белком PSMA человека было нулевым, для прямого сравнения нельзя было получить EC₅₀.

В целом профили связывания Fab фагов демонстрируют улучшенное связывание с

рекомбинантным антигеном человека и яванского макака по сравнению с исходным мкАт к PSMA (PSMB127). Это улучшение не является результатом различий в профилях экспрессии Fab, как показано на Фиг. 34 и Фиг. 35, демонстрирующих связывание Fab с созревшей аффинностью, нормализованное к уровням экспрессии Fab. Пять лучших Fab-кандидатов, идентифицированных с помощью скрининга на основе ИФА, были получены в формате моноклональных антител IgG4 PAA. В таблице 26 перечислены последующие идентификаторы мкАт, а в таблицах 27 и 28 показаны последовательности для их переменных областей и последовательности для тяжелой и легкой цепей, соответственно.

Таблица 26. Пять основных антител со зрелой аффинностью, идентифицированных с помощью ИФА

ID ячейки	HC SEQ ID	LC SEQ ID	ID белка мкАт
PSMXP46R3_59C09	PSMH859	PSML160	PSMB346
PSMXP46R3_59E03	PSMH859	PSML159	PSMB345
PSMXP46R3_59F07	PSMH862	PSML158	PSMB349
PSMXP46R3_59H01	PSMH860	PH9L3	PSMB347
PSMXP46R3_59H06	PSMH859	PH9L3	PSMB344

Таблица 27. Последовательности VH и VL для пяти лучших Fab-кандидатов к PSMA

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB3 44	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDSSLYVG DYFDYWGQGTLLTVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEI K	117
PSMB3 45	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDSSLYVG DYFDYWGQGTLLTVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNYLAWY QQKPGQAPRLLIHDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEI K	9
PSMB3 46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARDSDSSLYVG DYFDYWGQGTLLTVSS	6	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASY RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTKVEI K	682

PSMB3 47	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSMK SRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYCARDSDSSLYVG DYFDYWGQGTLVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTKVEI K	117
PSMB3 49	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFKSDAMHWVRQAPGK GLEWVSEISGSGGYTNYADSLK GRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYCARDSDSSLYVG DYFDYWGQGTLVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWY QKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDF TLTISSEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTKVEI K	10

Таблица 28. Последовательности тяжелой и легкой цепей пяти лучших кандидатов к PSMA в формате моноклонального антитела IgG4 PAA

ID мкАт	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB344	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKGRFTISRDN SKNTL YLQMN SLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVG DYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNV D HKPSNTKV DKR VESKYGPPCPPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSLGK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASN RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTL SKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	139
PSMB345	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKGRFTISRDN SKNTL YLQMN SLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVG DYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFP	11	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSNYLAWYQQ KPGQAPRLLIHDASN RAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD	14

	AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVEVKYGPCCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK		SKDSTYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	
PSMB346	EVQLLESGLLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVEVKYGPCCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLGLGK	11	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASYRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	680
PSMB347	EVQLLESGLLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSMKSRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVEVKYGPCCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE	12	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRSNW PLTFGQGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYSLSTLTLTKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	139

	QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLGK			
PSMB349	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFKSDAMHWVRQ APGKGLEWVSEISGSGGYTN YADSLKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCAR DSYDSSLYVGDYFDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTEP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSS LGTKTYTCNV DHKPSNTKV DKRVE SKYGPCCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKLSLSLGLGK	13	EIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASNRAT GIPARFSGSGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQRGNW PLTFGQGT KVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	15

3 различных HC и 4 различных LC были объединены в матричный формат для увеличения разнообразия отобранных вариантов (таблица 29). Учитывая, что метионин в CDR2 PSMH860 имеет риск посттрансляционной модификации, была создана новая последовательность с M64L и обозначена как PSMH865. PSMH865 соединяли с PSML160 для создания мкАт PSMB365.

Таблица 29. Матричный формат комбинированных 3 тяжелых цепей и 4 легких цепей

	PSMH859	PSMH860	PSMH862
PH9L3	PSMB344	PSMB347	PSMB358
PSML158	--	PSMB361	PSMB349
PSML159	PSMB345	PSMB362	PSMB359
PSML160	PSMB346	PSMB363	PSMB360

В таблицах 30 и 31 представлены последовательности переменных областей из рекомбинированной матрицы и последовательности тяжелой и легкой цепей, соответственно.

Таблица 30. Последовательности VH и VL отобранных соединений к PSMA из рекомбинированной матрицы

ID мкАт	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO
PSMB3 58	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIK	117
PSMB3 59	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	9
PSMB3 60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	8	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	682
PSMB3 61	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTK VEIK	10
PSMB3 62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIHDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	9
PSMB3 63	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARD SYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSS	7	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ	682

			QRRNWPLTFGQGTK VEIK	
PSMB3 65	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKSR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSDYDSSLYVGDYFD YWGQGT LVTVSS	681	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIK	682

Таблица 31. Последовательности тяжелой и легкой цепей отобранных соединений к PSMA из рекомбинированной матрицы

ID мкАТ	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность легкой цепи	SEQ ID NO
PSMB3 58	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYFD DYWGQGT LVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNV D HKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYR VVS VLT VLVH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	13	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRSNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSS TLT LSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	139
PSMB3 59	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYFD DYWGQGT LVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNV D HKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYR VVS VLT VLVH	13	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN YLAWYQQKPGQAP RLLIH DASN RATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSS TLT LSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV	14

	QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK		TKSFNRGEC	
PSMB3 60	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	13	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	680
PSMB3 61	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSDYDSSLYVGDYF DYWGQGTLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	12	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRGNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSS TLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	15
PSMB3 62	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG	12	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSN	14

	LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK		YLAWYQQKPGQAP RLLIHDAASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	
PSMB3 63	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSMKS RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARDSYDSSLYVGDYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVES KYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQ EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSL GK	12	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSS TLTSLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	680
PSMB3 65	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFTFKSDAMHWVRQAPGKG LEWVSEISGSGGYTNYADSLKSR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDSYDSSLYVGDYFD YWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK	679	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSCRASQSVSS YLAWYQQKPGQAP RLLIYDASYRATGIP ARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQ QRRNWPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQES	631

PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	VTEQDSKDSTYSLSS TLTLKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
---	---

В таблице 32 показаны последовательности CDR для всех отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью.

Таблица 32. Последовательности CDR отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью

ID мкАт		CDR (SEQ ID NO:)		
		CDR1	CDR2	CDR3
PSMB344	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK G (1)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB345	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK G (1)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (82)	QQRNWPLT (686)
PSMB346	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK G (1)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)
PSMB347	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB349	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRGNWPLT (5)
PSMB358	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRSNWPLT (83)
PSMB359	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSNYLA	DASNRAT	QQRNWPLT

		(4)	(82)	(686)
PSMB360	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLK G (3)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)
PSMB361	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (632)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASNRAT (82)	QQRGNWPLT (5)
PSMB362	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSNYLA (4)	DASNRAT (685)	QQRNWPLT (686)
PSMB363	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSMK S (2)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (630)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)
PSMB365	HC	SDAMH (78)	EISGSGGYTNYADSLKS (683)	DSYDSSLYVGDYFD Y (80)
	LC	RASQSVSSYLA (81)	DASYRAT (684)	QQRNWPLT (686)

3 Получение и функциональная оценка биспецифических антител к PSMA×CD3

3-1 Создание биспецифических антител к PSMA×CD3

Были получены два типа биспецифических антител к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью: одно, специфическое для нацеливающего плеча (например, антитело к PSMA с созревшей аффинностью), рекомбинированного с плечом к CD3 высокоаффинного CD3B376 (VH SEQ ID NO: 652, VL SEQ ID NO: 661; HC SEQ ID NO: 640, LC SEQ ID NO: 676) или плечом к CD3 высокоаффинного CD3B450 (VH SEQ ID NO: 657, VL SEQ ID NO: 678, HC SEQ ID NO: 675, LC SEQ ID NO: 677).

Эти исходные мкАт находятся в формате GenMab (Labrijn et al, 2013), в котором нацеливающее исходное мкАт (PSMA) содержит мутацию 409R GenMab (нативную аминокислоту для IgG4), а уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L GenMab и мутацию R409K. Одно из моноспецифических антител к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в Fc-областях. Нацеливающее исходное мкАт (PSMA) находится в формате человеческого IgG4 с заменами в Fc S228P, F234A, L235A. Моноспецифические антитела экспрессировали в клеточных линиях НЕК под контролем промоторов CMV.

Исходные антитела к PSMA и CD3 очищали с применением колонки с белком А с элюирующим буфером, содержащим 100 мМ NaAc, pH 3,5, и нейтрализующим буфером 2,5 М Tris, pH 7,2. Нейтрализованные исходные мкАт использовали для получения

биспецифических антител к PSMA \times CD3. часть исходных мкАт дополнительно заменяли буфером D-PBS, буфером с pH 7,2 для аналитических измерений и анализов.

После очистки выполняли контролируемый обмен Fab-плечами для получения биспецифических антител. Исходные антитела к PSMA смешивали с желаемым исходным антителом к CD3 в восстанавливающих условиях в 75 мМ -2-МЕА (2-меркаптоэтиламина) и инкубировали при 31°C в течение 4 ч или при комнатной температуре в течение ночи. Реакции рекомбинации были основаны на молярных соотношениях, в которых для сведения к минимуму количества исходного мкАт к CD3, оставшегося после рекомбинации, использовали 6% избыток исходных мкАт к PSMA. Затем продукты рекомбинации подвергали диализу против 1 \times DPBS, pH 7,2, для удаления восстановителя.

Полученные конечные биспецифические антитела вместе с исходными мкАт (т. е. PSMA, CD3 или «Null» (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в таблице 33.

Отобранные подходящие антитела к PSMA также объединяли с неуничтожающим плечом («Null») для получения отрицательных контролей в целях тестирования. Для контрольных биспецифических антител B2M1 создавали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA (VH с SEQ ID NO: 610, VL с SEQ ID NO: 611) и комбинировали или с плечом к CD3 CD3B219-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3 \times null), либо с плечами к PSMA, PSMB122, PSMB126, PSMB130 для получения PS3B37, PS3B39 и PS3B40, соответственно (PSMA \times null). Эти мкАт с созревшей аффинностью к PSMA скрещивали (как в способах выше) с CD3B219 и CD3B376 для получения биспецифических антител, приведенных в таблице 32.

Таблица 33. Создание биспецифических антител к PSMA \times CD3 с созревшей аффинностью, полученных из отобранных соединений к PSMA с созревшей аффинностью

ID	Плечо 1	HC	LC	Плечо 2	HC	LC
PS3B60	PSMB344	PSMH859	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B61	PSMB345	PSMH859	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B62	PSMB346	PSMH859	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B63	PSMB347	PSMH860	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B64	PSMB349	PSMH862	PSML158	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B70	PSMB358	PSMH862	PH9L3	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B71	PSMB359	PSMH862	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B72	PSMB360	PSMH862	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B73	PSMB361	PSMH860	PSML158	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B74	PSMB362	PSMH860	PSML159	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B75	PSMB363	PSMH860	PSML160	CD3B219	CD3H141	CD3L66
PS3B76	PSMB358	PSMH862	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150

PS3B77	PSMB349	PSMH862	PSML158	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B78	PSMB359	PSMH862	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B79	PSMB360	PSMH862	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B80	PSMB347	PSMH860	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B81	PSMB361	PSMH860	PSML158	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B82	PSMB362	PSMH860	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B83	PSMB363	PSMH860	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B84	PSMB344	PSMH859	PH9L3	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B85	PSMB345	PSMH859	PSML159	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B86	PSMB346	PSMH859	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150
PS3B90	PSMB365	PSMH865	PSML160	CD3B376	CD3H219	CD3L150

3-2 Оценка биспецифических Ат к PSMA×CD3 с созревшей аффинностью в связывании клеток LNCAP

Биспецифические антитела к PSMA×CD3 тестировали на связывание с линией PSMA-положительных клеток, LNCAP, с линией PSMA-отрицательных клеток, PC3. Для оценки возможностей связывания биспецифических антител к PSMA использовали анализ связывания клеток (описанный ранее). Биспецифические антитела нормализовали по концентрации белка, а затем инкубировали с таким же количеством клеток, экспрессирующих PSMA человека или яванского макака. СИФ для каждой концентрации получали с помощью проточной цитометрии и наносили на график в виде функции от концентрации. Данные преобразовывали с помощью \log_{10} и затем наносили на график. Для определения EC50 строили кривые связывания методом нелинейной регрессии.

Эти относительные значения использовали для ранжирования связывания PSMA с целевыми клетками. На **Фиг. 14-16** показано связывание всех полученных биспецифических антител с LNCAP. На **Фиг. 16** ни один из конструкторов не продемонстрировал связывания с линией PSMA-отрицательных клеток. На **Фиг. 14** и **Фиг. 15** все отобранные соединения с созревшей аффинностью продемонстрировали повышенную аффинность связывания по сдвинутым влево кривым и повышенному sM_{\max} по сравнению с исходным мкАт, PS2B27.

Взаимодействие биспецифических антител с созревшей аффинностью с рекомбинантным ВКД PSMA яванского макака и ВКД PSMA человека изучали с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием системы ProteOn XPR36 (BioRad), как описано ранее для рекомбинантного ВКД PSMA шимпанзе. Все биспецифические антитела связываются с обеими мишенями с по существу одинаковой аффинностью, при этом KD находится в диапазоне от 0,05 нМ до 0,27 нМ для ВКД PSMA человека и от 0,05 нМ до 0,23 нМ для ВКД PSMA яванского макака.

3-3 Оценка биспецифических антител с созревшей аффинностью к CD3 и PSMA в анализе функционального уничтожения клеток

На основании приведенных выше данных, измерений аффинности и идентичности

последовательностей три антитела к PSMA, PSMB347, PSMB360 и PSMB365 в качестве биспецифических антител с CD3B219 или CD3B376, были дополнительно охарактеризованы на способность опосредовать PSMA-специфическую перенаправленную цитотоксичность Т-клеток. Опосредованное Т-клетками уничтожение измеряли с помощью анализа цитотоксичности каспазы, который косвенно измеряет уничтожение клеток посредством расщепления флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки. Замороженные пан CD3⁺ Т-клетки (приобретены у Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие PSMA, (LNCaP, C42) культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавок (приобретены у компании Life Technologies).

Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (E:T) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для селекции и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспаза NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела PS3B27 (CD3xPSMA), CD3B288 (CD3xNull) или PS3B46 (PSMAxNull) получали в 2X конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 минут инкубации при комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience). Incucyte Instrument находится в увлажненном инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны описания обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые шесть часов, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(-ах), содержащей (-их) самую высокую концентрацию тестируемого(-ых) соединения(-ий). Как показано на **Фиг. 17**, кривые для PS3B80, PS3B79, PS3B89, PS3B90, PS3B63 и PS3B72 смещаются влево, что указывает на повышенную активность относительно PS3B27. Как и ожидалось, контрольные антитела с нулевым плечом не индуцировали гибель клеток.

3-4 Противоопухолевая эффективность в предотвращении опухолеобразования ксенотрансплантатов LnCaP у гуманизированных мышей NSG

Эффективность PS3B79 и PS3B90 оценивали в развившихся ксенотрансплантатах

человеческих клеток рака предстательной железы 3D LnCaP AR.TB у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), гуманизированных внутрибрюшинно (в/б) Т-клетками человека. PS3B79 и PS3B90 в дозах 2,5 и 5 мг/кг или контрольное антитело Null×CD3B376 вводили каждые 3-4 дня на 36, 39, 43, 47, 50, 53, 56, 60 и 63 дни, всего 8 доз. На 53-й день после имплантации опухоли, который был последней датой исследования, когда в группе оставалось девять (9) животных, было рассчитано ингибирование роста опухоли (%TGI). Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для PS3B79 в дозе 5 мг/кг с 42% TGI (двухфакторный дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони, *p ≤ 0,0001, **Фиг. 21**) и для PS3B90 в дозе 2,5 и 5 мг/кг с 53% и 33%, соответственно, по сравнению с контролем Null×CD3 (двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Бонферрони, *p ≤ 0,001, **Фиг. 22**). Таким образом, CD3B376 способен индуцировать активацию Т-клеток и цитотоксичность *in vivo* и способен приводить к ингибированию роста опухоли в биспецифическом формате с помощью высокоаффинных PSMA-связывающих плеч, PSMB360 и PSMB365.

4 Получение и функциональная оценка биспецифических антител к IL1RAP×CD3

Моноклональные антитела к IL1RAP, используемые и подходящие для применения в биспецифических антителах по настоящему изобретению, описаны в публикации заявки на патент США № 20170121420A1, описание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Пятнадцать моноспецифических антител к IL1RAP (см. таблицу 6 в US20170121420A1) экспрессировали в виде IgG4, имеющего замены в Fc S228P, L234A и L235A. Исходные мкАт к CD3 были экспрессированы в виде IgG4 с S228P, L234A, L235A, F405L и R409K (нумерация согласно индексу EU). Было также создано моноспецифическое антитело CD3B220 к CD3, содержащее области VH и VL, имеющее VH с SEQ ID NO: 92 и VL с SEQ ID NO: 93 и константную область IgG4 с заменами S228P, L234A, L235A, F405L и R409K.

Моноспецифические антитела очищали стандартными методами с использованием колонки с белком А. После элюирования пулы нейтрализовали до pH 7 и диализовали в 1xD-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела к IL1RAP×CD3 получали путем комбинирования моноспецифического мкАт к CD3 (CD3B376: VH с SEQ ID NO: 652 и VL с SEQ ID NO: 661; или CD3B450: VH с SEQ ID NO: 657 и VL с SEQ ID NO: 678) и моноспецифического мкАт к IL1RAP посредством контролируемого обмена Fab-плечами (как описано в WO2011/131746). Вкратце, около 1-20 мг/мл при молярном соотношении 1,08: 1 антитела к IL1RAP/CD3 в DPBS, pH 7-7,4 и 75 mM 2-меркаптоэтаноламина (2-MEA) смешивали вместе и инкубировали при 25-37°C в течение 2-6 часов с последующим удалением 2-MEA посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной фильтрации потока для удаления восстановителя и обеспечения образования биспецифических антител.

Тяжелые и легкие цепи биспецифических антител к IL1RAP×CD3 показаны ниже в таблице 34.

Таблица 34. Последовательности CDR 15 мкАт к IL1RAP, выбранных для создания

биспецифических антител к IL1RAP×CD3 (SEQ ID NO в скобках).

ID	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
IAPB47	GYSFTSYW	IYPSDSYT	ARRNSAEN YADLDY	QSIEND	YAS	QSFAPL T
	(152)	(153)	(154)	(155)	(156)	(157)
IAPB38	GFTFSNYA	INYGGGS K	AKDYGPFA LDY	QSVDDW	TAS	QYHHWP LT
	(158)	(159)	(160)	(161)	(162)	(163)
IAPB57	GGSISSSTY Y	IYFTGST	AKEDDSSG YYSFDY	QGISSY	AAS	QVNSYPL T
	(164)	(165)	(166)	(167)	(168)	(169)
IAPB61	GVSISSTY Y	IYFTGNT	GSLFGDYG YFDY	QFISSN	GAS	QYNNWP ST
	(170)	(171)	(172)	(173)	(174)	(175)
IAPB62	GYTFNTYA	INTNTGN P	ARRYFDW LLGAFDI	QGISSW	AAS	QANSFPL T
	(176)	(177)	(178)	(179)	(168)	(180)
IAPB3	GGTFSSYA	ISAIFGTA	ARGNSFHA LWDYAFD Y	QSVLYSSN NKNY	WAS	QYYSTPL T
	(181)	(182)	(183)	(184)	(185)	(186)
IAPB17	GGTFSSYA	IPIFGNA	ARTIYLDY VHILDY	QSVLYSSN NKNY	WAS	QYYSTPL T
	(181)	(187)	(188)	(184)	(185)	(186)
IAPB23	GFTFSNYW	IRYDGGK	AKDAYPPY SFDY	QSVSSY	DAS	QRSNWPL T
	(189)	(190)	(191)	(192)	(193)	(194)
IAPB25	GFTFSSYA	ISGSGGST	AKGDEYY YPDPLDY	QSISSY	AAS	QSYSTPL T
	(195)	(196)	(197)	(198)	(168)	(199)
IAPB29	GFTFSNYA	ISGSGGST	AKEWSSYF GLDY	QSISSY	AAS	QSYSTPL T
	(158)	(196)	(200)	(198)	(168)	(199)
IAPB9	GGTFSSYA	ISPIFGTA	ARRYDNFA RSGDLLDY	QSISSY	AAS	QSYSTPL T
	(181)	(201)	(202)	(198)	(168)	(199)
IAPB55	GVSISSTY Y	IYFTGNT	GSLFGDYG YFDY	QFISSN	GAS	QYNNWP FT
	(170)	(171)	(172)	(173)	(174)	(203)
IAPB63	GYTFNTYA	INTNTGN	ARRYFDW	SSDVGDYN	DVS	ASYAGNY

		P	LLGAFDI	Y		NVV
	(176)	(177)	(178)	(204)	(205)	(206)
IAPB64	GYTFNTYA	INTNTGN P	ARRYFDW LLGAFDI	SSDVGDYN Y	DVS	SSYAGNYN VV
	(176)	(177)	(178)	(204)	(205)	(207)
IAPB65	GGTFSSYA	ISAIFGTA	ARHLHNAI HLDY	QSVSNF	GAS	QQGKHWP WT
	(181)	(182)	(208)	(209)	(174)	(210)

Последовательности VH и VL для 15 моноклональных антител к IL1RAP показаны ниже в таблице 35.

Таблица 35. Последовательности VH и VL для мкАт к IL1RAP для создания биспецифических антител к IL1RAP×CD3.

ID	Аминокислотная последовательность VH	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность VL	SEQ ID NO:
IAPB4 7	EVQLVQSGAEVKKPGESLK ISCKGSGYSFTSYWIGWVR QMPGKGLEWMGIIYPSDSY TRYSPSFQGGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYCY ARRNSAENYADLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVDSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKV NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQQEEMTKNQV SLTCLVKGFPYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK	211	EIVLTQSPGTLSLSPGERA TLSCRASQSI NDLNWYQ QKPGKAPKLLIYYASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT INSLQPEDFATYYCQQSFT APLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SIVCLLNNFYPRKAVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	212
IAPB3 8	EVQLLESQGGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYAMNWV RQAPGKGLEWVSGINYYG GSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDYGPFALDYWGQG	213	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVDDWLAWY QKPGQAPRLLIYTASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQY HHWPLTFGQGTKVEIKRT	214

	<p>TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK</p>		<p>VAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTL KADYEEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC</p>	
IAPB5 7	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGGSISSSTYYWGWIR QPPGKGLEWIGSIYFTGSTD YNPSLKSRVSVISVDTSKNQF SLKLSSVTAADTAVYYCAK EDDSSGYYSFDYWGGNL VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK</p>	215	<p>DIQLTQSPSFLSASVGDRV TITCRASQGISSYLAWYQ QKPGKAPKLLIYAASLTQ SGVPSRFGSGSGTEFTLT ISSLPEDFATYYCQQVN SYPLTFGGGKVEIKRTV AAPS VFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSTLTLK ADYEEKHKVYACEVTHQ LSSPVTKSFNRGEC</p>	216
IAPB6 1	<p>QLQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSISSSTYYWGWL RQPPGMGLEWTGSIYFTGN TYYNPSLKSRVTISVDTSRN QFSLKLSSVTAADTAVYYC GSLFGDYGYFDYWGGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE</p>	217	<p>EIVMTQSPATLSVPPGERA TLSCRASQFISSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFGSGSGTDFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNN WPSTFGPGTKVDIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQ</p>	218

	PVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEVVESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLS LGK		WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	
IAPB6 2	QVQLVQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFSLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSINKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	DIQMTQSPSSVSASVGDR VTITCRASQGISSWLAWY QQKPGKAPKLLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQA NSFPLTFGGGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	220
IAPB3	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGISAIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDVAVY CARGNSFHALWDYAFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHK	221	DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFSGSG SGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYA	222

	<p>PSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGLGK</p>		<p>CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>	
IAPB1 7	<p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGN ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDVAVYY CARTIIYLDYVHILDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLGLGK</p>	223	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGER ATINCKSSQSVLYSSNNK NYLAWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDFRFGSG SGTDFTLTISSLAEDVAV YYCQQYYSTPLTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSL SSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC</p>	222
IAPB2 3	<p>EVQLLES GGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYWMNWV RQAPGKGLEWVSAIRYDGG SKYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKDAYPPYSFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGKTYTCNVDHKPS NTKVDKRVESKYGPPCPPC PAPEAAAGGPSVFLFPPKPKD</p>	224	<p>EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYDASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQRSN WPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC</p>	225

	<p> TLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK </p>			
IAPB2 5	<p> EVQLLES GGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKGD EYYYPDPLDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKR VESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVYS VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK </p>	226	<p> DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC </p>	227
IAPB2 9	<p> EVQLLES GGGLVQPGGSLR LSCAASGFTFSNYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGS TYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKEWSSYFGLDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSSLGTKTYTCNVDHKPSN TKVDKR VESKYGPPCPPCP APEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNA </p>	228	<p> DIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC </p>	227

	KTKPREEQFNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK			
IAPB9	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGWISPIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDVAVYY CARRYDNFARSGDLDYWG QGTLLTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPYTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVV VLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKLSLSLGK	229	DIQMTQSPSSLSASVGR VTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQSYS TPLTFGQGTKEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	227
IAPB5 5	QLQLQESGPGLVKPSSETLSL TCTVSGVSISSSTYYWGWL RQPPGMGLEWTGSIYFTGN TYYNPSLKSRTISVDTSRN QFSLKLSSVTAADTAVYYC GSLFGDYGYFDYWGQGTLL TVSSASTKGPSVFPLAPCS RSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSKVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQV	633	EIVMTQSPATLSVSPGERA TLSCRASQFISSNLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASTRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLQSEDFAVYYCQQYNN WPFTFGPGHCVDIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	230

	YTLPPSQEEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSL LGK			
IAPB6 3	QVQLVQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDKRVESKY GPPCPAPEAAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK	219	QSALTQPRSVSGSPGHSV TISCTGTSSDVGDYNYVS WYQQRPGKVPKLLIYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEAIYFCA SYAGNYNVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	231
IAPB6 4	QVQLVQSGSELKKPGASVK VSCKASGYTFNTYAMNWV RQAPGQGLEWMGWINTNT GNPTYAQGFTGRFVFLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCARRYFDWLLGAFDIWG QGTMTVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTS VHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVKDKRVESKY GPPCPAPEAAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVE	219	QSALTQPRSVSGSPGHSV TISCTGTSSDVGDYNYVS WYQQRPGKVPKLLIYDVS KRPSGVPDRFSGSKSGNT ASLTISGLQAEDEAIYFCS SYAGNYNVVFGGGTKLT VLGQPKAAPSVTLFPPSSE ELQANKATLVCLISDFYP GAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNNKYAASS YLSLTPEQWKSHRSYSCQ VTHEGSTVEKTVAPTECS	232

	WESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSLGK			
IAPB6 5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVK VSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGISAIFGT ANYAQKFQGRVTITADEST STAYMELSSLRSEDVAVYY CARHLHNAIHLDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPC SRSTSESTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTKTYTCNVDHKPSNT KVDKRVESKYGPPCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSDQED PEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDLAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSLGK	233	EIVLTQSPATLSLSPGERA TLSCRASQSVSNFLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASNRA TGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQGKH WPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSTYLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC	234

4-1 Оценка биспецифических антител к IL1RAP в анализе цитотоксичности Т-клеток цельной крови

Способы. Линию опухолевых клеток LAMA-84 промывали DPBS, после чего инкубировали с CFSE (ресуспендировали в 150 мкл DMSO и разводили 1:10000) при концентрации 10×10^6 клеток/мл CFSE в течение 8 минут при комнатной температуре. Реакцию окрашивания гасили HI FBS и промывали в среде перед ресуспендированием в полной среде при 2×10^5 клеток/мл. Равные объемы цельной крови и опухолевых клеток, окрашенных CFSE, объединяли в каждой лунке 96-луночного планшета. После добавления антитела (ресуспендированного в 10 мкл DPBS) в соответствующие лунки все планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO₂ в течение 48 часов. Неразбавленный CD25-PE добавляли непосредственно в каждую лунку цельной крови и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре, защищая от света. Затем клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 минут и лизировали 200 мкл буфера для лизиса эритроцитов разных видов, повторяли еще 4 раза. Клетки однократно промывали DPBS и окрашивали Live/Dead Near-IR (разведенными в DPBS) в течение 15 минут (таблица 36). Каждую лунку промывали и ресуспендировали в буфере для FACS перед проведением BD FACS CANTO II.

Таблица 36. Панель окрашивания цитотоксичности Т-клеток цельной крови

Антиген	Канал	Клон	Разведение	Источник	№ по каталогу
CD25	PE	BC96	1:100	Biolegend	302606
CD4	PerCP	RPA-T4	1:100	Biolegend	300528
CD8	APC	НIT8a	1:100	Biolegend	300912
Live/Dead	APC-Cy7	Н/П*	1:200	Invitrogen	L34976

Н/П=не применимо

Количество клеток на FACS CANTO II (Becton, Dickinson and Company, Франклин Лейкс, штат Нью-Джерси) ограничивали 1×10^4 опухолевыми клетками. Гибель опухолевых клеток оценивали путем гейтирования по FSC и SSC для идентификации популяций клеток, затем по CFSE-положительным опухолевым событиям и, наконец Live/Dead Near-IR для оценки цитотоксичности опухоли. Активацию Т-клеток оценивали путем гейтирования по FSC и SSC для идентификации популяций клеток, CFSE-отрицательных событий, Near-IR-отрицательных событий для оценки живых клеток, а затем CD25-положительных клеток. Процент мертвых опухолевых клеток или CD25-положительных клеток был нанесен на график с помощью GraphPad Prism 6 и проанализирован с использованием нелинейной кривой. Дополнительный статистический анализ был проведен в программе «R» для определения значений EC_{50} в популяции с использованием нелинейной модели со смешанными эффектами.

Результаты. чтобы имитировать физиологические состояния периферической цельной крови, содержащей sIL1RAP, IC3B19 (IAPB57×CD3B219) и IC3B34 (IAPB57×CD3B376) оценивали в анализе перенаправления Т-клеток *ex vivo* с использованием цельной крови. Экзогенно добавленную линию клеток IL1RAP+ LAMA-84 (2×10^4 клеток/лунку) добавляли к здоровой контрольной периферической цельной крови человека (n=15 донорских образцов) с IC3B19, IC3B34 и контрольными биспецифическими антителами с нулевым плечом в течение 48 часов. Как показано на **Фиг. 53**, IC3B19 и IC3B34 индуцировали аналогичную опосредованную Т-клетками цитотоксичность линии клеток IL1RAP+ LAMA-84 *ex vivo* через 48 часов. Значения EC_{50} для цитотоксичности IC3B19 и IC3B34, представленные на **Фиг. 53**, составляли 2,097 и 2,762, соответственно, (таблица 37). Аналогично, значения EC_{50} для активации Т-клеток (CD25) IC3B19 и IC3B34, представленные на **Фиг. 54**, составляли 4,237 и 7,825 нМ, соответственно, (таблица 38). Все контрольные биспецифические антитела с нулевым плечом не индуцировали определяемых уровней цитотоксичности или активации Т-клеток, как показано на **Фиг. 53** и **Фиг. 54**. Общий уровень цитотоксичности и активации Т-клеток был одинаковым как для IC3B19, так и для IC3B34.

Таблица 37. Концентрации EC_{50} (нМ) цитотоксичности IC3B19 и IC3B34 в клеточной линии LAMA-84

Эффективная концентрация (нМ)	IC3B19	IC3B34
EC ₅₀	2,097	2,762

Таблица 38. Концентрации EC₅₀ (нМ) активации Т-клеток IC3B19 и IC3B34 в клеточной линии LAMA-84

Эффективная концентрация (нМ)	IC3B19	IC3B34
EC ₅₀	4,237	7,825

4-2 Оценка высвобождения цитокинов биспецифическими антителами к IL1RAP×CD3 в анализе цитотоксичности Т-клеток цельной крови через 24 и 48 часов

Способы. Замороженные супернатанты 24-часовых и 48-часовых образцов из примера 4-1 размораживали на жидком льду. Перед использованием планшеты центрифугировали при 500 g в течение 5 минут при 4 °С, затем снова помещали на жидкий лед. Последовательные разведения готовили в 96-луночных планшетах с U-образным дном (Falcon) с использованием MSD Diluent 2 с соотношениями разведений 1:2, 1:25 и 1:1000 для ИФА.

Во время центрифугирования супернатантов планшеты для анализа MSD (ProInflammatory Panel I V-Plex, кат. № K15049G-4, номер партии K008572) предварительно промывали в соответствии с протоколом производителя. Стандартную кривую подготавливали путем восстановления полученного калибратора в 1,0 мл MSD Diluent 2. Пятьдесят микролитров каждого образца или стандарта добавляли непосредственно в предварительно промытые планшеты MSD. Последующие инкубации и промывки проводили в соответствии с протоколом производителя. Планшеты для анализа считывали на MSD Sector Imager.

Для сравнения ответа IC3B19 и IC3B34 использовались два способа:

Линейная регрессия со смешанными эффектами

В этом способе была построена модель линейной регрессии с фиксированными эффектами для соединения, дозы и соединения посредством взаимодействия доз и случайных эффектов, которые учитывают объединенных доноров. Затем были проведены апостериорные сравнения между IC3B19 и IC3B34 для каждой концентрации, и р-значения были соответствующим образом скорректированы для множественных сравнений.

Нелинейная (четырёхпараметрическая) регрессия со смешанными эффектами

IC3B19 и IC3B34 были смоделированы вместе с использованием модели нелинейной регрессии с фиксированными параметрами эффекта для минимума, максимума, logEC₅₀ и угловой коэффициент для каждого соединения, а также со случайным эффектом, который учитывает эффект объединенных доноров. Точечные оценки и их доверительные интервалы были извлечены и нанесены на график для визуального сравнения из этих отдельных моделей. Тестирование значительных различий для каждого параметра проводили путем построения модели, в которой использовали совместную оценку представляющего интерес параметра, а затем сравнивали эту модель с исходной моделью с использованием критерия логарифмического правдоподобия. Для

усовершенствования существует модель с параметрами для минимума IC3B19, максимума IC3B19, IC3B19 logEC50, углового коэффициента IC3B19, минимума IC3B34, максимума IC3B34, IC3B34 logEC50 и IC3B34. чтобы проверить, существенно ли отличаются минимумы, строится вторая модель, которая имеет все те же параметры, за исключением того, что для минимума существует единственный общий параметр. Логарифмическое правдоподобие (общая мера того, насколько хорошо модель соответствует данным) первой модели сравнивается с логарифмическим правдоподобием второй модели. Если они существенно не отличаются друг от друга, то можно сделать вывод, что минимумы существенно не отличаются друг от друга. Точно так же, если логарифмические вероятности значительно отличаются друг от друга, мы можем заключить, что минимальные значения существенно отличаются.

В ряде случаев модели или сравнения параметров были неопределимы по одной из двух причин: 1. данные были слишком сложными для расчета самой четырехпараметрической логистической регрессии, или 2. разница между оценками параметров была настолько большой, что это привело к сбою объединенной модели. В первом случае результаты не сообщаются, и в сводной таблице они обозначаются «Н/Д». Во втором случае результаты также не сообщаются, но они обозначены в сводной таблице как «знач.», как сокращение для значимого. Поскольку 95% доверительные интервалы вокруг этих параметров оцениваются отдельно и не перекрываются, мы можем считать их существенно разными, но точное р-значение неизвестно.

Различия считаются статистически значимыми при р-значении, меньшем или равном 0,05. Все анализы выполняли в R версии 3.3.2.

Результаты. IC3B19 и IC3B34 опосредованное вовлечение Т-клеток и линии IL1RAP+ клеток-мишеней LAMA-84 (эндогенные и экзогенно добавленные опухолевые клетки) приводило к высвобождению цитокинов Т-клетками. чтобы определить разницу в высвобождении цитокинов между IC3B19 и IC3B34, супернатанты оценивали в анализах на 10 провоспалительных цитокинов из цельной крови (n=15 доноров), цитотоксичность и активацию Т-клеток с добавлением экзогенной линии опухолевых IL1RAP+ клеток LAMA-84, как обсуждается в разделе Пример 1. Из 10 проанализированных цитокинов большинство цитокинов приводило к измеримому дозозависимому высвобождению в ответ как на IC3B19, так и на IC3B34, за исключением ИЛ-8 и ИЛ-12p70. Как показано в таблице 39, ИЛ-10, ИЛ-2, ФНО- α и ИФН- γ приводили к наиболее сильному высвобождению EC50 (нМ). Кроме того, большинство цитокинов и в обеих временных точках, молекула IC3B34 приводила к менее высокой EC50 (нМ), которая была статистически значимой. Исключением были ИЛ-4 (24 часа), ИЛ-6 (24 и 48 часов), ИЛ-8 (24 и 48 часов), ИЛ-12p70 (24 и 48 часов), ИЛ-13 (24 часа), ИФН- γ (24 и 48 часов) и ФНО- α (24 часа), которые не имели статистически значимой разницы в значениях EC50 (нМ) между IC3B19 и IC3B34.

Таблица 39. Сводная таблица четырехпараметрической логистической регрессии IC3B19 и IC3B34. Полужирным шрифтом обозначена статистически значимая разница в

значениях EC50 (нМ) между IC3B19 и IC3B34. Результаты экспериментов по высвобождению отдельных цитокинов показаны на указанных **фигурах**.

Цитокин	№ Фиг.	Эксперимент	EC50	Угловой коэффициент	Минимум	Максимум
НЕК-1-бета	Фиг. 37	24 часа	0,0027	0,3046	0,0268	0,2033
НЕК-1-бета	Фиг. 38	48 часов	0,0010	0,3951	0,2543	0,0528
ИЛ-2	Фиг. 39	24 часа	0,0001	0,0256	0,3103	0,6466
ИЛ-2	Фиг. 40	48 часов	знач.	0,2079	0,0158	0,0008
ИЛ-4	Фиг. 41	24 часа	0,2415	0,4668	0,2942	0,0043
ИЛ-4	Фиг. 42	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-6	Фиг. 43	24 часа	знач.	0,0819	0,1151	0,5224
ИЛ-6	Фиг. 44	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-8	Фиг. 45	24 часа	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-8	Фиг. 46	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-10	Фиг. 47	24 часа	< 0,0001	0,0010	0,3406	0,7036
ИЛ-10	Фиг. 48	48 часов	< 0,0001	0,2702	0,0011	0,0004
ИЛ-12p70	Фиг. 49	24 часа	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-12p70	Фиг. 50	48 часов	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-13	Фиг. 51	24 часа	Н/д	Н/д	Н/д	Н/д
ИЛ-13	Фиг. 52	48 часов	0,0106	0,8268	< 0,0001	< 0,0001
ИФН-гамма	Фиг. 53	24 часа	0,0065	0,6920	0,4644	0,3179
ИФН-гамма	Фиг. 54	48 часов	0,0266	0,1678	0,2695	0,0319
ФНО-альфа	Фиг. 55	24 часа	0,0016	0,0128	0,1443	0,7895
ФНО-альфа	Фиг. 56	48 часов	0,0004	0,5553	0,0043	0,5216

4-3 Оценка биспецифических антител к IL1RAP в анализе цитотоксичности каспаз

Опосредованное Т-клетками уничтожение IC3B19 и IC3B34 измеряли с применением анализа клеточной токсичности второго типа. Анализ цитотоксичности каспазы косвенно измеряет гибель клеток через расщепление флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру.

Замороженные пан CD3+ Т-клетки (приобретены у Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки-мишени (клетки NCI-H1975, линия клеток

аденокарциномы легкого человека, экспрессирующая IL1RAP) культивировали в среде RPMI 1640/Glutamax (25 mM буфер HEPES) с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS, 1 mM пирувата натрия и 0,1 mM заменимых аминокислот (Life Technologies).

Клетки-мишени высевали из расчета 20000 клеток/лунку в 50 мкл среды RPMI, не содержащей фенолового красного, содержащей добавки, за 16 часов до начала эксперимента в обработанные культурой ткани прозрачные планшеты с плоским дном (Costar). Клетки инкубировали при комнатной температуре (RT) в течение 20 мин, чтобы обеспечить равномерное распределение клеток в лунках, а затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи.

В день эксперимента T-клетки подсчитывали и разводили до $1,0 \cdot 10^6$ клеток/мл в среде RPMI без фенола красного, содержащей добавки, и объединяли с субстратом каспазы-3/7 Nuc-View TM488 (Essen Biosciences) для получения рабочей концентрации 10 мкМ. В каждую лунку добавляли по 100 мкл объединенных T-клеток и субстрата каспазы-3/7 с конечной концентрацией 5 мкМ субстрата каспазы-3/7.

Биспецифические антитела IC3B19 (IAPB57×CD3B219), IC3B34 (IAPB57×CD3B376), CD3B288 (Null×CD3B219), и IAPB57×Null (IAPB101) получали в 4-кратной конечной концентрации в среде RPMI без фенолового красного, содержащей добавки и 50 мкл антител были добавлены в каждую лунку. После 20-минутной инкубации при комнатной температуре для равномерного распределения в лунках планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience). Incucyte Instrument находится в увлажненном инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂.

Описание обработки на Incucyte было разработано для клеток NCI-H1975. Это описание обработки четко идентифицирует каспазную активность клеток-мишеней, при этом исключая T-клетки по размеру. Измерения проводились в T0 и каждые шесть часов в течение периода до 120 часов. Максимальный сигнал был определен через 72 часа после обработки, когда данные были проанализированы.

После завершения анализа каждый планшет анализировали с использованием описания обработки NCI-H1975. Необработанные данные флуоресценции экспортировали с программного обеспечения Incucyte Zoom и вставляли в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., г. Ла-Холья, штат Калифорния, США). Активность каспазы 3/7 определяли путем вычисления площади под кривой (AUC) для каждой лунки в GraphPad. Значения AUC отображали на графике в виде зависимости Log₁₀ концентраций антител в нМ. EC₅₀ для каждой кривой концентрация-ответ в наномоль/л (нМ) регистрировали после нелинейного регрессионного анализа (сигмоидальная кривая «доза-ответ» с переменным угловым коэффициентом). Каждый анализ включал две технических повторности и четыре измерения в каждой технической повторности.

И IC3B19, и IC3B34, но не биспецифические антитела с нулевыми плечами (IAPB57×B23B49 или B23B39×CD3B219), индуцировали мишень-специфическую цитотоксичность в клетках NCI-H1975 (Фиг. 57). В этом анализе цитотоксичность EC₅₀ варьируется в пределах трех раз для IC3B19 и IC3B34, при этом значения составляют

0,018 и 0,057 нМ, соответственно.

4-4 Эффективность IAPB57×CD3B376 в ксенотрансплантатах человеческих клеток нМРЛ Н1975 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG

Эффективность биспецифического антитела к IC3B34 IAPB57×CD3B376 оценивали на развившихся ксенотрансплантатах немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека Н1975 у самок мышей NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG), гуманизированных человеческими Т-клетками. IAPB57×CD3B376 в дозе 0,1, 0,35 или 1 мг/кг или контрольное антитело Null×CD3 вводили на 14, 18, 21 и 25 дни, всего 4 дозы. На 29-й день после имплантации опухоли, который был последней датой исследования, когда в группе оставалось десять животных, было рассчитано ингибирование роста опухоли (%TGI). Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали с IAPB57×CD3B376 в дозе 0,35 и 1 мг/кг с 63% и 89% TGI, соответственно, по сравнению с контролем Null×CD3 (двусторонний дисперсионный анализ с поправкой Бонферрони, $p < 0,0001$, **Фиг. 58**).

5 Антитела к CD33

5-1 Создание антигенов

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 шестигистиридиновой меткой (SEQ ID NO: 596), синтезировали и клонировали в вектор экспрессии для секреции у млекопитающих под управлением промотора актина с использованием стандартных методов молекулярной биологии.

Внеклеточный домен (ВКД) полноразмерного CD33 человека, полученный из Uniprot P20138 (SEQ ID NO: 235) (ВКД CD33 человека), сливали на N-конце с сигнальной последовательностью и с HSA или без нее, после чего следовала шестигистиридиновая метка (SEQ ID NO: 596) на С-конце, (ВКД hCD33 с HSA и только ВКД hCD33). Конструкт, экспрессирующий CD33 человека, временно 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 афинной 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

экслюзионной хроматографии (Phenomenex; г. Торранс, штат Калифорния). Измерения уровней эндотоксина проводили с использованием кассет EndoSafe-PTS, хромогенного LAL-теста (Charles River; г. Уилмингтон, штат Массачусетс).

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 конструировали, экспрессировали и очищали в виде ВКД полноразмерного человеческого CD33.

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.

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°C и инкубировали в течение еще 2 часов. Невключенный биотин удаляли путем замены буфера на 1x DPBS. 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 40.

Таблица 40. Последовательности антигена

Название белка	ID белка	SEQ ID NO
ВКД CD33 яванского макака с HSA	C33W1	236
ВКД CD33 человека с HSA	C33W2	237
V-домен CD33 человека с HSA	C33W3	238
C2-домен CD33 человека с HSA	C33W4	239
V-домен CD33 человека с His	C33W8	240
C2-домен CD33 человека с His	C33W9	241
ВКД CD33 человека с His	C33W49	242
ВКД CD33 яванского макака с His	C33W50	243
CD33 человека, полноразмерный		244
CD33 яванского макака, полноразмерный		245

5-2 Создание изогенных линий клеток, экспрессирующих CD33

Линии клеток, экспрессирующие CD33 человека и яванского макака, получали с использованием лентивируса (Genecoreia; г. Роквилл, штат Мэриленд, США), содержащего полноразмерный CD33 человека 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).

Кроме полученных с помощью НЕК 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 культивировали при 37 °C, 5% CO₂ в полной культуральной среде RPMI с 10% FBS.

5-3 Кампании иммунизации

OmniRat

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_LS, связанных с J_L-C_L, 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 с образованием 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.

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.

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.

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.

OmniMouse

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 вариабельными областями.

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.

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.

Клонирование V-области

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 °С, 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/мкл, Invitrogen) и

SuperScriptTM III RT (200 Ед/мкл, 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 с использованием предварительно разработанных праймеров для получения последовательностей *v*-области. Полученные файлы в формате *abi* для последовательностей *v*-областей собирали и анализировали с помощью программы анализа последовательностей *v*-областей по Сенгер, 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 32 первых последовательностей, идентифицированных в процедурах с OMNIRat (см. Таблицу 41), и 8 последовательностей, идентифицированных в процедуре OMNIMouse (см. Таблицу 42) с несколькими антителами OMNIRat, клонированными в IgG1, а также в IgG4 PAA, а все последовательности из процедур с OMNIMouse клонировали как в IgG1, так и в IgG4 PAA.

Таблица 41. Последовательности антител, идентифицированные посредством иммунизации CD33 у крыс OMNIRat

мкАт	ID HC	Изотип HC	ID LC
C33B46	C33H108	hulgG1F405L	C33L74
C33B48	C33H80	hulgG1F405L	C33L73
C33B52	C33H42	hulgG1F405L	C33L8
C33B54	C33H44	hulgG1F405L	C33L10
C33B55	C33H45	hulgG1F405L	C33L11
C33B56	C33H46	hulgG1F405L	IAPL24
C33B61	C33H48	hulgG1F405L	C33L58
C33B62	C33H49	hulgG1F405L	C33L59
C33B63	C33H51	hulgG1F405L	C33L34
C33B64	C33H52	hulgG1F405L	N46L109
C33B66	C33H55	hulgG1F405L	C33L42
C33B72	C33H65	hulgG1F405L	C33L47
C33B73	C33H66	hulgG1F405L	C33L60

C33B75	C33H70	hulgG1F405L	N46L109
C33B77	C33H72	hulgG1F405L	C33L40
C33B79	C33H74	hulgG1F405L	C33L38
C33B80	C33H76	hulgG1F405L	C33L39
C33B82	C33H78	hulgG1F405L	C33L57
C33B83	C33H81	hulgG1F405L	C33L53
C33B87	C33H87	hulgG1F405L	C33L35
C33B88	C33H88	hulgG1F405L	C33L61
C33B89	C33H90	hulgG1F405L	C33L51
C33B94	C33H98	hulgG1F405L	C33L69
C33B95	C33H98	hulgG1F405L	IAPL24
C33B96	C33H99	hulgG1F405L	C33L37
C33B101	C33H69	hulgG1F405L	C4LL152
C33B107	C33H68	hulgG1F405L	C33L17
C33B120	C33H87	hulgG1F405L	C33L41
C33B122	C33H92	hulgG1F405L	C33L30
C33B123	C33H91	hulgG1F405L	C33L44
C33B124	C33H73	hulgG1F405L	C33L32
C33B125	C33H84	hulgG1F405L	C33L66
C33B760	C33H45	huIgG4 PAA	C33L11
C33B777	C33H65	huIgG4 PAA	C33L47
C33B778	C33H66	huIgG4 PAA	C33L60
C33B782	C33H72	huIgG4 PAA	C33L40
C33B792	C33H87	huIgG4 PAA	C33L35
C33B799	C33H98	huIgG4 PAA	C33L69
C33B806	C33H69	huIgG4 PAA	C4LL152
C33B830	C33H84	huIgG4 PAA	C33L66
C33B836	C33H80	huIgG4 PAA	C33L73
C33B937	C33H66	huIgG4 PAA	C33L132

HC: Тяжелая цепь; LC: Легкая цепь

Таблица 42. Последовательности антител, идентифицированные посредством иммунизации CD33 у OMNIMouse

мкАт	ID HC	ID LC
C33B901	C33H249	C33L115
C33B902	C33H250	C33L116
C33B903	C33H251	C33L117

C33B904	C33H252	C33L118
C33B905	C33H253	C33L119
C33B906	C33H254	C33L120
C33B907	C33H255	C33L121
C33B908	C33H256	C33L122
C33B909	C33H249	C33L115
C33B910	C33H250	C33L116
C33B911	C33H251	C33L117
C33B912	C33H252	C33L118
C33B913	C33H253	C33L119
C33B914	C33H254	C33L120
C33B915	C33H255	C33L121
C33B916	C33H256	C33L122

НС: Тяжелая цепь; LC: Легкая цепь

5-4 Трансфекция Expi293 и очистка в малых масштабах

Антитела, идентифицированные в кампаниях иммунизации и последующем клонировании V-области (в IgG1 F405L и IgG4 PAA), экспрессировали и очищали в небольшом масштабе 2 мл. Клетки Expi293TM (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среду для экспрессии Expi293TM 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 пересеивали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при 3×10^6 - 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

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).

Клетки Expi293TM 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 OptiMEMTM (ThermoFisher Scientific) в следующем соотношении: 0,250 мкг ДНК тяжелой цепи: 0,750 мкг ДНК легкой цепи: 0,5 мкг рAdvantage. 5 мкл реагента для трансфекции ExpiFectamineTM 293 разбавляли и осторожно перемешивали с 95 мкл среды OptiMEMTM и инкубировали в течение 1 мин. Разбавленный реагент ExpiFectamineTM 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°C и при 7% CO₂ добавляли 1,8 мл клеток Expi293™.

Через 1 день после трансфекции добавляли 10 мкл реагента ExpiFectamine™ 293 Enhancer 1 и 100 мкл 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 × g в течение 15 минут перед очисткой.

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 мкл смеси 1: 4 MabSelect SuRe (GE Healthcare) и DPBS-/- суспензии в каждую лунку 96-луночного стеклянного фильтровального планшета с 1 мкМ порами Acroprep Advance (Pall). К планшету прикладывали вакуумное давление 200 мбар для удаления избытка PBS и затем промывали 800 мкл свежего PBS. Для удаления промывочного буфера применяли давление вакуума 200 мбар. Затем осветленные супернатанты переносили на смолу, промывку PBS, осторожно перемешивали и инкубировали в течение 15 минут. После инкубации применяли вакуумное давление 200 мбар для удаления супернатанта. MabSelect Sure трижды промывали PBS и один раз 25 мМ 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 М 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 мкл 2,5 М трис-ацетата, pH 7,2. мкАт диализовали 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 мкМ 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).

Таблица 43. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей мкАт к CD33

ID HC	SEQ ID NO	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
B23H1	246	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGK ALEWLAHIYWDDDKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNM DPVDTATYYCARLYGFTYGFAYWGQGLTVTVSS
CD3H141	247	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPG KGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQ MNSLKTEDTAVYYCARHGNFNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

CD3H219	20	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSTLCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQL NSVTPEDTALYYCARGYSSSFYWGQGTLVTVSS
C33H42	248	QLQLQESGPGLVNPSETLSHTCTVSGGSISSSSHYWGWRQPPG KGLEWIGKIYYSGNTYYNPSLKSRTISIDTSKNQFSLKMSSVT AADTAVYYCARLADVVPVPAARYFDSWGQGTLVTVSS
C33H44	249	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSNSAAWNWRQSPS RGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVRSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYHCARETMFRGLMDYWGQGTLVTVSS
C33H45	250	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPG KGLEWVAVISYDGSNKYCADSVKGRFTISRDNKSTLYLQMNS LRAEDTAVYYCAKDFRSLDWLPPDSTS YDGMDVWGQGTTVT VSS
C33H46	251	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTNYAMNWRQAP GQGLEWMGWINTNTGNPTYAQAFTRGFVFLDTSVSTAYLQIS SLKAEDTAVYYCARDREVRDYWGQGTLVTVSS
C33H48	252	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSTNYWGWIRQPPG KGLEWIGTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYYCARLADVVPVPAARYFDYWGQGILVTVSS
C33H49	253	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSGFYWGWRQPPR KGLEWIGTIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYFCARLADVVPVPAARYFDNWGQGTLVTVSS
C33H51	254	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISTGRYYWGWIRQPPG KGVIWIGNIYYSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVT AADTAVYYCARLGLSLVVVPAAMSFYWGQGTLVTVSS
C33H52	255	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWVRQPP GKGLEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSVT AADTALYYCARLGLSLVVVPAAMSFYWGQGTLVTVSS
C33H55	256	QVQLQESGPGLVKPSGTLSTLCAVSGGSISSSNWWSWVRQPPG RGLEWIGEIYHSGNTNNSPSLKSRTISADKSKNQFSLKLSVTA ADTAVYFCARIIAVARYFDSWGQGTLVTVSS
C33H65	257	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVVVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRDFDWLPPDSTSYHGMDVWGQGTTV TVSS
C33H66	258	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEGTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTV TVSS
C33H68	259	EVQLLES GGGLVQP GGS LGLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPG KGLNWVSAIDYSGNDTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKESQLLHGLFEHWGQGILVTVSS
C33H69	26	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWRQPPG KGLDWIGSINYSGSTYYNPSLKSRTISVDTSKIQFSLKLSVTA ADTAVYYCARLDGYESPFDYWGQGTLVTVSS

C33H70	261	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRGSSYYWGWIRQPPG KGLEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARLGSLVVVPAAMSFYWGQGTTLVTVSS
C33H72	262	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KGLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGTTLVTVSS
C33H73	263	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFTFSSYAMTWVRQAPGK GLEWVSTINISGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTKGGYSSGPFYWGQGTTLVSVSS
C33H74	264	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASRFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVHYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTV TVSS
C33H76	265	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARTYNSGYDGDYFDYWGQGTTLVTVSS
C33H78	266	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRYFDWLPPDSSSYGMDVWGQGTTV TVSS
C33H80	267	QVQLVQSGSELRKPGASVKVSKASGYTFTNYAMNWVRQAP GQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSSAYLQIS SLKAEDTAMYYCATDRDRGTDYWGQGTTLVTVSS
C33H81	268	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSAAYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTV TVSS
C33H84	269	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSTSYGMDVWGQGTTV TVSS
C33H87	270	EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KGLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDNVKNLSLYLQMN SLRTEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGTTLVTVSS
C33H88	271	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTLTRSAMNWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVNTAYLLISS LKTEDTAVYYCASDILPGYHEDYWGQGTTLVTVSS
C33H90	272	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPS RGLEWLGRTYYSKQWYNDYALSQSRITINPDTSKNQFSLQLN SVTPEDTAVYYCAREVAVAAAMSFYWGQGTTLVTVSS
C33H91	273	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSRSHYWGWIRQPPG VGLEWIGSIYTGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARLADIVVPAARYFDYWGQGTTLVTVSS
C33H92	274	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSSSYWGWIRQPPG KGPEWIGSIYSSGNTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLISMTA ADTAVFYCARLAATIVVPAARYFDCWGQGTTLVTVSS

C33H98	275	EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPG KGLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRLGYFDYWGQGLTVTVSS
C33H99	276	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMTWVRPAPG KGLEWVANIKRDGGEKYYVDSVKGRFTISRDNAAANSLYLQMN SLRVEDTAVYYCARPFYDHFYWGQGLTVTVSS
C33H108	277	QVQLVQSGSELKPGASVKVSCASGYTFSTYAMNWVRQAPG QGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQISS LKAEDTAVYYCARDRDRGTDYWGQGLTVTVSS
C33H249	278	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCVASGFTFDDYAIHWVRQAPGK GLEWVSGLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LKTEDTAFYYCTKDTPYGDYFDYWGQGLTVTVSS
C33H250	279	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAGSGFTFDDYAIHWVRQAPGK GLEWVSGLSWNGGNIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSL KTEDTAFYYCAKDSPYGDYFDYWGQGLTVTVSS
C33H251	280	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGIGWSGGSSIVYADSVKGRFKISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGLTVTVSS
C33H252	281	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPG KGLEWVSGIGWSGGSSIVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNS LRAEDTALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGLTVTVSS
C33H253	282	EVQLLESGGGLVQPGGSLKLSCASGFTFRSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAINGYGDGRYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYSCAKDQGFGEFFDYWGQGLTVTVSS
C33H254	283	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYYGMHWVRQAPD KGLEWVAVIWFDGNNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDRELLFDYWGQGLTVTVSS
C33H255	284	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQVPG EGLEWVSGISWNGGDMVYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRPEDTALYYCVKDMPYFDFTGSDYYYYGMDVWGQGT TVTVSS
C33H256	285	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSNYGMHWVRQAPG KGLEWVAVIWYVGSCHKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARDGSLCFDYWGQGLTVTVSS
ID LC	SEQ ID NO	АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
B23L3	286	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGISYMHYQQK PGQPPKLLIYAASNPESEVDFRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQIEDPWTFGQGTKVEIK
CD3L66	287	QTVVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPG QAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEA EYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
CD3L150	52	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDK APKVVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADY HCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL

C33L8	288	SYELTQPPSVSVSPGQTASIICSGDKLGNKYACWYQQKPGQSPV LVIIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQ AWDSSTYVFGTGTKVTVL
C33L10	289	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGSNIGSKSVHWYQQKPGQAP VMVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDSSSDVVFGGGTKLTVL
C33L11	290	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VVVIYKDSKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
IAPL24	291	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L58	292	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDYKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTYVFGTGTKVTVL
C33L59	293	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDYKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQTMDEADYYC QAWDISTYVFGTGTKVTVL
C33L34	294	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQLRPGQSPI LVIIYQDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ AWDSSTWVFGGGTKLTVL
N46L109	295	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTWVFGGGTKLTVL
C33L42	296	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGIKSVHWYQQKPGQAP VLVYDDSDRPPGIPERFSGSNSGNTATLTITRVEAGDEADYYC QVWDSSSDHVFGGGTKLTVL
C33L47	297	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VVVIYQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L60	298	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDGKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYC QAWDRNTVVFGGGTKLTVL
C33L17	299	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQ QKAGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFILIISLQAED VAVYYCQQYYGTPWTFGQGTKVEIK
C4LL152	300	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFRSGSGSGTDFLTLISSLPEDFATYYC QQANSFPFTFGPGTKVDIK
C33L40	301	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPV LVIIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQ AWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L32	302	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVRWYQQKTGQSP VLVMIYQDSKRPSGIRERFYGSNSGNTATPTISGTQAVDEAEYY CQAWDSSTGVVFGGGTKLTVL

C33L38	303	SYELTQPPSVSVPPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWGRNTVVFGGGTKLTVL
C33L39	304	QSALTQPASVSGSPGQSIPISSTGTSSDDGKNNIVSWYQQHPGK APKLMYKDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQADDEADY HCCSYAGASNHVVFVFGGGTKLTVL
C33L57	305	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGNKYACWYQQKPGQSP VVVVYQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYY CQAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L73	306	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVG DYNVSWYQQHPGK VPKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSMGNTASLTISGLQAEDEADY YCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVL
C33L53	307	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSNTVVFGGGTKLTVL
C33L66	308	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSP VVVIHQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L35	309	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYASWYQQKPGQSP VLVIYQDTKRPSGIPERVSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYHC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L61	310	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGINS DVGSYDLVSWYQQHPGK APKLLIYDGSERPSGVFGRFSGSKSDNTTSLTISGLQAEDEAA Y YCCSYEVTTTYVVFGGGTKLTVL
C33L51	311	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWSQQKPGQAP VLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSNSDHVVFGGGTKLTVL
C33L44	312	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISETQAMDEADYYC QAWDSSTYVFGTGTKVTVL
C33L30	313	SYELTQPPSVSVSPGQTVSISCSGDR LGDKYACWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSSYVFGTGTKVTVL
C33L69	314	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFACWYQQKPGQSPV LVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ AWDSSTVVFGGGTKLTVL
C33L37	315	SYVLTQPPSVAVAPGQTARITCGGSNIGKISVHWYQQKAGQAP VLVHDDRARPSGIPERLSGSNSGTTATLTISRVEVGDEADYYC QVWNSSSVHPVFGGGTKLTVL
C33L74	316	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDDNYVSWYQQHPGK APKLMYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQSEDEADY YCSSYSSSTTLEVFGGGTKLTVL
C33L115	317	DIQMTQSPSSVWASVGDVRTITCRASQGISSWLAWYQQQPGKA PNLLIYRSSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ QDNSFPYTFGQGTKLEIK

C33L116	318	DIQMTQSPSSEWASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYGASSWQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQDNSFPYTFGQGTKLEIK
C33L117	319	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVLYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLISWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAE DVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK
C33L118	320	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQ QKPGQPPKLLISWASTRKSVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAE DVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK
C33L119	321	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISWLAWYQQKPGKAP KLLIYKASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYCCQ QYNSYPWTFGQGTKVEIK
C33L120	322	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDELGDAMYACWYQQKPGQSP LVVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYC QTDWTRIAVFGGGTNLTVL
C33L121	323	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNLGNEHVCWYHQKPGQSP VLVIYQNNKRPSGIPERFSGSNSGNTATLSISGTQATDEADYYC QAWDSTTAVFGGGTKLTVL
C33L122	324	SYELTQPPSVSVSPGQTANISCSGVTLGYNAYWYQQKPGQSPI LVISQDTQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEAAYYCQ AWDITTVLFGGGTKLTVL
C33L132	325	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSP VLVIYQDGKRPSGIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYC QAWDRNTVVFGGGTKLTVL
C33L41	326	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGNKYASWYQQKPGQSP VLVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC QAWDSSTVVFGGGTKLTVL

Таблица 44. Последовательности CDR1-3 тяжелой цепи мкАт к CD33

ID HC	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23H1	GFSLSTSG MG	327	IYWDDDK	368	ARLYGFTYGFAY	409
CD3H1 41	GFTENTYA	328	IRSKYNNY AT	369	ARHGNFGNSYVSWFAY	410
CD3H2 19	GDSVFNNN AA	329	TYYRSKW LY	370	ARGYSSSFYD	411
C33H42	GGSISSSSH Y	330	IYYSGNT	371	ARLADV VVVPAARYFDS	412
C33H44	GDSVSSNS AA	331	TYYRSKW YN	372	ARETMFRGLMDY	413
C33H45	GFTFSSYG	332	ISYDGSNK	373	AKDFRSLDWLPPDSTS YDG MDV	414
C33H46	GYTFTNYA	333	INTNTGNP	374	ARDREVRDY	415
C33H48	GGSIIRSTNY	334	IYYSGNT	375	ARLADV VVVPAARYFDY	416

	Y					
C33H49	GG SIRSSGF Y	335	IY YSGNT	376	ARLADV VVVPAARYFDN	417
C33H51	GG SISTGRY Y	336	IY YSGNT	377	ARLGSL VVVPAAMSFYD	418
C33H52	GG SIRGSSY Y	337	IY SSGNT	378	ARLGSL VVVPAAMSFYD	419
C33H55	GG SSSSNW	338	IY HSGNT	379	ARIIVARYFDS	420
C33H65	GFT FSSYG	339	IS YDGSNK	380	AKDFRDFDWLPPDSTS YHG MDV	421
C33H66	GFT FSSYG	340	IS YDGSNK	381	AKDFRSFDWLPPDSASYHG MDV	422
C33H68	GFT FSGYA	341	ID YSGNDT	382	AKESQLLHGLFEH	423
C33H69	GG SSSSSY Y	342	IN YSGST	383	ARLDGYESPFDY	424
C33H70	GG SIRGSSY Y	343	IY SSGNT	384	ARLGSL VVVPAAMSFYD	425
C33H72	GFT FSSYW	344	IKQH GSEK	385	ARDRDLGYFDY	426
C33H73	RFT FSSYA	345	IN ISGGST	386	TKGGYSSGPFYD	427
C33H74	RFT FSSYG	346	IS YDGSNK	387	AKDFRSFDWLPPDSASYHG MDV	428
C33H76	GFT FN YA	347	IS GSGGST	388	ARTYNSGY YDGDFYD	429
C33H78	GFT FSSYG	348	IS YDGSNK	389	AKDFRYFDWLPPDSSSY YG MDV	430
C33H80	GYTFT NYA	349	INTNTGNP	390	ATDRDRGTDY	431
C33H81	GFT FSAYG	350	IS YDGSNK	391	AKDFRSFDWLPPDSASYHG MDV	432
C33H84	GFT FSSYG	351	IS YDGSNK	392	AKDFRSFDWLPPDSTS Y YG MDV	433
C33H87	GFT FSSYW	352	IKQH GSEK	393	ARDRDLGYFDY	434
C33H88	GYTLTRSA	353	INTNTGNP	394	ASDILPGYHEDY	435
C33H90	GDSVSSNS AA	354	TY YRSKW YN	395	AREVAVAASFYD	436
C33H91	GG SSSRSH Y	355	IY YTGST	396	ARLADIVVVPAARYFDY	437
C33H92	GG SIRSSSY Y	356	IY SSGNT	397	ARLAATIVVPAARYFDC	438
C33H98	GFT FSSYW	357	IKQH GSEK	398	ARDRDLGYFDY	439
C33H99	GFT FSSYW	358	IKRDGGEK	399	ARPFYDHFYD	440
C33H10	GYTFSTYA	359	INTNTGNP	400	ARDRDRGTDY	441

8						
C33H249	GFTFDDYA	360	LSWNGGNI	401	TKDTPYGDYFDY	442
C33H250	GFTFDDYA	361	LSWNGGNI	402	AKDSPYGDYFDY	443
C33H251	GFTFDDYA	362	IGWSGGSI	403	AKDSPYGDFFDY	444
C33H252	GFTFDDYA	363	IGWSGGSI	404	AKDSPYGDFFDY	445
C33H253	GFTFRSYA	364	INGYGDGR	405	AKDQGFGELEFFDY	446
C33H254	GFTFSYYG	365	IWFDGNNK	406	ARDRELLFDY	447
C33H255	GFTFDDYA	366	ISWNGGD M	407	VKDMPYFDFLTGSDY ⁴ YY ⁴ YG MDV	448
C33H256	GFTFSNYG	367	IWYVGS ⁴ HK	408	ARDGSLCFDY	449

Таблица 45. Последовательности CDR1-3 легкой цепи мкАт к CD3

ID LC	CDR1	ID	CDR2	ID	CDR3	ID
B23L3	QSV ⁴ DYNGISY	450	AAS	492	QQI ⁴ EDPWT	534
CD3L66	TGAVTTSNY	451	GTN	493	ALWYSNLWV	535
CD3L150	SSNIGTYKF	452	EVS	494	VSYAGSGTLL	536
C33L8	KLGNKY	453	QDS	495	QAWDSSTYV	537
C33L10	NIGSKS	454	DDS	496	QVWDS ⁴ SSDVV	538
C33L11	KLGD ⁴ KY	455	KDS	497	QAWDSSTVV	539
IAPL24	KLGD ⁴ KY	456	QDS	498	QAWDSSTVV	540
C33L58	KLGD ⁴ KY	457	QDY	499	QAWDSSTYV	541
C33L59	KLGD ⁴ KY	458	QDY	500	QAWDISTYV	542
C33L34	KLGD ⁴ KY	459	QDS	501	QAWDSSTWV	543
N46L109	KLGD ⁴ KY	460	QDS	502	QAWDSSTWV	544
C33L42	NIGIKS	461	DDS	503	QVWDS ⁴ SSDHVV	545
C33L47	KLGD ⁴ KY	462	QDR	504	QAWDSSTVV	546
C33L60	KLGD ⁴ KY	463	QDG	505	QAWDRNTVV	547
C33L17	QSVLYSSNNK NY	464	WAS	506	QQYYGTPWT	548
C4LL152	QGISSW	465	AAS	507	QQANSFPFT	549

C33L40	KLGAKF	466	QDN	508	QAWDSSTVV	550
C33L32	KLGDKY	467	QDS	509	QAWDSSTGVV	551
C33L38	KLGDKY	468	QDN	510	QAWGRNTVV	552
C33L39	SSDDGKNNI	469	KDS	511	CSYAGASNHVV	553
C33L57	ELGNKY	470	QDR	512	QAWDSSTVV	554
C33L73	SSDVGDYNY	471	DVS	513	SSYSSSSALEV	555
C33L53	KLGDKY	472	QDN	514	QAWDSNTVV	556
C33L66	KLGDKY	473	QDR	515	QAWDSSTVV	557
C33L35	KLGNKY	474	QDT	516	QAWDSSTVV	558
C33L61	NSDVGSYDL	475	DGS	517	CSYEVTTTYVV	559
C33L51	NIGSKS	476	DDS	518	QVWDSNSDHVV	560
C33L44	KLGDKY	477	QDS	519	QAWDSSTYV	561
C33L30	RLGDKY	478	QDS	520	QAWDSSSYV	562
C33L69	KLGSKF	479	QDS	521	QAWDSSTVV	563
C33L37	NIGKIS	480	DDR	522	QVWNSSSVHPV	564
C33L74	SSDVGDYNY	481	DVS	523	SSYSSSTLEV	565
C33L11 5	QGISSW	482	RSS	524	QQDNSFPYT	566
C33L11 6	QGISSW	483	GAS	525	QQDNSFPYT	567
C33L11 7	QTVLYSSNNK NY	484	WAS	526	QHYYSTPYT	568
C33L11 8	QTVFYSSNNK NY	485	WAS	527	QHYYSTPYT	569
C33L11 9	QSISSW	486	KAS	528	QQYNSYPWT	570
C33L12 0	ELGDMY	487	QDS	529	QTWDTRIAV	571
C33L12 1	NLGNEH	488	QNN	530	QAWDSTTAV	572
C33L12 2	TLGYNY	489	QDT	531	QAWDITTVL	573
C33L13 2	KLGDKY	490	QDG	532	QAWDRNTVV	574
C33L41	KLGNKY	491	QDS	533	QAWDSSTVV	634

5-5 Определение характеристик мкАт к CD33

Антитела OMNIRat, идентифицированные посредством иммунизации, клонированные в v-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 мкл окрашивающего буфера на круглодонные планшеты (Becton Dickinson). Добавляли 50 мкл исследуемого мкАт или изотипического контроля в 2X концентрации в 3 разведениях и нуль (120 нМ, 12 нМ, 1,2 нМ и 0 нМ), и полученный раствор инкубировали в течение 30 минут при 4 °C. 100 мкл окрашивающего буфера добавляли во все лунки каждого планшета, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, буфер удаляли, 200 мкл буфера для окрашивания добавляли во все лунки каждого планшета, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и удаляли буфер. 50 мкл 2 мкг/мл конъюгированного с AF647 вторичного козьего антитела к человеческому Fc (Jackson Immunoresearch; г. Вест Гроув, штат Пенсильвания, США) и планшеты инкубировали в течение 30 мин при 4 °C. Во все лунки планшетов добавляли 100 мкл окрашивающего буфера, планшеты центрифугировали при 300 g в течение 5 мин и буфер удаляли. 200 мкл рабочего буфера (рабочий буфер представляет собой буфер для окрашивания, 1 mM 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.

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). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson Immunoresearch, кат. № 109-005-098) были непосредственно иммобилизованы по аминокислотной группе в концентрации 100 мкг/мл в ацетатном буфере, pH 4,5, с использованием сенсорного чипа CMD50m (Xantec, партия CMD50m0415.a) со 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 мкг/мл в течение 10 минут. Связывание измеряли на IBIS SPRi по кинетике одного цикла без регенерации. Каждую серию концентраций антигена (3 мкМ в серии 3-кратных разведений) последовательно вводили от низких (0,46 нМ) до высоких концентраций (3 мкМ) 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} .

В Таблице 46 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 определяли дополнительные характеристики с помощью эпитоп-специфической сортировки и полного кинетического анализа.

Таблица 46. Анализ связывания клеток и скорости диссоциации антител к CD33, полученных из OMNIRat

ID белка по а.к.	%Мо п	60 нМ CD33	6 нМ CD33	0,6 нМ CD33	0 нМ CD33	K_D
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

Таблица 46, продолжение:

ID белка по а.к.	60 нМ CD33 яванского макака	6 нМ CD33 яванского макака	0,6 нМ CD33 яванского макака	0 нМ CD33 яванского макака	K_D 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

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 ПИР ProteOn (Bio-Rad). Козьи антитела к человеческому Fc IgG (Jackson ImmunoResearch, кат. № 109-005-098) напрямую иммобилизованы по амино-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 мкМ в серии 3-кратных разведений из 5 концентраций применяли в качестве анализа 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 (K_d).

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 амино-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 анализита в растворе при 133 нМ для связывания иммобилизованных мкАт к CD33 с поверхностной регенерацией после каждого последовательного цикла введения антигена и антитела.

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.

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.

Таблица 47. Полный кинетический анализ и эпитоп-специфическая сортировка мкАт, полученных из OMNIRat

ВКД CD33 человека с HSA					
ID белка по а.к.	ID V-области	k_a (1/M*c)	k_d (1/c)	K_D (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

Таблица 47, продолжение.

ВКД CD33 яванского макака с HSA					
ID белка по а.к.	ID V-области	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	K_D (М)	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

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.

Таблица 48. 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
C33B909	253,50	206,04	169,77	119,51	176,49	170,25	154,00	191,28
C33B910	193,52	176,14	108,46	190,17	213,55	183,33	151,25	155,29
C33B911	1466,02	389,41	186,22	113,30	237954,27	100333,48	13501,02	114,07
C33B912	977,91	273,07	140,62	124,53	237140,86	101295,70	15726,96	149,54
C33B913	174,49	118,08	123,26	129,07	518952,00	409071,06	204694,14	127,82
C33B914	181,37	142,74	139,10	113,48	304350,88	315129,56	153252,58	185,45
C33B915	101,28	147,65	143,51	100,00	390477,25	362902,66	138398,56	112,22
C33B916	416,08	145,16	115,70	91,75	447815,47	404033,19	192941,55	167,07

Таблица 48, продолжение:

мкАт	CD33 яванского макака			
	60 нМ	6 нМ	0,6 нМ	0 нМ
C33B909	180,33	135,33	115,73	124,03
C33B910	202,42	135,18	116,71	175,97
C33B911	17036,56	7729,14	1935,16	97,94
C33B912	15070,88	7271,38	1726,03	124,69

C33B913	40661,90	36920,95	35224,10	106,19
C33B914	44964,85	33368,26	22086,01	86,76
C33B915	37495,34	35692,21	36165,59	113,92
C33B916	41004,43	33294,78	22790,61	104,43

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 пиколярной 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.

Таблица 49. Полный кинетический анализ полученных из OMNIMouse мкАт

мкАт	ВКД CD33 человека с HSA			ВКД CD33 яванского макака с HSA		
	k_a (1/M*c)	k_d (1/c)	K_D (M)	k_a (1/M*c)	k_d (1/c)	K_D (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

Эксперимент по эпитоп-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 эпитопов. Программное обеспечение HtTools для сортировки назначает номера групп эпитопов в каждом эксперименте, и поэтому наличие нескольких контролей для уже определенных групп эпитопов играло решающую роль в перекрестном сравнении. Оба полученных из OMNIMouse клона с высокой аффинностью к CD33 человека (C33B911 и C33B912) были отсортированы с клонами из вышеуказанной группы 4 (группа 4 в данном эксперименте), а субнаномолярный клон (C33B916) был отсортирован в 2 в данном случае вместе с C33B836 (группа 1 в вышеуказанном эксперименте).

Таблица 50. Группы эпитопов OMNIMouse мкАт к CD33

мкАт	ID V-области	Эпитопная группа
C33B915	C33F553	1
C33B916	C33F554	2

C33B836	C33F53	2
C33B914	C33F552	2
C33B913	C33F551	3
C33B806	C33F106	3
C33B911	C33F549	4
C33B912	C33F550	4
C33B778	C33F78	4
C33B830	C33F130	4
C33B782	C33F82	5
C33B792	C33F92	5
C33B799	C33F99	5
C33B760	C33F60	6
C33B777	C33F77	7

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, экспрессируемой 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 42 и 45 по отношению к данным о связывании C2-домена в Таблице 51 всего имеется 15 мкАт, которые могут потенциально связываться с C2-доменом в диапазоне аффинности от ~ 25 нМ до ~ 30 пМ на человеческом полномразмерном белке.

Таблица 51. Константы диссоциации для связывания доменов

	ВКД huCD33 с HSA	V-домен huCD33 с HSA	C2-домен huCD33 с HSA	Эпитопная группа
ID белка	k_d (1/с)	k_d (1/с)	k_d (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 LSBio 906	2.45E-03	4.34E-02	Ответ отсутствует/ответ с низким уровнем связывания	

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 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 $4 \times 10^6 - 6 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

За два дня до трансфекции клетки ExpiCHO-STM 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).

Клетки ExpiCHO-STM 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 OptiPROTM (ThermoFisher Scientific) в следующем соотношении: 0,125 мкг ДНК тяжелой цепи: 0,375 мкг ДНК легкой цепи: 0,5 мкг pAdvantage. 6,4 мкл реагента для трансфекции ExpiFectamineTM CHO разбавляли и осторожно перемешивали с 0,04 мл холодной среды OptiPROTM и инкубировали в течение 1 мин. Разбавленный реагент ExpiFectamineTM CHO добавляли к разбавленной ДНК, осторожно перемешивали, а комплексы ExpiFectamineTM CHO/плазмидная ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. После инкубации комплексы добавляли к клеткам ExpiCHO-STM в шейкерной колбе и инкубировали в течение ночи в шейкере-инкубаторе при 37 °C, 7% CO₂.

Что касается протокола Max Titer, то в 1 день после трансфекции добавляли 6 мкл реагента ExpiFectamineTM CHO и 160 мкл питательного раствора ExpiCHOTM, после чего колбу переносили в шейкер-инкубатор при 32°C в атмосфере 7% CO₂. На 5 день после трансфекции в колбу снова добавляли 160 мкл питательного раствора ExpiCHOTM 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).

Экспрессированные антитела очищали из осветленных супернатантов с помощью 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 M Na-ацетатом, pH 3,5. Фракции пика нейтрализовали 2,5 M Tris pH 7,2 и объединяли. Пулы нейтрализованных фракций или диализовали в 1x dPBS для анализов и биофизических характеристик, или использовали для сборки биспецифического антитела.

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

6 Получение и функциональная оценка биспецифических антител к CD33×CD3

6-1 Обмен Fab-плечами с использованием очищенных исходных мкАт

Для получения биспецифических антител к CD33×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 высокоаффинным (CD3B376: VH с SEQ ID NO: 652, и VL с SEQ ID NO: 661) или низкоаффинным плечами к CD3 (CD3B450: VH с SEQ ID NO: 657, и VL с SEQ ID NO: 678). Эти исходные мкАт (плечи к CD33 и CD3) находятся в формате IgG4 PAA (Labrijn et al, 2013), где нацеливающее исходное мкАт (CD33) содержит мутацию Genmab 409R (нативная аминокислота для IgG4), уничтожающее исходное мкАт (CD3) содержит мутацию F405L и R409K. Одно из моноспецифических антител к CD3 экспрессировали в виде IgG4, имеющего в Fc замены S228P, F234A, L235A, F405L и R409K (плечо к CD3) (нумерация согласно индексу EU) в Fc-областях. 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 2-МЕА (2-меркаптоэтиламина) и инкубировали при 31°C в течение 5 часов или при комнатной температуре в течение ночи. 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), причем 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 CD33×CD3 выполняли с избытком антитела к CD33 (соотношение) для сведения к минимуму количества непрореагировавшего исходного антитела к CD3, оставшегося после рекомбинации.

Полученные конечные биспецифические антитела к CD3×CD3 вместе с исходными мкАт (т. е. CD33, CD3 или «Null» (нуль)), используемыми в реакциях рекомбинации, перечислены в Таблице 47.

Отобранные подходящие антитела к CD33 также объединяли с неуничтожающим плечом («Null») для получения отрицательных контролей в целях тестирования. Для контрольных биспецифических антител B2M1 создавали, очищали антитело к RSV в формате IgG4 PAA и в комбинации с плечами к CD3 CD3B219 или CD3B376-F405L, R409K для получения CD3B288 (CD3×Null) и CD3B510 (CD3B376×Null), соответственно; Плечи к CD33 комбинировали с B23B49 для получения CD33×Null, как показано в таблице 52.

Таблица 52. Биспецифические антитела к CD33×CD3

Биспецифическое антитело	Исходное	ID пепт. HC	Пепт. VH, SEQ ID NO	ID пепт. LC	Пепт. VL, SEQ ID NO
C3CB7	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287

C3CB5	C33B830	C33H84	269	C33L66	308
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB4	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB16	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB14	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB12	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB11	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB10	C33B777	C33H65	257	C33L47	297
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB8	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB97	C33B836	C33H80	267	C33L73	306
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB98	C33B830	C33H84	269	C33L66	287
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB99	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB100	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB101	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB102	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB103	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB104	C33B777	C33H65	257	C33L47	297
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB105	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C33B941	C33B836	C33H80	267	C33L73	306

	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B942	C33B830	C33H84	269	C33L66	308
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B943	C33B806	C33H69	260	C4LL152	300
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B944	C33B799	C33H98	275	C33L69	314
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B945	C33B792	C33H87	270	C33L35	309
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B946	C33B782	C33H72	262	C33L40	301
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B947	C33B778	C33H66	258	C33L60	298
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B948	C33B777	C33H65	256	C33L47	297
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
C33B949	C33B760	C33H45	250	C33L11	290
	B23B49	B23H1	246	B23L3	286
CD3B288	B23B39	B23H1	246	B23L3	286
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
CD3B510	B23B39	B23H1	246	B23L3	286
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661
C3CB87	C33B903	C33H251	280	C33L117	319
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB88	C33B904	C33H252	281	C33L118	320
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB89	C33B905	C33H253	282	C33L119	321
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB90	C33B907	C33H255	284	C33L121	323
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB91	C33B908	C33H256	285	C33L122	324
	CD3B219	CD3H141	247	CD3L66	287
C3CB189	C33B904	C33H252	281	C33L118	320
	CD3B376	CD3H219	652	CD3L150	661

Пепт.: Пептид; Нукл.: Нуклеотид; SEQ ID: SEQ ID NO

6-2 Опосредованное CD33× CD3 снижение ex vivo blastов ОМЛ и активации Т-клеток в первичном образце ОМЛ

Для дальнейшей оценки потенциала цитотоксичности биспецифических антител к CD33×CD3 был проведен анализ цитотоксичности *ex vivo* с использованием цельной крови пациента с ОМЛ с использованием четырех лучших антител (Фиг. 62). 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.

Как показано на Фиг. 62, 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 CD33×CD3 действуют в аутологичных условиях. Эти результаты отражают данные для 4 других образцов доноров с ОМЛ (данные не показаны). В таблице 53 приводится краткая информация по значениям EC₅₀, полученным с помощью мультиспецифических антител к CD33×CD3. Как видно из значений EC₅₀, 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.

Таблица 53. Анализы опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности *ex vivo*. Сводка значений EC₅₀ для 8 биспецифических антител к CD33×CD3

ID 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

6-3 Демонстрация того, что биспецифические антитела к CD33×CD3 связываются с C2-доменами CD33 и индуцируют цитотоксичность в отношении линий клеток, экспрессирующих однонуклеотидный полиморфизм (SNP) CD33

Анализ опосредованной T-клетками цитотоксичности in vitro с использованием биспецифических антител к CD33×CD3

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 T-клетками цитотоксичности in vitro, чтобы оценить, опосредуют ли отобранные 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 T-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 и меченные CFSE клетки-мишени смешивали в соотношении эффектор: мишень (E: T) = 5:1 в стерильных 96-луночных круглодонных планшетах. В каждую лунку добавляли 10 мкл Fc Block (Fc-фрагмент РеоПро) вместе с аликвотой биспецифического антитела объемом 5 мкл в различных концентрациях. Культуры инкубировали при 37°C в течение 48 часов в атмосфере с 5% CO₂. через 48 часов к образцам добавляли окрашивающий 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. 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. 63**, в отличие от контролей с нулевым плечом (nullxCD3B219 и nullxCD3B376), V-домен-связывающие и C2-домен-связывающие CD33×CD3 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.

6-4 Ex vivo CD33×CD3-опосредованное снижение введенных MOLM-13 и моноцитов в анализе цитотоксичности в отношении MOLM-13 в цельной крови ex vivo

Для оценки потенциала цитотоксичности биспецифических антител к CD33×CD3 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 аутологичных T-клеток в крови донора. Перед разведением определяли содержание T-клеток в крови каждого донора. Затем кровь разводили мечеными CFSE (Invitrogen) клетками MOLM-13 таким образом, чтобы соотношение эффектор: мишень (E: T) 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 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 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. 64** демонстрируют, что оба биспецифических антитела к CD33×CD3 (одно и то же лидерное C33B904 к CD33, спаренное с любым плечом к CD3, CD3B376 и CD3B219) 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 EC₅₀ для цитотоксичности в отношении MOLM-13 и CD14⁺ моноцитов приведены в Таблице 54.

Таблица 54. Анализы опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности *ex vivo*. Сводка значений EC₅₀ для 2 биспецифических антител к CD33×CD3.

ИД биспецифического антитела	EC ₅₀ уничтожения MOLM13 (нМ)	EC ₅₀ уничтожения CD33 ⁺ CD14 ⁺ (нМ)
C3CB189	0,1677	1,156
C3CB88	0,671	0,506

6-5 Демонстрация видовой перекрестной реактивности биспецифических антител к CD33×CD3 в отношении яванского макака

*Опосредованное CD33×CD3 снижение *ex vivo* моноцитов в анализе цитотоксичности *ex vivo* с использованием цельной крови яванского макака*

Для демонстрации функциональной перекрестной реактивности и оценки цитотоксического потенциала биспецифических антител к CD33×CD3 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 PerCPy5.5, 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. 65** демонстрируют, что оба биспецифических антитела к CD33×CD3 (одно и то же лидерное С33В904 к CD33, объединенное с плечом к CD3, CD3В376 или CD3В219) 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 55 приведены средние значения для 6 различных доноров-яванских макаков.

Таблица 55. Анализы опосредованной CD33×CD3 Т-клетками цитотоксичности *ex vivo*. Сводка значений EC₅₀ для 2 биспецифических антител к CD33×CD3.

ID белка по а.к.	EC ₅₀ уничтожения CD33 ⁺ CD14 ⁺ (нМ)	EC ₅₀ активации Т-клеток (нМ)
С3СВ189	3,60	0,02
С3СВ88	0,89	0,02

6-6 Эффективность С3СВ189 и С3СВ88 в ксенотрансплантатах человеческих клеток ОМЛ MOLM-13 у гуманизированных Т-клетками мышей NSG

Эффективность С3СВ189 и С3СВ88 оценивали на стандартных ксенотрансплантатах человеческих клеток острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) MOLM-13, трансфицированных люциферазой, у самок мышей 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. С3СВ189 и С3СВ88 в концентрациях 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.

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 С3СВ189 (**Фиг. 66**) и С3СВ88 (**Фиг. 68**) во всех концентрациях по сравнению с контролем к NullxCD3. С3СВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг вызывало ингибирование роста опухоли на 76%, 100% и 82%, соответственно, а С3СВ88 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.

Лечение С3СВ189 и С3СВ88 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 С3СВ189, составила 19-27,5 дней (**Фиг. 67**), а у животных, получавших лечение С3СВ88, медиана выживаемости составила 26-28,5 (**Фиг. 69**) дней по всем дозам. С3СВ189 в дозах 0,005, 0,05 и 0,5 мг/кг привело 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.

7 Антитела к TMEFF2

7-1 Генерация антигенов

Человеческий внеклеточный домен (ВКД) TMEFF2 получали по последовательности с UniProt с номером доступа Q9UIK5. Конструкт ВКД была сконструирован с последовательностями 6-гистидиновой метки (SEQ ID NO: 596) и авидиновой метки на С-конце (конструкт TMEW1; **SEQ ID NO: 578**). Конструкт, содержащий домены FS2 и EGF (аминокислоты 151-320 конструировали в виде слияния человеческого сывороточного альбумина (HSA) с последовательностями 6-гистидиновой метки (SEQ ID NO: 596) и авидиновой метки (конструкт TMEW7; **SEQ ID NO: 579**). Конструкт, содержащий мембранный проксимальный домен TMEFF2 (остатки 230-320), сконструировали с 6-гистидиновой меткой (SEQ ID NO: 596) (конструкт TMEW19; **SEQ ID NO: 580**) или сливали с крысиным Fc IgG1 с гистидиновой меткой (конструкт TMEW20; **SEQ ID NO: 581**). Остатки 230-320 TMEFF2 содержат EGF домен, который охватывает остатки 261-301 TMEFF2. Экспрессионные конструкты ВКД человеческого TMEFF2 временно трансфицировали в клетки, полученные из HEK293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific), с использованием Expifectamine в соответствии с протоколом производителя. Перед сбором клетки инкубировали в течение 5 суток при 37°C в атмосфере с 8% CO₂ на орбитальной качалке. Экспрессирующие клетки удаляли центрифугированием, а растворимые белки TMEFF2 с His-метками очищали от среды с использованием аффинной хроматографии на иммобилизованных металлах с использованием смолы Fast Flow Ni Sepharose 6 (GE Healthcare) с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией на Superdex 200 (SEC) (GE Healthcare) в фосфатном буфере Дульбекко с pH 7,2 (1x DPBS). Аминокислотные последовательности генерированных антигенов показаны в **таблице 58**.

Таблица 58.

ИД белка по а.к.	Описание	Аминокислотная последовательность
TMEW1 (SEQ ID NO: 578)	TMEFF2-FL-ECD-His-Avi-метка	FPTSLSDCQTPTGWNCSGYDDRENDLFLCDTNT CKFDGECLRIGDVTVCVCQFKCNNDYVPVCGSN GESYQNECYLRQAACKQQSEILVVSEGSCATDA GSGSGDGVHEGSGETSQKETSTCDICQFGAEC EDAEDVWCVCNIDCSQTNFNPLCASDGKSYDN ACQIKEASCQKQEKIEVMSLGRCDNTTTTTTKS EDGHYARTDYAENANKLEESARENHIPCPEHYN GFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAGYTGQHCEK KDYSVLYVVPVRFQYVGGGSHHHHHHLNDI FEAQKIEWHE
TMEW7 (SEQ ID NO: 579)	FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avi-	SGETSQKETSTCDICQFGAECDEDAEDVWCVCN IDCSQTNFNPLCASDGKSYDNACQIKEASCQKQ EKIEVMSLGRCDNTTTTTTKSE DGHYARTDYAE

579)	метка	NANKLEESAREHHIPCPEHYNGFCMHGKCEHSI NMQEPSCRC DAGYTGQHCEK KDYSVLYVVPGP VRFQYVGGSGSGSENLYFQGVRS SDAHKSEVAH RFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQSPFEDHVKL VNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLC TVATLRETYGEMADCCA KQEPERNECFLQHKD DNP NL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYL YEIARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQ KFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT DLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQ DSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL PSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLY EY ARRHPDYSV VLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPH ECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC ELFQ LGE YKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGK VGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLH EKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVD ETY VPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKAD DKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSHHHH HLNDIFEAQKIEWHE
TMEW19 (SEQ ID NO: 580)	spTMEFF2(230- 320)G3S-H6	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREH HIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAG YTGQHCEK KDYSVLYVVPGPVRFQYVGGGSHH HHHH
TMEW20 (SEQ ID NO: 581)	spTMEFF2(230-320)- G3S-крысиный IgG1Fc	NTTTTTKSEDGHYARTDYAENANKLEESAREH HIPCPEHYNGFCMHGKCEHSINMQEPSCRC DAG YTGQHCEK KDYSVLYVVPGPVRFQYVGGGSPR NCGGDCKPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVL TITLT PKVTCVVVDISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTAQ TRPPEEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGR TFRCK VTSAAFPSPIEKTISKPEGRTQVPHVYTMSPTKEE MTQNEVSITCMVKG FYPPDIYVEWQMNGQPQE NYKNTPTMDTDGSYFLYSKLNVKKEKWQQG NTFTCSVLHEGLHNHNT EKSLSHSPGKGGGSHH HHHH

7-2 Создание антител к TMEFF2

Создание антител с использованием трансгенных крыс, экспрессирующих локусы иммуноглобулина человека (OmniRat®) Крысы OmniRat® содержат химерный человеческий/крысиный локус IgH (содержащий 22 человеческих сегмента V_H, все человеческие сегменты D и J_H в естественной конфигурации, связанные с крысиным локусом C_H), а также полностью человеческие локусы IgL (12 V_κ, связанных с J_κ-C_κ, и 16 V_λ, связанных с J_λ-C_λ). (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 с образованием высокоаффинных химерных человеческих/крысиных

моноклональных антител IgG с полностью человеческими вариабельными областями. Получение и применение OmniRat® и геномные модификации в таких крысах описаны в WO14/093908.

OmniRat иммунизировали конструктором TMEFF2 человека FS2-EGF-Tev-HSA(C34S)-His-Avi-метка (TMEW7, SEQ ID NO: 579) и стимулировали конструктором spTMEFF2 (230-320)G3S-FcIgG1 крысы (TMEW20, SEQ ID NO: 581). После 89 дневной схемы иммунизации собирали лимфатические узлы крыс и использовали их для создания гибридом, а супернатанты гибридом подвергали скринингу на связывание с белком человеческого TMEFF2-FL-ECD-His-Avi-метка (TMEW1) с помощью ИФА и/или SPARCL (люминесценция в аналитическом реагенте пространственной близости). Несколько супернатантов были отобраны для вторичного ELISA и SPARCL-скрининга связывания с ВКД TMEFF, FS2-EGF или доменом EGF только TMEFF2. На основании результатов скрининга несколько клонов гибридомы секвенировали, экспрессировали и охарактеризовали по функциональности.

Создание антител из библиотек фаговых дисплеев

Fab, связывающие TMEFF2, были выбраны стандартными методами из двух наборов библиотек фагового дисплея *de novo* pIX, как описано в Shi et al., J Mol Biol 397:385-96, 2010 и WO2009/085462). Вкратце, два набора библиотек, называемые V3.0 и V5.0, создавали путем диверсификации человеческих каркасов, в которых гены VH зародышевой линии IGHV1-69*01, IGHV3-23*01 и IGHV5-51*01 рекомбинировали с человеческим минигеном IGJ-4 посредством петли H3 (миниген IGJ-6 также использовался в V5.0), а человеческие гены VL-каппа зародышевой линии O12 (IGKV1-39*01), L6 (IGKV3-11*01), A27 (IGKV3-20*01) и B3 (IGKV4-1*01) рекомбинировали с минигеном IGKJ-1 для сборки полных доменов VH и VL. Для диверсификации были выбраны положения в вариабельных областях тяжелой и легкой цепей вокруг петель H1, H2, L1, L2 и L3, которые часто контактируют с белковыми и пептидными антигенами. Диверсификация последовательности в выбранных положениях ограничивалась остатками, встречающимися в каждом положении в семействах генов зародышевой линии IGHV или IGLV для соответствующих генов IGHV или IGLV. Диверсификацию в петле H3 создавали с использованием синтетических петель коротких или средних размеров длиной 7-14 аминокислот для библиотек V3.0 и длиной 6-19 аминокислот для библиотек V5.0. Распределение аминокислот в H3 выполняли аналогично наблюдаемой вариации аминокислот в человеческих антителах. Каркасы, использованные для создания библиотек, получали название в соответствии с их происхождением от человеческого гена зародышевой линии VH и VL. В обоих наборах V3.0 и V5.0 каждую из трех библиотек тяжелых цепей объединяли с четырьмя легкими цепями зародышевой линии или библиотеками легких цепей зародышевой линии для создания 12 уникальных комбинаций VH:VL для каждого набора библиотек, используемых в экспериментах по отбору.

Клонирование V-области

Общую РНК из лизатов клеток гибридомы фага очищали с использованием набора

RNeasy 96 (Qiagen) в соответствии с протоколом производителя. Полученную РНК количественно определяли с использованием Drop Sense и либо хранили при -80°C , либо использовали для синтеза кДНК с использованием системы синтеза First-Strand методом ОТ-ПЦР (Invitrogen). Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием ген-специфических праймеров, отоженных с константными областями тяжелых, каппа-и лямбда-цепей, соответственно. Реакционную смесь для ОТ-ПЦР, содержащую до 3 мкг очищенной РНК, ген-специфического праймера, смеси дНТФ, реакционного буфера, 25 mM MgCl_2 , DTT, RNaseOUT™ (40 Ед/мкл, Invitrogen) и SuperScript™ III RT (200 Ед/мкл, Invitrogen, кат. № 18080-051), инкубировали при 50°C в течение 50 минут и при 85°C в течение 5 минут. Полученную одноцепочечную кДНК хранили при -20°C или использовали непосредственно для ПЦР-амплификации. Реакцию ПЦР проводили с использованием полимеразы Platinum Pfx (Invitrogen). Фрагменты ν -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 секвенировали, аминокислотные последовательности выделенных ν -областей оптимизировали по кодонам и клонировали в вектор экспрессии на основе pUnderd, несущий константную область IgG4 с мутациями S228P, F234A и L235A (изотип IgG4PAA).

Трансфекция и очистка Expi293 в малых масштабах

Выбранные антитела, идентифицированные в ходе операций иммунизации или фагового дисплея, клонировали и экспрессировали как IgG1PAA и очищали в небольшом объеме 2 мл. Клетки Expi293™ (ThermoFisher Scientific) высевали с плотностью $1,25 \times 10^5$ - $2,25 \times 10^5$ жизнеспособных клеток/мл в среде экспрессии Expi293™ и культивировали в встряхиваемых колбах объемом 125 мл - 2 л при 37°C , 7% CO_2 . Клетки пересевали, когда плотность достигала логарифмической фазы роста при 3×10^6 - 5×10^6 жизнеспособных клеток/мл с 98-99% жизнеспособности.

В день трансфекции определяли плотность жизнеспособных клеток и процент жизнеспособности. Клетки трансфицировали с плотностью 3×10^6 жизнеспособных клеток/мл в соответствии с протоколом трансфекции производителя (ThermoFisher, публикация № MAN0007814). Культуру собирали на 6 сутки после трансфекции путем центрифугирования при $850 \times g$ в течение 15 минут перед очисткой. Антитела очищали из осветленных супернатантов с использованием смолы mAb Select Sure (GE Healthcare) и диализовали в PBS. Концентрации белка определяли путем измерения при длине волны A280 на фильтрате с помощью прибора DropSense (Trinean).

7-3 Определение характеристик антител к TMEFF2

Антитела к TMEFF2 связывают TMEFF2 с высокой аффинностью

Связывание выбранных антител IgG4PAA к TMEFF2 с ВКД TMEFF2 (TMEW1: TMEFF2-FL ECD-His-Avi-метка) и/или мембранной проксимальной областью (TMEW19: spTMEFF2(230-320)G3S-H6) оценивали с использованием Proteon (TMEB674, TMEB675, TMEB 565 и TMEB570) или Biacore SPR (TMEB762 и TMEB757). Кинетические

параметры связывания выбранных антител приведены в таблице 59. Было обнаружено, что антитела к TMEFF2 связываются как с мембранной проксимальной областью ВКД TMEFF2, так и с TMEFF2 с пикомолярной аффинностью.

Таблица 59.

Антитело	Антиген	Домен TMEFF2	k_a (1/М*с)	K_d (1/с)	KD (нМ)
TMEB674	TMEW1	ВКД	2.01E+06	1.62E-04	0,10
TMEB674	TMEW19	MP*	8.37E+05	1.75E-04	0,20
TMEB675	TMEW1	ВКД	2.65E+06	1.53E-04	0,10
TMEB675	TMEW19	MP	9.72E+05	1.58E-04	0,20
TMEB565	TMEW1	ВКД	3.84E+05	9.13E-06	0,02
TMEB565	TMEW19	MP	7.77E+05	6.39E-06	0,01
TMEB570	TMEW1	ВКД	4.64E+05	5.13E-05	0,11
TMEB570	TMEW19	MP	7.62E+05	4.67E-05	0,06
TMEB762	TMEW1	ВКД	5.41E+05	1.74E-04	0,32
TMEB757	TMEW1	ВКД	5.42E+05	1.67E-04	0,31
*MP: мембранная проксимальная область					

ППР ProteOn

Связывание мкАт к TMEFF2 с ВКД и мембранной проксимальной областью TMEFF2 человека измеряли методом ППР ProteOn (Bio-Rad). Очищенные мкАт (разведенные до конечной концентрации 1 мкг/мл в PBST) использовали в качестве лигандов в анализе и иммобилизовали посредством захвата Fc к антителам козьего античеловеческого (GАН) Fc IgG. Для аминного связывания GАН Fc IgG смесь 1:1 EDC (40 мМ) и NHS (10 мМ) смешивали непосредственно перед инъекцией для активации поверхности чипа и вводили в вертикальную ориентацию. Затем антитело GАН-Fc (30 мкг/мл) в ацетатном буфере (рН 5,0) пропускали по поверхности в течение 300 секунд при 30 мкл/мин в вертикальной ориентации. Впоследствии любые оставшиеся реакционноспособные карбоксильные группы на поверхности деактивировали путем инъекции 1 М этаноламина (рН 8,5) в той же ориентации. Антитела использовали в концентрации 1 мкг/мл для иммобилизации. Антитела протекали по поверхности в горизонтальном направлении. ВКД TMEFF2 человека или проксимальную область мембраны в серии 3-кратных разбавлений 5 концентраций (самая высокая концентрация в диапазоне 100-600 нМ) протекали в качестве анализа в вертикальной ориентации для связывания с захваченными молекулами. Буферный образец также вводили в 6^{-й} канал в вертикальном направлении для контроля любого смещения исходного сигнала. Стадии ассоциации и диссоциации для всех концентраций отслеживали в течение 3 минут и 30 (или 15) минут, соответственно, при скорости потока 100 мкл/мин. Связывающую поверхность регенерировали для следующего цикла взаимодействия с использованием 18 секундного импульса 0,8% фосфорной кислоты для удаления связанного антигена.

Необработанные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) сигналы между пятнами для коррекции неспецифических взаимодействий между антигеном и пустой поверхностью чипа; 2) сигналы пустого канала (где через чип пропускали только PBST) для коррекции неспецифического смещения исходного уровня.

ППР Biacore 8К

Связывание мкАт к TMEFF2 с ВКД TMEFF2 человека измеряли методом ППР Biacore 8 К. Формат анализа заключался в захвате мкАт с помощью поверхности Fc человека высокой плотности с последующей инъекцией титрования концентрации TMEFF2 человека с помощью метода кинетики одного цикла. Козьи антитела к Fc IgG человека (Jackson Immunoresearch, № по кат. 109-005-098) напрямую иммобилизовали посредством аминного связывания в концентрации 30 мкг/мл в 10 mM ацетатном буфере, pH 4,5, на проточных ячейках 1 и 2 на чипе датчика CM5 (GE) со скоростью потока 30 мкл/мин в буфере HBSP (GE). мкАт захватывали на поверхности антител к Fc IgG человека с концентрацией 0,5 мкг/мл (~ 200-300 OE) на проточной кювете 2. Затем рабочий буфер заменяли на HBSP+100 мкг/мл BSA. TMEFF2 ВКД с концентрацией 30 нМ в серии разведений в 3 раз вводили от низкой до высокой концентрации с использованием метода кинетики с одним циклом. Скорость диссоциации отслеживали через 30 минут после последнего введения или введения наибольшей концентрации, а затем поверхность регенерировали, используя 0,8% фосфорную кислоту (Bio-Rad). Также проводили холостой анализ буферного раствора, захватывая те же мкАт и используя те же условия анализа образца. Необработанные данные обрабатывали путем вычитания двух наборов эталонных данных из данных ответа: 1) эталонная проточная кювета 1 вычтена из проточной кюветы 2 и 2) с контрольным буфером из экспериментального прогона. Обработанные данные для всех концентраций для каждого мкАт в целом соответствовали простой модели связывания Ленгмюра 1:1 для получения оценок констант кинетики (k_{on} , k_{off}) и аффинности (KD).

Термостабильность антител к TMEFF2

TMEB675 продемонстрировало более низкий, чем обычный профиль термостабильности методом ДСК (дифференциальная сканирующая калориметрия) с началом разворачивания $T_m = 52^\circ\text{C}$ и первым тепловым переходом (T_{m1}) при $60,4^\circ\text{C}$. Более точное исследование последовательности TMEB675 (см. пример 4) показало наличие соматических гипермутаций (SHM) в каркасной области тяжелой и легкой цепей. Несколько реконструированных вариантов субклонировали, экспрессировали, очищали и профилировали методом ДСК. Полученные мкАт TMEB762 и TMEFB757 продемонстрировали желаемый профиль термостабильности ($T_{m1} = 69,4^\circ\text{C}$ и $T_{m1} = 69,7^\circ\text{C}$, соответственно). По сравнению с TMEB675, TMEB762 имело следующие аминокислотные модификации в тяжелой цепи: R14P, P20L и H81Q, тогда как TMEFB757 имело следующие аминокислотные модификации в тяжелой цепи: R14P и P20L. По сравнению с TMEB675, TMEB762 имело следующие аминокислотные модификации в

легкой цепи: A1D и A91P, тогда как TMEFB757 имело модификацию A91P в легкой цепи. Нумерация остатков соответствует схеме Кабат. Кинетические параметры связывания TMEB675, TMEB762 с ВКД TMEFF2 приведены в таблице 59.

7-4 Определение структурных характеристик антител к TMEFF2

Последовательности кДНК и трансляции аминокислот антител получали с использованием стандартных методик. После определения последовательности полипептидов некоторые кДНК антител, кодирующие переменные области или полноразмерные антитела, были оптимизированы по кодонам с помощью стандартных способов экспрессии в увеличенном количестве.

В таблице 60 приведены аминокислотные последовательности HCDR1 и HCDR2 выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 61 приведены последовательности HCDR3 выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 62 приведены аминокислотные последовательности LCDR1 и LCDR2 выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 63 приведены аминокислотные последовательности LCDR3 выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 64 приведены аминокислотные последовательности VH и VL выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 65 приведены SEQ ID NO: тяжелой и легкой цепей выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 66 приведены аминокислотные последовательности тяжелой цепи выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 67 приведены аминокислотные последовательности легких цепей выбранных антител к TMEFF2.

В таблице 68 приведены SEQ ID NO: полинуклеотидов, кодирующих различные цепи антитела к TMEFF2.

Таблица 60.

мкАт	Последовательность HCDR1	HCDR1, SEQ ID NO:	Последовательность HCDR2	HCDR2, SEQ ID NO:
TMEB675	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSV KG	584
TMEB570	SYYIS	583	GIIPISGRANYAQKFQ G	585
TMEB674	SYSMS	582	VISGGGSFTSYADSVK G	586
TMEB565	SYYIS	583	GIIPISGRANYAQKFQ G	585
TMEB762	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSV KG	584

ТМЕВ757	SYSMS	582	VISGSGGFTDYADSV KG	584
---------	-------	-----	-----------------------	-----

Таблица 61.

мкАт	Последовательность HCDR3	HCDR3, SEQ ID NO:
ТМЕВ675	MPLNSPHDY	587
ТМЕВ570	DGYSSGRSTTYAFDY	16
ТМЕВ674	MPLNSPHDC	17
ТМЕВ565	DGYSSGRSTTYAFDY	16
ТМЕВ762	MPLNSPHDY	587
ТМЕВ757	MPLNSPHDY	587

Таблица 62.

мкАт	Аминокислота LCDR1	LCDR1 SEQ ID NO:	Аминокислота LCDR2	LCDR2, SEQ ID NO:
ТМЕВ675	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
ТМЕВ570	RASQSVSTYYLA	19	GASYRAT	21
ТМЕВ674	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
ТМЕВ565	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
ТМЕВ762	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588
ТМЕВ757	RASQGIRNDLG	18	AASSLQS	588

Таблица 63.

мкАт	Аминокислота LCDR3	LCDR3, SEQ ID NO:
ТМЕВ675	LQDYNALYALT	22
ТМЕВ570	QQYGHSPIT	23
ТМЕВ674	LQDYNYSLT	24
ТМЕВ565	LQDYNALYALT	22
ТМЕВ762	LQDYNYPLT	603
ТМЕВ757	LQDYNYPLT	603

Таблица 64.

Антител о	Названи е VH	Аминокислотная последовательность VH	VH с SEQ ID NO:	Названи е VL	Аминокислотная последовательность VL	VL с SEQ ID NO:
ТМЕВ675	ТМЕH41 1	EVQLLES GGGL VQRGGSLRPSC AASGFT FESSYS MSWVRQAPGK GLEWVSVISGS GGFTDYADSVK GRFTISRDN SK NTLYLHMNSLR	25	ТМЕL12 7	AIQMTQSPSSL S ASVGDRVITIC RASQGIRNDLG WYQQKPGKAP KLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQ PEDFATYYCLQ	28

		AEDTAVYYCA RMPLNSPHDY WGQGTLVTVSS			DYNYALTFGG GTKVEIK	
TMEB5 70	TMEH39 6	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKVS CKASGGTFSSY YISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIS GRANYAQKFQ GRVTITADESTS TAYMELSSLRS EDTAVYYCAR DGYSSGRSTTY AFDYWGQGTL VTVSS	589	TMEL11 2	EIVLTQSPGTL LSPGERATLSC RASQSVSTYYL AWYQQKPGQA PRLLIYGASYR ATGIPDRFSGSG SGTDFLTISRL EPEDFAVYYCQ QYGHSPITFGQ GTKVEIK	29
TMEB6 74	TMEH41 0	EVQLLES GGGLVQPPG GSLRLSCA ASGFTFSS YSMSWVRQ APGKGLEW VSVISGG GSFTSYA DSVKGRFT ISRDN SNNTLYLQ MSSLR AEDTAFY YCAR MPLNSP HDCW GQGTLV TVSS	27	TMEL12 6	AIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITC RASQGIRNDLG WYQQKPGKAP KLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQ PEDFATYYCLQ DYNYSLTFGGG TKVEIR	30
TMEB5 65	TMEH39 6	QVQLVQSGAE VKKPGSSVKVS CKASGGTFSSY YISWVRQAPGQ GLEWMGGIIPIS GRANYAQKFQ GRVTITADESTS TAYMELSSLRS EDTAVYYCAR DGYSSGRSTTY AFDYWGQGTL VTVSS	589	TMEL11 1	EIVLTQSPGTL LSPGERATLSC RASQSVATYYL AWYQQKPGQA PRLLIYGASSRA TGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQ YGYNPITFGQG TKVEIK	31
TMEB7 62	TMEH45 9	EVQLLES GGGLVQPPG GSLRLSCA ASGFTFSS YSMSWVRQ APGKGLEW VSVISGS GGFTDYA DSVKGRFT ISRDN SKNTLYLQ MNSLR AEDTAVY YCA RMPLNSP HDY WGQGTLV TVSS	604	DL3L12 9	DIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITC RASQGIRNDLG WYQQKPGKAP KLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQ PEDFATYYCLQ DYNYSLTFGGG TKVEIK	607
TMEB7	TMEH46	EVQLLES GGGL	612	B76L85	AIQMTQSPSSLS	613

57	0	VQPGGSLRLSC AASGFTFSSYS MSWVRQAPGK GLEWVSVISGS GGFTDYADSVK GRFTISRDNK NTLYLHMNSLR AEDTAVYYCA RMPLNSPHDY WGQGTLVTVSS			ASVGDRVITIC RASQGIRNDLG WYQQKPGKAP KLLIYAASSLQS GVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQ PEDFATYYCLQ DYNYPPLTFGGG TKVEIK	
----	---	--	--	--	---	--

Таблица 65.

Антитело	Название VH	Название VL	Белок HC, SEQ ID NO:	Белок LC, SEQ ID NO:
ТМЕВ675	ТМЕН411	ТМЕЛ127	32	35
ТМЕВ570	ТМЕН396	ТМЕЛ112	33	36
ТМЕВ674	ТМЕН410	ТМЕЛ126	34	37
ТМЕВ565	ТМЕН396	ТМЕЛ111	33	38
ТМЕВ762	ТМЕН459	DL3L129	614	615
ТМЕВ757	ТМЕН460	B76L85	616	617

Таблица 66.

Белок HC, SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность HC
32 (HC ТМЕВ675)	evqllesggglvqrggslrpscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgggftdyadsvkgrftisr dnskntlylhmnslraedtavyycarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgktytencvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpetcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkgplssiectiskakgqprepvytlppsqqe mtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpplvdsdgsfflysrlltdksrwqegnfvfscsv mhealthnhytqkslslslgk
33 (HC ТМЕВ570, ТМЕВ565)	qvqlvqsgaevkkgpssvksckasggtfssyyiswvrqapgqglewmggiipisgranyaqkfqgrvt itadeststaymelsslrsedtavyycardgyssgrsttyafdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrste staalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgktytencvdhkpsntk vdkrveskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpetcvvvdvsqedpevqfnwyvdg vevhnaktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkgplssiectiskakgqprepvytlp psqeemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpplvdsdgsfflysrlltdksrwqegn fvfscsvmhealthnhytqkslslslgk
34 (HC ТМЕВ674)	evqllesggglvqppgslrslscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgggsftsyadsvkgrftis rdnsntlylqmsslraedtafyycarmplnsphdcwgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgktytencvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpetcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkgplssiectiskakgqprepvytlppsqqe mtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennyktpplvdsdgsfflysrlltdksrwqegnfvfscsv mhealthnhytqkslslslgk
614 (HC ТМЕВ762)	evqllesggglvqppgslrslscaasgftfssysmswvrqapgkglewvsvvisgggftdyadsvkgrftisr dnskntlylqmsslraedtavyycarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvfplapcsrstsestaalg clvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtvpssslgktytencvdhkpsntkvdkrv

	eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkgpssiiektiskakgqprepvytlppsquee mtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysrlltvdksrwqegnvfscsv mhealthnhytqkslslslgk
616 (HC TMEB757)	evqllesggglvqpggsrlscaasgftfssysmswvrqapkgglewvsvisgsggftdyadsvkgrftisr dnskntlylhmnslraedtavyyecarmplnsphdywgqgtlvtvssastkgpsvflapcsrstsestaalg clvkdyfepvptvswngaltsgvhtfpavlqssgylssovvtvpssslgtkytcnvdhkpsntkvdkrv eskygppcpcpapeaaggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvsqedpevqfnwyvdgvevhn aktkpreeqfnstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkgpssiiektiskakgqprepvytlppsquee mtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdsfflysrlltvdksrwqegnvfscsv mhealthnhytqkslslslgk

Таблица 67.

SEQ ID NO: белка LC	Аминокислотная последовательность LC
35 (LC TMEB675)	aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyyclqdynyaltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslstltskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec
36 (LC TMEB570)	eivltqspgtlslsperatlscrasqsvstyylawyqqkpgqaprlliygasyratgipdrfsgsgsgtdftltisr lepedfavyyccqyghspitfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw vdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslstltskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec
37 (LC TMEB674)	aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyyclqdynyltfgggtkveirrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslstltskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec
38 (LC TMEB565)	eivltqspgtlslsperatlscrasqsvatyylawyqqkpgqaprlliygassratgipdrfsgsgsgtdftltisr lepedfavyyccqygnpitfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw vdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslstltskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec
615 (LC TMEB762)	diqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyyclqdynypltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslstltskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec
617 (LC TMEB757)	aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsgtdftlti sslqpedfatyyclqdynypltfgggtkveikrtvaapsvfifppsdeqlksgtasvcllnnfypreakvqw kvdnalqsgnsqesvteqsdskdstyslstltskadyekkhkyacevthqglsspvtksfnrgec

Таблица 68.

Антитело	κДНК VH с SEQ ID NO:	κДНК VL с SEQ ID NO:	κДНК HC с SEQ ID NO:	κДНК LC с SEQ ID NO:
TMEB675	39	42	46	49
TMEB570	40	43	47	50
TMEB674	41	44	48	51
TMEB565	40	45	47	590
TMEB762	618	619	620	621
TMEB757	622	623	624	625

SEQ ID NO: 39 (κДНК VH TMEB675)

Gaggtgcagctgctggaagcggcggaggcctggtgcagagaggaggaagcctgagaccagctgtgccgccagcggctt

caccttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagggcccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgattagcggcagcggcgcc
 ttcaccgattacgccgacagcgtgaagggcaggttcaccatcagcagggacaatagcaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctg
 agggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaacctggtgaccg
 tgtccagc

SEQ ID NO: 40 (κДHK VH TMEB570, TMEB565)

Caggtgcagctggtgcagagcggcgccgaagtgaaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaagcagcggcg
 gcaccttcagctcctattacattagctgggtgcgccaggcggccggccagggtcctggaatggatgggtggcattatcccaatcagtggcg
 tgctaattatgcgcagaaatttcagggccgctgaccattaccgctgatgaaagcaccagcaccgcgtatggaactgagcagcctgcgc
 agcgaagataaccgcggtgtattatgcgcgcgcgacggctacagtagtgagcgtagcacaacatagcatttgactattggggccagggc
 acctggtgaccgtgagcgt

SEQ ID NO: 41 (κДHK VH TMEB674)

Gaagtgcagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctcctggcggaagcctgagactgagctgcgccgctagcgg
 cttcaccttcagcagctacagcatgagctgggtgagacaggtcctggcaagggcctggagtgggtgagcgtgatcagcggcggaggca
 gctttaccagctacgccgacagcgtgaagggcaggttcaccatcagcagggacaacagcaacaacacctgtacctgcagatgagcagc
 ctgagggccgaggacaccgcttctactactgcgccaggatgccctgaacagcccccactgactgctggggacagggcacctggtgac
 cgtgagcagc

SEQ ID NO: 42 (κДHK VL TMEB675)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtagcgtggggcgacagggtgaccatcacctgcagggccagcca
 gggcatcagaaacgacctgggctgtaccagcagaagcccggcaagcccccaagctgctgatctacgccccagcagcctgcagag
 cggagtgcctagcaggttcagcgggaagcggcagcggcaccgacttcacctgaccatcagcagcctgcagcccaggacttcgccacct
 actactgectgcaggactacaactacgacctgacattcggcggcggcaccaaggtggagatcaag

SEQ ID NO: 43 (κДHK VL TMEB570)

Gaaattgtgtgaccagagcccgggcacctgagcctgagcccggggcgaacgcgcgacctgagctgccgcgcgagcca
 gagcgtttccacatactacctggcgtgtatcagcagaaaccgggccagggccgcgcctgctgatttacggtgectcctatcgcgcgacc
 ggcatccggatcgcttttagcggcagcggttccggcaccgattttacctgaccattagccgctggaaccggaagattttgcggtgtattatt
 gccagcagtagcgtcacagcccgattactttggccagggcaccaaaagtggaaatcaaa

SEQ ID NO: 44 (κДHK VL TMEB674)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtagcgtggggcgacagggtgaccatcacctgcagggccagcca
 gggcatcaggaacgacctgggctgtaccagcagaagcccggcaagcccccaagctgctgatctacgccccagcagcctgcagag
 cggagtgcctagcaggttcagcggcagcgggaagcggcaccgacttcacctgaccatctccagcctgcagcccaggacttcgccacct
 actactgectgcaggactacaactacgacctgaccttcggcggcggcaccaaggtggagatcagg

SEQ ID NO: 45 (κДHK VL TMEB565)

Gaaattgtgtgaccagagcccgggcacctgagcctgagcccggggcgaacgcgcgacctgagctgccgcgcgagcca
 gagcgtttccacctattatcttgcgtgtgtatcagcagaaaccgggccagggccgcgcctgctgatttacggtgcatcctcccgtgcgacc
 ggcatccggatcgcttttagcggcagcggttccggcaccgattttacctgaccattagccgctggaaccggaagattttgcggtgtattatt
 gccagcagtagcgtataaccaattactttggccagggcaccaaaagtggaaatcaaa

SEQ ID NO: 46 (κДHK HC TMEB675)

gaggtgcagctgctgaaagcggcggaggcctggtgcagagaggaggaagcctgagaccagctgtgccgccagcggctt
 caccttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagggcccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgattagcggcagcggcgcc
 ttcaccgattacgccgacagcgtgaagggcaggttcaccatcagcagggacaatagcaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctg

agggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaacctggtgaccg
 tgtccagcgttccaccaagggcccacccgttccccctggcgcctgtccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgcc
 tggtaaggactactccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtcctac
 agtctcaggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatcaca
 gcccagcaaccaaggtggacaagagagttgagtcctaatatggtccccatgccaccatgccagcacctgaggccgccgggga
 ccatcagtcttctgttcccccaaaaaccaaggacacttcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagcca
 ggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagttcaac
 agcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgaaggttccaacaagg
 cctcccgctctccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggagg
 agatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctgggtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcag
 ccggagaacaactacaagaccacgctcccgctgctggactccgacggctcttcttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagg
 tggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaaagagcctctcctgtctctggtaa
 a

SEQ ID NO: 47 (кДНК HC TMEB570, TMEB565)

cagggtcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtgagctgcaaaagcagcggcg
 gcacctcagctctattacattagctgggtgcgccagcgcggggccaggcctggaatggatgggtggcattatcccaatcagtggcg
 tgctaattatgcccagaaatttcaggggccgctgaccattaccgctgatgaaagcaccagcaccgctatggaactgagcagcctgcgc
 agcgaagataaccgcggtgtattatgcccgcgcgacggctacagtagtgacgtagcacaacatagcatttgactatggggccagggc
 acctggtgaccgtgctgagtgcttccaagggcccacccgttccccctggcgcctgtccaggagcacctccgagagcacagcc
 gccctgggctgectggtcaaggactactccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctc
 ccggtgtctacagctcctcaggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgca
 acgtagatcacaagcccagcaaccaaggtggacaagagagttgagtcctaatatggtccccatgccaccatgccagcacctgag
 gccgccgggggaccatcagtcttctgttcccccaaaaaccaaggacacttcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtgg
 tggacgtgagccaggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcggga
 ggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgaagg
 tctccaacaaggcctcccgctctccatcgagaaaacctctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccc
 ccatcccaggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctgggtcaaaaggcttctaccccagcgacatcgccgtggagtggga
 gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgctcccgctgctggactccgacggctcttcttctctacagcaggctaaccgt
 ggacaagagcagggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaaagagcctctc
 cctgtctctgggtaaa

SEQ ID NO: 48 (кДНК HC TMEB674)

gaagtgcagctgctggagagcggaggaggactggtgcagcctcctggcgggaagcctgagactgagctgcgccgctagcgg
 ctctaccttcagcagctacagatgagctgggtgagacaggctctggcaagggcctggagtgggtgagcgtgatcagcggcggaggca
 gctttaccagctaccccagcagcgtgaagggcagggtccatcagcagggaacaacagcaacaacacctgtacctgcagatgagcagc
 ctgagggccgaggacaccgcttctactactgccaggtatgccctgaacagccccatgactgctggggacaggggcacctggtgac
 cgtgagcagcgttccaccaagggcccacccgttccccctggcgcctgtccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggct
 gccctggtcaaggactactccccgaaccgggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtcc
 tacagtctcaggacttactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacgaaaacctacacctgcaacgtagatca
 caagcccagcaaccaaggtggacaagagagttgagtcctaatatggtccccatgccaccatgccagcacctgaggccgccggg
 ggaccatcagtcttctgttcccccaaaaaccaaggacacttcatgatctcccggaccctgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtga

gccaggaagaccccagggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtt
 caacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtcaagggtctccaaca
 aggcctcccgtcctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccagg
 aggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgctggtcaaaggtcttacctccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg
 cagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctacagcaggctaacctggacaagagc
 aggtggcaggaggggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctcccgtctctggg
 taaa

SEQ ID NO: 49 (κДHK LC TMEB675)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgttagcgtgggcgacagggtgacctcacctgcagggccagcca
 gggcatcagaaacgacctgggctgtaccagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccccagcagcctgcagag
 cggagtgcctagcaggttcagcgggaagcggcagcggcaccgacttcacctgacctcagcagcctgcagccccaggacttcgccacct
 actactgectgcaggactacaactacgcctgacatcggcggcggcaccaaggtggagatcaagcgtacgggtgctgcacctctgtctt
 catctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 tggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagca
 gcacctgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcgcccgtcaca
 aagagcttcaacaggggagagtgt

SEQ ID NO: 50 (κДHK LC TMEB570)

Gaaattgtctgaccagagccccggcaccctgagcctgagccccggcgaacgcgcgaccctgagctgccgcgcgagccagag
 cgtttccatactacctggcgtggatcagcagaaaccgggccaggcgcgcgacctgctgattfacgggtcctctatcgcgcgaccggcattc
 cggatcgctttagcggcagcgggtccggcaccgattttacctgaccttagccgctggaaccggaagattttgcggtgtattattgccagcagta
 cggtcacagccccgattactttggccagggcaccaaaagtggaatcaaacgtacgggtggctgcacctctgtcttcatctcccgccatctgatgag
 cagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaat
 cgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgtgagcaaagcagacta
 cgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgt

SEQ ID NO: 51 (κДHK LC TMEB674)

Gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgttagcgtgggcgacagggtgacctcacctgcagggccagcca
 gggcatcaggaacgacctgggctgtaccagcagaagccccggcaaggcccccaagctgctgatctacgccccagcagcctgcagag
 cggagtgcctagcaggttcagcggcagcgggaagcggcaccgacttcacctgacctctccagcctgcagccccaggacttcgccacct
 actactgectgcaggactacaactacagcctgacctcggcggcggcaccaaggtggagatcaggcgtacgggtgctgcacctctgtctt
 catctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacag
 tggagggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagca
 gcacctgacgtgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacctcagggcctgagctcgcccgtcaca
 aagagcttcaacaggggagagtgt

SEQ ID NO: 590 (κДHK LC TMEB565)

Gaaattgtctgaccagagccccggcaccctgagcctgagccccggcgaacgcgcgaccctgagctgccgcgcgagccag
 agcgttggccacctattatcttgcgtggatcagcagaaaccgggccaggcgcgcgacctgctgattfacgggtgcatcctcccgtgcgaccggc
 attccggatcgctttagcggcagcgggtccggcaccgattttacctgaccttagccgctggaaccggaagattttgcggtgtattattgccag
 cagtacggctataaccaattactttggccagggcaccaaaagtggaatcaaacgtacgggtggctgcacctctgtcttcatctcccgccatc
 tgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacg
 cctccaatcgggtaactcccaggagagtgacacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcacctgacgtgagca

aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcctgcacaaagagcttcaacaggggag
agtgt

SEQ ID NO: 618 (κДHK VH TMEB762)

gaggtgcagctgctggaaagcggcggaggcctggtgcagcccggaggaagcctgagactcagctgtgccgccagcggcttc
accttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagggcccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgattagcggcagcggcggctt
caccgattacgccgacagcgtgaagggcaggttcacatcagcagggacaatagcaagaacacctgtacctgcagatgaacagcctga
gggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaaccctggtgacct
gtccagc

SEQ ID NO: 619 (κДHK VL TMEB762)

gacatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtagcgtgggcgacaggggtgacatcacctgcagggccagccag
ggcatcagaaacgacctgggctggtaccagcagaagcccggcaagggccccaagctgctgatctacgccgccagcagcctgcagagc
ggagtgcctagcaggttcagcggaaagcggcagcggcaccgacttcacctgacatcagcagcctgcagcccaggacttcgccaccta
ctactgctgcaggactacaactacccccgacattcggcggcggcaccgaaggtggagatcaag

SEQ ID NO: 620 (κДHK HC TMEB762)

gaggtgcagctgctggaaagcggcggaggcctggtgcagcccggaggaagcctgagactcagctgtgccgccagcggcttc
accttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcagggcccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgattagcggcagcggcggctt
caccgattacgccgacagcgtgaagggcaggttcacatcagcagggacaatagcaagaacacctgtacctgcagatgaacagcctga
gggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaaccctggtgacct
gtccagcgttcccaaggcccatccgtcttccccctggcgcctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgct
ggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctggaactcagcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtctaca
gtctcaggacttactcctcagcagcgtggtgacctgcccctcagcagcttgggcacgaaaacctacacttgcaactagatcacaag
cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaatggtccccatgccaccatgccagcactgaggccgccgggggac
catcagttctctgttcccccaaaaacccaaggacactcctatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctggtggtgagcgtgagccag
gaagaccccaggtccagttcaactggtacgtggtgaggtgcataatgccaagacaaagccgcccggaggagcagttcaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggc
ctcccgtctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggagga
gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggtcttaccaccagcagatcgcctggagtgaggagcaatgggcagc
cggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaggctaacctggacaagagcagat
ggcaggaggggaaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaagagcctctccctgtctctgggtaaa

SEQ ID NO: 621 (κДHK LC TMEB762)

gacatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgtagcgtgggcgacaggggtgacatcacctgcagggccagccag
ggcatcagaaacgacctgggctggtaccagcagaagcccggcaagggccccaagctgctgatctacgccgccagcagcctgcagagc
ggagtgcctagcaggttcagcggaaagcggcagcggcaccgacttcacctgacatcagcagcctgcagcccaggacttcgccaccta
ctactgctgcaggactacaactacccccgacattcggcggcggcaccgaaggtggagatcaagcgtacggtggtgcaccatctgtctt
atctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagt
ggaaggtggataacgcccctcaatcgggtaactcccaggagaggtgcacagagcaggacagcaaggacagcactacagcctcagcag
caccctgacgtgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcctgcacaa
agagcttcaacaggggagagtgtag

SEQ ID NO: 622 (κДHK VH TMEB757)

gaggtgcagctgctggaaagcggcggaggcctggtgcagcccggaggaagcctgagactcagctgtgccgccagcggcttc

accttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcaggccccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgatttagcggcagcggcgctt
caccgattacgccgacagcgtgaagggcaggtcaccatcagcagggacaatagcaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctga
gggcccaggacaccgccgtgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaacctggtgacct
gtccagc

SEQ ID NO: 623 (кДНК VL TMEB757)

gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgttagcgtgggcgacaggggtgaccatcacctgcagggccagccag
ggcatcagaaacgacctgggctggtaccagcagaagccccggcaagcccccaagctgctgatctacgccgccagcagcctgcagagc
ggagtgcctagcaggttcagcgggaagcggcagcggcaccgactcaccctgaccatcagcagcctgcagccccaggacttcgccaccta
ctactgctgcaggactacaactacccccgacattcggcggcggcaccgaaggtggagatcaag

SEQ ID NO: 624 (кДНК HC TMEB757)

gaggtgcagctgctggaaagcggcggaggcctggtgcagccccggaggaagcctgagactcagctgtgccgccagcggcttc
accttcagcagctacagcatgagctgggtcaggcaggccccctggcaaaggactggagtgggtgagcgtgatttagcggcagcggcgctt
caccgattacgccgacagcgtgaagggcaggtcaccatcagcagggacaatagcaagaacacctgtacctgcacatgaacagcctga
gggcccaggacaccgccgtgtactactgcgccaggatgccctgaacagccctcacgactactggggccagggaacctggtgacct
gtccagcgttccccaaggccccatccgtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagccgccctgggctgct
ggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgctggtggaactcagcgccctgaccagcggcgtgcacacctccccgctgtctaca
gtctcaggactctactcctcagcagcgtggtgacctgccccccagcagcttgggcacgaaaacctacacttgcaactgatgatacaag
cccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagtcacaatggtccccatgccaccatgccagcactgagccgccgggggac
catcagttctctgttcccccaaaaaccaaggacactctatgatctcccgaccctgaggtcacgtgctggtggtgacgtgagccag
gaagccccgaggtccagttcaactggtacgtggtggtgaggtgcataatgccaagacaaagccggggaggagcagttcaaca
gcacgtaccgtgtggtcagcgtctcaccgtctgcaccaggactggtgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagc
ctcccgtctccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgccccatcccaggagga
gatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaagcttctaccccagcagatcgccgtggagtggagagcaatgggcagc
cggagaacaactacaagaccacgctcccgtgctggactccgacggctccttctctacagcaggctaaccgtggacaagagcagat
ggcaggaggggaaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacagaagagcctctcctgtcttggtaaa

SEQ ID NO: 625 (кДНК LC TMEB757)

gccatccagatgaccagagccctagcagcctgagcgttagcgtgggcgacaggggtgaccatcacctgcagggccagccag
ggcatcagaaacgacctgggctggtaccagcagaagccccggcaagcccccaagctgctgatctacgccgccagcagcctgcagagc
ggagtgcctagcaggttcagcgggaagcggcagcggcaccgactcaccctgaccatcagcagcctgcagccccaggacttcgccaccta
ctactgctgcaggactacaactacccccgacattcggcggcggcaccgaaggtggagatcaagcgtacggtggtgcaccatctgtctt
atctcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataactctatcccagagagggccaaagtacgt
ggaaggtggataacgcccccaatcgggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcag
caccctgacgctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgctgcgaagtccccatcagggcctgagctcggcctcaca
agagcttcaacaggggagagtgtag

Каркасы выбранных антител к TMEFF2 приведены в **таблице 69**.

Таблица 69.

Антитело	Каркас VH	Каркас VH, SEQ ID NO:	Каркас VL	Каркас VL, SEQ ID NO:
TMEB675	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB570	VH1_1-69	54	VKIII_A27	591

TMEB674	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB565	VH1_1-69	54	VKI_L11	55
TMEB762	VH3_3-23	53	VKI_L11	55
TMEB757	VH3_3-23	53	VKI_L11	55

SEQ ID NO: 53 (каркас VH3_3-23)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWGQGLTQVTVSS

SEQ ID NO: 54 (каркас VH1_1-69)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSCKASGGTFS SYAIS WVRQAPGQGLEWMG
GPIIFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR

SEQ ID NO: 55 (каркас VKI_L11)

aiqmtqspsslsasvgrvtitcrasqgirndlgwyqqkpgkapklliyaasslqsgvpsrfsqsgsg
tdftltisslqpedfatyyc lqdynyp

SEQ ID NO: 591 (каркас VKIII_A27)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY
GASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

7-5 Картирование эпитопов антител к TMEFF2

Картирование эпитопов TMEB570 и TMEB675 проводили с H/D обменом. TMEW1 (**SEQ ID NO: 578**) в этих анализах использовали в качестве источника TMEFF2.

10 мкг TMEW1 в 130 мкл контрольного буфера (50 mM фосфата, 100 mM натрия хлорида при pH 7,4) денатурировали путем добавления 130 мкл 4 M гуанидин гидрохлорида, 0,85 M буфера TCEP (конечный pH составлял 2,5) и инкубации смеси в течение 3 мин при 10 °C. Затем смесь подвергали расщеплению пепсином/протеазой XIII на колонке, используя колонку пепсин/протеаза XIII собственной упаковки (мас./мас., 1:1) (2,1 × 30 мм). Полученные пептиды анализировали с помощью системы СВЭЖХ-МС, состоящей из СВЭЖХ Waters Acquity, соединенной с масс-спектрометром Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo). Пептиды разделяли на колонке C8 размером 50×1 мм с градиентом 16,5 мин от 2-34% растворителя В (0,2% муравьиной кислоты в ацетонитриле). Растворитель А представлял собой 0,2% муравьиную кислоту в воде. Клапан инжектора и колонка пепсина/протеазы XIII и их соответствующие соединительные трубки располагаются внутри охлаждаемого корпуса, где поддерживается температура 10 °C. Второй переключающий клапан, колонка C8, и их соответствующие соединительные трубки из нержавеющей стали находятся внутри другого охлаждаемого корпуса с циркуляцией, где поддерживается температура -6 °C. Идентификацию пептида осуществляют путем поиска данных МС/МС в сравнении с последовательностью TMEW1 с использованием программы Mascot. Допуск по массе для ионов предшественника и продукта составлял 7 ч./млн и 0,02 Да, соответственно.

10 мкл TMEW1 (5 мкг) или 10 мкл TMEW1 и TMEB570, или смеси TMEB675 (5 мкг: 15 мкг) инкубировали с 120 мкл буферного раствора для мечения оксидом дейтерия

(50 мМ натрий фосфата, 100 мМ натрий хлорида при pH 7,4) в течение 0 с, 30 с, 360 с, 3600 с или 14400 с при 10 °С. Водород-дейтериевый обмен (H/D) в каждый момент времени проводили в двух повторностях. Водород-дейтериевый обмен останавливали добавлением 130 мкл 4 М гуанидингидрохлорида, 0,85 М буфера TCEP (конечный pH составлял 2,5). Затем образцы после остановки обмена наносили на колонку расщепления с пепсином/протеазой XIII и анализировали с помощью ЖХ-МС, как описано выше. Масс-спектры регистрировали только в режиме МС.

Исходные данные МС обрабатывают с помощью программного обеспечения HDX WorkBench, предназначенного для анализа данных МС H/D обмена (Pascal et al., J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521). Уровни дейтерия вычисляют с помощью средней разности масс между дейтерированным пептидом и его нативной формой (t0). Около 97-99% белка можно было картировать относительно конкретных пептидов. Кривые накопления дейтерия показали значительную разницу в наклоне за время обмена для пептидов.

Эпитоп TMEB570: TMEW1 продемонстрировал умеренное снижение поглощения дейтерия по остаткам 235-249 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 575), например, остатки HGKCEHSINMQEPSC (**SEQ ID NO: 592**) в мембранной проксимальной области была защищены от H/D обмена при связывании с TMEB570.

Эпитоп TMEB675: TMEW1 продемонстрировал умеренное снижение поглощения дейтерия по остаткам 252-268 (нумерация остатков соответствует SEQ ID NO: 575), например, остатки DAGYTGQHCCKDYSVL (**SEQ ID NO: 600**) в мембранной проксимальной области были защищены от H/D обмена при связывании с TMEB675.

Таким образом, эпитопные остатки TMEB570 TMEFF2 охвачены HGKCEHSINMQEPSC (**SEQ ID NO: 592**), а эпитопные остатки TMEB675 охвачены DAGYTGQHCCKDYSVL (**SEQ ID NO: 600**). Оба антитела связывались с TMEFF2 в мембранной проксимальной области.

7-6 Создание биспецифических антител к TMEFF2xCD3

Выбранные моноспецифические антитела к TMEFF2 и CD3 (см. примеры 1-7) экспрессировали как IgG4/к. Замены F405L и R409K (нумерация ЕС) были внесены в антитела к CD3, в то время как антитела к TMEFF2 имели IgG4 дикого типа. В дополнение к заменам в положениях 405 и 409 были сконструированы мкАт IgG4 с заменой S228P, F234A и L235A.

Моноспецифические антитела экспрессировали и очищали с помощью стандартных способов, применяя колонку Protein A (колонку HiTrap MabSelect SuRe). После элюирования пулы диализировали в D-PBS, pH 7,2.

Биспецифические антитела TMEFF2xCD3 создавали, комбинируя моноспецифическое мкАт к TMEFF2 и моноспецифическое мкАт к CD3 при обмене Fab-плечами *in vitro*, как описано в международной патентной публикации № WO2011/131746. Вкратце, около 1-20 мг/мл каждого антитела в молярном соотношении 1 : 1 в PBS, pH 7-7,4, и 75 мМ 2-меркаптоэтанолamina (2-MEA) смешивали вместе и инкубировали при 25-

37 °С в течение 2-6 ч, после чего удаляли 2-МЕА посредством диализа, диафильтрации, тангенциальной поточной фильтрации и/или фильтрации в вихревой ячейке с применением стандартных способов.

Биспецифические антитела после обмена Fab-плечами *in vitro* дополнительно очищали стандартными способами, применяя гидрофобную хроматографию, чтобы свести к минимуму остаточное содержание исходных антител к TMEFF2 и CD3.

В **таблице 73** и **таблице 74** показаны полученные биспецифические антитела.

Таблица 73.

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к TMEFF2/плечо к CD3)	HCD R1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
ТМСВ132	ТМЕВ675	582	584	587	18	588	22
	CD3В376	662	663	664	671	673	690
ТМСВ131	ТМЕВ570	583	585	16	19	21	23
	CD3В376	662	663	664	671	673	690
ТМСВ150	ТМЕВ762	582	584	587	18	588	603
	CD3В376	662	663	664	671	673	690

Таблица 74.

Биспецифическое антитело	Исходное (плечо к TMEFF2/плечо к CD3)	VH	VL	HC	LC
ТМСВ132	ТМЕВ675	25	28	32	35
	CD3В376	652	661	640	676
ТМСВ131	ТМЕВ570	589	29	33	36
	CD3В376	652	661	640	676
ТМСВ150	ТМЕВ762	604	607	614	615
	CD3В376	652	661	640	676

7-7 Определение характеристик биспецифических антител к TMEFF2 × CD3

Анализ чистоты методом аналитического ультрацентрифугирования (AUC)

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC) позволяет определить размер, форму, состояние агрегации и обратимое взаимодействие макромолекул в растворе. Скорость осаждения (SV) представляет собой методику AUC, позволяющую перевести градиент концентрации макромолекулы к внешнему радиусу держателя образца (клетки) при вращении центрифуги. Это позволяет определять коэффициент осаждения, который является фактором размера и формы молекулы, а также является уникальным для каждой молекулы. Для этой цели использовали прибор Beckman Optima AUC. Образцы загружали в ячейки центрифуги, оснащенные сердцевинами Beckman 1,2 см (с номинальным интервалом 50 тыс. об/мин) и кварцевыми окошками. Клетки собирали и вращали до 130 фунтов. Клетки центрифуги помещали в ротор An-50 (отверстие 8) или An-60 (отверстие 4)

и помещали в камеру AUC. Перед началом пробега температуру AUC уравнивали до 20,5°C в течение по меньшей мере одного часа с помощью ротора в камере. Анализ проводили при 40 тыс. об/мин для образца мкАт со счетчиком сканирований (250 сканирований), частотой сбора данных (90 секунд), разрешением данных (10 мкМ), длиной волны 280 нМ. Данные анализировали с помощью программного обеспечения для прямого подбора границ SEDANAL. Измеряли чистоту биспецифического антитела ТМСВ150 и его исходных мкАт. ТМСВ150 продемонстрировало наличие 97,1% мономера, 2,8% димерного мономера и отсутствие агрегации, что установлено по AUC, удовлетворяющей приемлемым критериям для временно экспрессируемого исследуемого материала для дополнительной биофизической характеристики. ТМЕВ762 продемонстрировало содержание мономера 95,5%, димера 4,5% и отсутствие агрегации, тогда как CD3В376 продемонстрировало содержание мономера 97,7% и димера 2,2% без агрегации. Уровни агрегатов, составляющие >5% минимальной двухстадийной очищенной молекулы, могут оказывать значительное влияние на биологическую активность, растворимость, стабильность и срок хранения.

Конформационная стабильность биспецифических антител к ТМЕFF2/CD3 по результатам ДСК

Тепловое разворачивание ТМСВ150 определяли с помощью ДСК (дифференциальной сканирующей калориметрии), показывающей начало разворачивания $T_m = 52,6$ °C, первый тепловой переход (T_{m1}) при 61,8 °C, второй тепловой переход (T_{m2}) при 67,6°C и третий тепловой переход (T_{m3}) при 75,5 °C. На основании профиля теплового перехода в исходное антитело (антитело к ТМЕFF2, ТМЕВ762 и антитело к CD3, CD3В376), который оценивается с помощью ДСК до, T_{m1} в ТМСВ150 соответствует разворачиванию FАВ CD3В376, а T_{m3} в ТМСВ150 соответствует переходам разворачивания Fab ТМЕВ762.

Стабильность в сыворотке

Разрабатывается анализ стабильности в сыворотке для оценки свойств лидерных кандидатов на неспецифическое или нецелевое связывание с компонентами сыворотки человека. Это может спрогнозировать плохие фармакокинетические свойства и свойства биораспределения. Связывание и стабильность ТМСВ150 оценивают как в буфере, так и в человеческой сыворотке с использованием способа флуоресцентной хроматографии. Биспецифическое антитело метили конъюгатом Alexa Fluor 488 (Invitrogen kit в соответствии с инструкциями производителя), инкубировали в буфере Нерес и человеческой сыворотке (Sigma, кат. № Н4522) при 4°C и 37°C в течение 2 дней, а затем анализировали посредством эксклюзионной ВЭЖХ с использованием системы для ВЭЖХ Agilent, оснащенной флуоресцентным детектором. Процент агрегатов рассчитывают по суммарной площади под кривой каждого пика. ТМСВ150 продемонстрировало агрегацию 2,4% в буфере Нерес в нулевой момент времени и агрегацию 2,0% и 1,3% через двое суток при 4 °C и 37 °C, соответственно. В человеческой сыворотке ТМСВ150 продемонстрировало агрегацию 1,7% в нулевой момент времени и агрегацию 1,1% через двое суток при 4 ° и 37 ° Цельсия.

Неспецифическое связывание

Неспецифическое связывание лидерной молекулы с неродственными поверхностями определяется с помощью биосенсорной технологии (Biacore 8 K). Антитело пропускают через поверхности ППР, покрытые неродственными белками. Если антитело проявляет существенное связывание с данными нерелевантными поверхностями, предполагается, что оно будет иметь слабые свойства *in vivo* и вызывать проблемы при производстве. Лидерная молекула тестируется в конечной концентрации 1 мкМ. К нерелевантным поверхностям относятся отрицательно заряженный белок (ингибитор соевого трипсина), положительно заряженный белок (лизоцим и β -дефензин), гидрофобный (Rh-интегрин $\alpha 4\beta 7$), человеческий IgG, липкий белок (Rh-CD19). В данном эксперименте использовали надлежащие контроли. Лидерная молекула течет по двум поверхностям: одна является немодифицированной, а другая имеет непосредственно иммобилизованную молекулу. Уровень единицы ответа (RU) определяют путем вычитания RU немодифицированной поверхности из RU исследуемой поверхности. RU TMCB150 и исходных мкАт приведены ниже в таблице. Единица ответа ≥ 100 прогнозирует высокий риск неспецифического связывания с заряженными/гидрофобными поверхностями/поверхностями IgG, которые могут создавать проблемы при производстве и преобразовывать в плохие ФК свойства. Ни одно из антител не демонстрирует неспецифического связывания с нерелевантными поверхностями, прогнозирующими низкий риск производства и *in vivo*.

Таблица 75.

	STI	В-дефензин-3	IgG человека	Лизоцим	rh-интегрин $\alpha 4\beta 7$	rh-CD19
TMCB150	1,6	6,4	7,5	4,2	0	3,4
TMEB762	0	4,1	8,4	4,6	0	3,3
CD3B376	19,5	3,1	0,4	0,2	0	0

Стабильность при высокой концентрации

Многие моноклональные антитела готовят в высокой концентрации (≥ 100 мг/мл) для уменьшения объема инъекции для облегчения подкожного введения. Кроме того, во время процесса очистки все моноклональные антитела подвергают воздействию временно высоких концентраций (≥ 50 мг/мл). Следовательно, стабильность при высокой концентрации является критическим свойством качества этих молекул. Концентрирование проводят с использованием центрифужных ультрафильтрационных аппаратах с мембранами MWCO 30 кДа. От 5,1 до 5,3 мг каждого белка сначала разводили до той же исходной концентрации и центрифугировали при 4000xg с 15-минутными интервалами. В конце каждой стадии центрифугирования в течение 15 минут концентраторы извлекают из центрифуги и регистрируют визуальную оценку оставшегося объема образца.

Концентрацию измеряют с помощью прибора SoloVPE. Концентрированные образцы инкубировали при 4°C и 40°C в течение 2 недель, отбирали аликвоты с временными интервалами для проверки целостности с помощью аналитической SEC. ТМСВ150 и исходные мкАт (CD3В376 и ТМЕВ762) концентрировались нормально. Конечная концентрация ТМСВ150 составляла 99,4 мг/мл, а конечная концентрация исходных мкАт составляла 52,2 мг/мл (ТМЕВ762) и 52,6 мг/мл (CD3В376). Концентрация оставалась одинаковой в течение 2 недель при 4°C и 40 °С, что указывает на то, что молекулы обладают хорошими собственными свойствами без возможности агрегации или адсорбции в пробирках Eppendorf. % видов (А: Агрегат; М: Мономер; F: Фрагмент), измеренный по сумме пиков SEC, представлен ниже в таблице. При высокой концентрации молекулы интактны и содержат 4-5% агрегатов и ≤0,3% фрагментов после хранения в течение 2 недель при 40 °С, что прогнозирует хороший срок хранения.

Таблица 76.

	Начальный момент			2 недели, 4 °С			2 недели, 40 °С		
	А	М	F	А	М	F	А	М	F
ТМСВ150	0,8	99,2	0	1,4	98,6	0	3,6	96,1	0,3
ТМЕВ762	2,5	97,5	0	2,7	97,3	0	3,1	96,9	0
CD3В376	1,1	98,9	0	2,5	97,5	0	5,1	94,7	0,2

Определение аффинности биспецифического антитела к ТМЕFF2/CD3 с помощью кинетического эксклюзионного анализа (KinExA)

Для измерения в растворе равновесной аффинности K_D биспецифического мкАт ТМСВ150 и его двухвалентного исходного мкАт ТМЕFF2 ТМЕВ762 к внеклеточному домену (ВКД) использовали прибор KinExA 3200 (Sapidyne Instruments, Inc.). Готовили последовательные разведения человеческого внеклеточного домена (ВКД) ТМЕFF2 с постоянной концентрацией мкАт к ТМЕFF2 в 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 0,05% поверхностно-активного вещества P20, pH 7,4, 0,1% BSA и 0,02% NaN₃. Реакционные смеси инкубировали при комнатной температуре до достижения равновесия на основе связывающих взаимодействий. Продолжительность инкубации определяли с помощью моделирования программного обеспечения KinExA. Гранулы получали путем прямой ковалентной иммобилизации ТМЕFF2-ВКД путем аминного связывания на предварительно активированных гранулах, состоящих из сополимера бис-акриламид/азолактон (Pierce Biotechnology, Inc.). После инкубации образцы анализировали на приборе KinExA для оценки свободного антитела в смеси путем пропускания смеси через модифицированные ТМЕFF2 гранулы и обнаружения захваченного антитела с использованием вторичного антитела с флуоресцентной меткой. Данные аппроксимировали с моделью связывания 1:1 с использованием программного обеспечения KinExA Pro.

Таблица 77.

образец мкАт	K_D , пМ	95% ДИ, K_D , пМ
--------------	------------	--------------------

ТМСВ150	63,6	55,8-71,9
ТМЕВ762	46,1	38,0-55,1

Измерение аффинности связывания биспецифического антитела к TMEFF2/CD3 с N-концевым пептидом CD3ε

Константы кинетической скорости измеряли методом ППР, выполненные на биосенсорных поверхностях Biacore 8 K (GE Healthcare) и антител к человеческому Fc. Антитела к человеческому иммуноглобулину ковалентно связывали с поверхностью сенсорного чипа CM4 (GE Healthcare). Представляющие интерес антитела захватывали сенсорным чипом иммуноглобулина человека с последующей инъекцией N-концевого пептида CD3ε в различных концентрациях в буферный раствор HEPES, содержащий 0,05% поверхностно-активного вещества P20 (TweenTM 20) и 100 мкг/мл BSA. Поверхность регенерировали, вводя 2 инъекции 30 мкл 0,8% фосфорной кислоты со скоростью 100 мкл/мин. Приведенные данные представляют собой разность сигнала SPR между проточной ячейкой, содержащей захваченное антитело и эталонной ячейкой, не содержащей захваченного антитела. Дополнительно погрешность, вносимую прибором в сигнал, устраняли, вычитая данные пустой инъекции из сигнала с вычтенным эталонным сигналом. Данные анализировали, аппроксимируя фазы ассоциации и диссоциации при всех концентрациях (глобальная аппроксимация) моделью связывания 1: 1, используя программное обеспечение Biaevaluation (Biacore, Inc.). Данные представлены в виде среднего значения+95% ДИ (доверительный интервал), которое вычисляют по значению t для 95% ДИ* ст. откл./квадрат числа повторов.

Таблица 78.

образец мкАт	Средн. Значение (1/М*с) k_{on}	Средн. Значение (1/с) k_{off}	Средн. Значение K_D, нМ	95% ДИ, K_D, пМ
ТМСВ150	3.57E+04	1.03E-03	28,7	24,4,-34,3
CD3В376	4.33E+04	1.17E-03	26,9	21,1,-34,4

7-8 Биспецифические антитела к TMEFF2xCD3 эффективны для опосредованного Т-клетками уничтожения клеток рака предстательной железы

Опосредованное Т-клетками уничтожение клеток рака предстательной железы

Выбранные биспецифические антитела к TMEFF2xCD3 оценивали на их способность опосредовать опосредованное Т-клетками уничтожение раковых клеток предстательной железы.

Опосредованное Т-клетками уничтожение биспецифических антител к TMEFF2xCD3 измеряли с помощью анализа цитотоксичности каспазы, который косвенно измеряет уничтожение клеток посредством расщепления флуоресцентного субстрата активной каспазой 3/7. Расщепление субстрата приводит к образованию флуоресцентного красителя ДНК с флуоресценцией, ограниченной ядром клетки. В каждой лунке на протяжении всего анализа проводят повторные измерения флуоресценции с

использованием моторизованного объектива с 10-кратным увеличением, способным точно визуализировать клетку(и) в одних и тех же координатах. Популяции клеток-мишеней идентифицируют на основании определенных ограничений по размеру и/или с применением вторичной метки.

Замороженные пан CD3⁺ Т-клетки (Biological Specialty Corporation, Кольмар, штат Пенсильвания) выделяли путем отрицательной селекции относительно нормальных здоровых доноров. Клетки рака предстательной железы, экспрессирующие TMEFF2 (LNCaP-AR), культивировали в RPMI 1640 с добавлением 10% HI FBS+добавки (Life Technologies). Т-клетки и клетки-мишени объединяли в соотношении эффектор-мишень (Е:Т) 3:1 в RPMI без фенолового красного+10% FBS и добавки (Life Technologies) без реагентов для селекции и к каждому мл клеток добавляли 0,6 мкл реагента каспаза NucView (Essen Bioscience) в соответствии с рекомендациями производителя. Общий объем клеток составил 0,1 мл в соответствующие лунки прозрачного 96-луночного плоскодонного планшета (BD Falcon). Биспецифические антитела TMEFF2xCD3 получали в 2X конечной концентрации в RPMI без фенолового красного, полученной, как указано выше, и в каждую лунку добавляли по 0,1 мл соединений. После 30 минут инкубации при комнатной температуре для сведения к минимуму агрегации клеток на краю лунок планшеты переносили в прибор Zoom Incucyte (Essen Bioscience), в котором поддерживали температуру 37 °С, 5% CO₂.

Для каждой тестируемой клеточной линии были разработаны описания обработки клеток в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили каждые шесть часов, пока не наблюдалось плато сигнала каспазы, с последующим тремя или более последовательными уменьшениями относительно максимального сигнала в лунке(-ах), содержащей (-их) самую высокую концентрацию тестируемого(-ых) соединения(-ий).

После завершения анализа каждый планшет анализировали с использованием описания соответствующей обработки. Необработанные данные флуоресценции экспортировали с программного обеспечения Incucyte Zoom и вставляли в GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., г. Ла-Холья, штат Калифорния, США). Активность каспазы 3/7 определяли путем вычисления площади под кривой (AUC) для каждой лунки в GraphPad. Значения AUC отображали на графике в виде зависимости от Log₁₀ нМ соединения. EC₅₀ для каждой кривой дозы, в наномолях (нМ), регистрировали после нелинейного регрессионного анализа (аппроксимация параметров 4, наименьшие обычные квадраты). Каждый анализ содержал минимум три биологических повторности, и каждую клеточную линию тестировали с использованием Т-клеток от пяти здоровых доноров. Данные дополнительно анализировали с помощью доклинической статистики с использованием нелинейной регрессионной модели.

Биспецифические антитела к TMEFF2xCD3 эффективны в моделях опухолей предстательной железы *in vivo*

Выбранные биспецифические антитела исследовали в модели рака предстательной железы LnCaP *ex vivo* у самцов мышей NSG. Для исследования клетки 10⁶ LnCaP в 50%

Cultrex в количестве 0,2 мл/животное вводили путем подкожной инъекции в правый бок на 0 сутки. Животных рандомизировали, когда опухоли достигали объема приблизительно ~ 100-150 мм³, и на 15 сутки вводили внутривенно 20⁶ Т-клеток/мышь. В каждой группе было по десять животных. Обработка антителами начиналась через 1-3 суток после инъекции Т-клеток. Антитела вводили внутривенно дважды в неделю. Перед введением дозы все животные получали IVIG+Fc Block. Объем опухоли и массу тела оценивали дважды в неделю до достижения опухолью ~ 1200 мм³. Группы лечения приведены в **таблице 79**. В этих анализах в качестве отрицательного контроля использовали CD3-связывающее плечо и нулевое плечо, которое связывается с gp120 ВИЧ.

Таблица 79.

Группа	Обработка	Доза
1	CD3xNull	5 мг/кг
6	ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376)	5 мг/кг
7	ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376)	0,5 мг/кг
8	ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376)	5 мг/кг
9	ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376)	0,5 мг/кг

В **таблице 80** приведен процент ингибирования роста опухоли на 38 сутки в каждой группе после имплантации опухоли.

На **Фиг. 71** показано уменьшение среднего объема опухоли с течением времени после имплантации опухоли. На **Фиг. 72** показано уменьшение среднего объема опухоли у каждой мыши, получавшей 0,05, 0,1 или 0,5 мг/кг ТМЕВ762xCD3В376.

Таблица 80.

Обработка	% TGI на 38 сутки
CNT07008 (Null × CD3)	
ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376), 5 мг/кг	48
ТМСВ132 (ТМЕВ675 × CD3В376), 0,5 мг/кг	47,7
ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376), 5 мг/кг	23,3
ТМСВ131 (ТМЕВ570 × CD3В376), 0,5 мг/кг	35

Эффективность ТМЕВ762xCD3В376 (ТМСВ150) также оценивали в развившихся ксенотрансплантатах LNCaP у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG), гуманизированных Т-клетками 20е6. Животных рандомизировали в группы по 10 животных, каждая по среднему объему опухоли на 13 сутки после имплантации опухоли. ТМЕВ762xCD3В376 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг или контрольное антитело nullxCD3В376 в дозе 0,5 мг/кг вводили в/б два раза в неделю в течение 5 недель. На 35 сутки после имплантации опухоли, когда по меньшей мере восемь животных оставались в каждой группе, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI) по объему опухоли. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для ТМЕВ762xCD3В376 в дозах 0,5 и 0,1

мг/кг, но не в дозах 0,05 мг/кг по сравнению с контролем nullxCD3 (Фиг. 72, $p \leq 0,0001$). TMEB762xCDB376 при 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг вызывало ингибирование роста опухоли на 110%, 88% и 25% соответственно по сравнению с контрольными образцами, получавшими лечение NullxCD3. Лечение TMEB762xCDB376 приводила к семи и трем полным ответам в дозах 0,5 и 0,1 мг/кг, соответственно. Подкожные опухоли LNCaP измеряли штангенциркулем два раза в неделю, а результаты представляли в виде среднего объема опухоли (мм^3) \pm СОС (оставались ≥ 8 мышей на группу).

Активация Т-клеток в ответ на введение TMCB132

Активацию Т-клеток в клетках рака предстательной железы LNCaP измеряли посредством проточной цитометрии, в частности, путем оценки положительности CD25 Т-клеток CD3+/CD8+ у 6 отдельных нормальных здоровых доноров (9642, 9672, 9762, 9772, 9832, 9852) через 72 часа после лечения TMCB132 (Фиг. 74). Активацию CD3+ пан-Т-клеток, добавленных в соотношении эффектор: мишень 3:1, наблюдали в ответ на введение TMCB132 на клетки рака предстательной железы LNCaP.

Опосредованная Т-клетками цитотоксичность TMCB132 *in vitro*.

Анализ опосредованной Т-клетками цитотоксичности использовали для оценки цитотоксического потенциала TMCB132 *in vitro* с использованием долговременной визуализации на платформе Incucyte. TMCB132 исследовали в TMEFF2-положительной клеточной линии LNCaP в присутствии выделенных пан-человеческих CD3+ Т-клеток от здоровых доноров при соотношении эффектор: мишень (Эффектор: Мишень) (соотношение Е: Т) 3:1. Уничтожение клеток путем апоптоза контролировали путем измерения сигнала флуоресценции для активной каспазы 3/7 в течение 96 часов. TMCB132 способствовал дозозависимому снижению жизнеспособных клеток LNCaP с увеличением времени. Дозозависимое увеличение активности каспазы 3/7 или сигнала флуоресценции указывает на гибель клеток LNCaP в присутствии Т-клеток (Фиг. 75). Данные демонстрируют, что TMCB132 эффективен для индукции опосредованной Т-клетками гибели опухолевых клеток LNCaP.

Эффективность TMCB132 в развившемся п/к ксенотрансплантате человеческих клеток предстательной железы у гуманизированных Т-клетками мышей.

Противоопухолевую эффективность TMCB132 оценивали в развившихся подкожных (п/к) ксенотрансплантатах человеческих клеток LNCaP у самцов мышей NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG, The Jackson Laboratory, Бар Харбор, штат Мериленд), гуманизированных 20e⁶ Т-клетками. Животных рандомизировали в группы по 10 животных, каждая по среднему объему опухоли на 13 сутки после имплантации опухоли. TMCB132 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг или контрольное антитело nullxCD3B219 в дозе 0,5 мг/кг вводили в/б два раза в неделю в течение 4 недель. На 45 сутки после имплантации опухоли, когда по меньшей мере семь животных оставались в каждой группе, рассчитывали ингибирование роста опухоли (% TGI) по объему опухоли. Статистически значимое ингибирование роста опухоли наблюдали для TMCB132 в дозах

0,5 и 0,1 мг/кг, и 0,05 мг/кг по сравнению с контролем nullxCD3 (Фиг. 75, $p \leq 0,0001$). ТМСВ132 в дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг вызывал ингибирование роста опухоли на 102%, 109% и 47%, соответственно, по сравнению с контрольными образцами, получавшими NullxCD3. Лечение ТМСВ132 привело к получению трех, двух и одного полного ответа при дозах 0,5, 0,1 и 0,05 мг/кг, соответственно

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

а) тяжелую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR), содержащую SEQ ID NO: 662; HCDR2, содержащую SEQ ID NO: 663; и HCDR3, содержащую SEQ ID NO: 664, и легкую цепь, содержащую определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR), содержащую SEQ ID NO: 671, LCDR2, содержащую SEQ ID NO: 673, и LCDR3, содержащую SEQ ID NO: 690;

б) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 652, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 661;

с) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 640, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 676;

д) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 657, и вариабельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 678; или

е) тяжелую цепь, содержащую SEQ ID NO: 675, и легкую цепь, содержащую SEQ ID NO: 677.

2. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент, причем выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает CD3d, или CD3e, или CD3e и CD3d *Macaca fascicularis* или человека с аффинностью связывания около 300 нМ или менее.

3. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, в котором аффинность связывания составляет около 100 нМ или менее.

4. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2 или п. 3, в котором аффинность связывания измеряют с помощью проточной цитометрии или анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °С.

5. Выделенное рекомбинантное антитело к CD3 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих пунктов, в котором антитело или антигенсвязывающий фрагмент имеет одно, два, три или четыре из следующих свойств:

а) связывает CD3⁺ Т-лимфоциты человека и *Macaca fascicularis* с расчетной EC50 300 нМ или менее и связывает клетки НЕК, экспрессирующие CD3 *Macaca fascicularis*, с расчетной EC50 300 нМ или менее, причем разница в расчетных EC50 между связыванием CD3⁺ Т-лимфоцитов и связыванием клеток НЕК, экспрессирующих CD3 *Macaca fascicularis*, составляет менее 5 раз, и при этом расчетную EC50 измеряют в анализе связывания с цельными клетками при 0°С с использованием проточной цитометрии;

б) связывает рекомбинантный CD3d от человека (SEQ ID NO: 691), или связывает рекомбинантный CD3e от человека (SEQ ID NO: 636), или связывает рекомбинантный CD3d от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 692), или связывает рекомбинантный CD3e от *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 693) с равновесной константой диссоциации (K_D) 300 нМ

или менее, в котором K_D измеряют с помощью анализа методом поверхностного плазмонного резонанса с использованием системы ProteOn XPR36 при +25 °С;

с) связывает остатки 1-6 CD3ε при определении с помощью рентгенокристаллографии; или

d) активирует Т-клетки или индуцируют экспрессию CD69 в той же степени, что и сОКТ3 или SP34-2 при определении с помощью анализа методом клеточной сортировки с активацией флуоресценции.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому одному из предшествующих пунктов, содержащее по меньшей мере одну замену в константном домене антитела, причем по меньшей мере одна замена включает:

a) замены в тяжелой цепи K409R, F405L или F405L и R409K;

b) замены в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A;

c) замены в тяжелой цепи L234A, G237A, P238S, H268A, A330 и P331S, при этом антитело относится к изотипу IgG1; или

d) замену в тяжелой цепи S228P, при этом антитело относится к изотипу IgG4;

в котором нумерация остатков соответствует индексу EU.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее последовательность тяжелой цепи (HC) и последовательность легкой цепи (LC) с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673, и 690, соответственно.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

17. Антитело или его антигенсвязывающий участок по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело является человеческим или гуманизированным.

18. Антитело по п. 17, в котором антитело относится к изотипу IgG4 или IgG1.

19. Антитело по п. 18, содержащее одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять замен в Fc антитела.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее HC с SEQ ID NO: 639 и LC с SEQ ID NO: 646, содержащие по меньшей мере одну замену, включающую:

a) замены в легкой цепи D43G, L49M, L50I, S62N, Q85E;

b) замены в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E, H89Y;

c) замены в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R70K, T83S, L96V;

d) любую одну из замен в легкой цепи D43G, V48L, L49M, L50I, S62N, Q85E или H89Y; или

e) любую одну из замен в тяжелой цепи R10G, R13K, V73I, R79K, T83S или L96V, в котором нумерация остатков соответствует индексу EU.

21. Антитело по любому из предшествующих пунктов, в котором антитело является биспецифическим или мультиспецифическим.

22. Биспецифическое антитело, содержащее первый домен, который специфически связывает CD3, и второй домен, который специфически связывает второй антиген, причем первый домен содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 с SEQ ID NO: 662, 663, 664, 671, 673 и 690, соответственно.

23. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, и при этом первый или второй домен содержит замены в тяжелой цепи S228P, F234A, L235A, F405L и R409K, а другой домен из первого или второго домена содержит замену в тяжелой цепи S228P, F234A и L235A, причем нумерация остатков соответствует индексу EU.

24. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый и/или второй домен содержит по меньшей мере одну замену в константном домене CH3, содержащем замену F405L или F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

25. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи F405L, а другой из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи K409R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

26. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый домен и второй домен относятся к изотипу IgG4, при этом один из первого или второго доменов содержит замену в тяжелой цепи S228P, а другой из первого или второго доменов содержит замены в тяжелой цепи S228P, F405L и R409K, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

27. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый домен содержит VH и

VL с SEQ ID NO: 652 и 661, соответственно.

28. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 640 и 676, соответственно.

29. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый домен содержит VH и VL с SEQ ID NO: 657 и 678, соответственно.

30. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором первый домен содержит HC и LC с SEQ ID NO: 675 и 677, соответственно.

31. Биспецифическое антитело по п. 22, в котором второй антиген представляет собой антиген клеточной поверхности, который экспрессируется на клетке-мишени, отличной от иммунной эффекторной клетки.

32. Биспецифическое антитело по п. 31, в котором антиген клеточной поверхности представляет собой опухолеассоциированный антиген.

33. Биспецифическое антитело по любому из пп. 24-34, в котором второй антиген представляет собой CD33, IL1RAP, PSMA или TMEFF2.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

35. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из пп. 1-34.

36. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 35.

37. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 36.

38. Способ получения антитела по любому из пп. 1-34, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 37 в условиях, в которых антитело экспрессируется, и выделение антитела, продуцируемого клеткой-хозяином.

39. Способ лечения злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного антитела по любому из пп. 1-34 субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения злокачественного новообразования.

40. Способ по п. 39, в котором злокачественное новообразование представляет собой солидную опухоль или гематологическую злокачественную опухоль.

41. Способ по п. 40, в котором солидная опухоль представляет собой рак предстательной железы, колоректальный рак, рак желудка, светлоклеточный рак почки, рак мочевого пузыря, рак легкого, плоскоклеточный рак, глиому, рак молочной железы, рак почки, неоваскулярное нарушение, светлоклеточную почечно-клеточную карциному (СПКК), рак поджелудочной железы, рак почки, рак уротелия или аденокарциному печени.

42. Способ по п. 41, в котором рак предстательной железы представляет собой рефрактерный рак предстательной железы, внутриэпителиальную неоплазию предстательной железы, андроген-независимый рак предстательной железы или злокачественную опухоль предстательной железы.

43. Способ по п. 40, в котором гематологическая злокачественная опухоль представляет собой острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром

(МДС), острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВКЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ) или опухоль из бластных плазматоидных дендритических клеток (ОБПДК).

44. Способ по любому из пп. 38-43, в котором антитело вводят в комбинации со вторым терапевтическим агентом.

45. Антитело по любому из пп. 1-34 для применения в терапии.

46. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с антителом по любому из пп. 1-34.

По доверенности

1/104

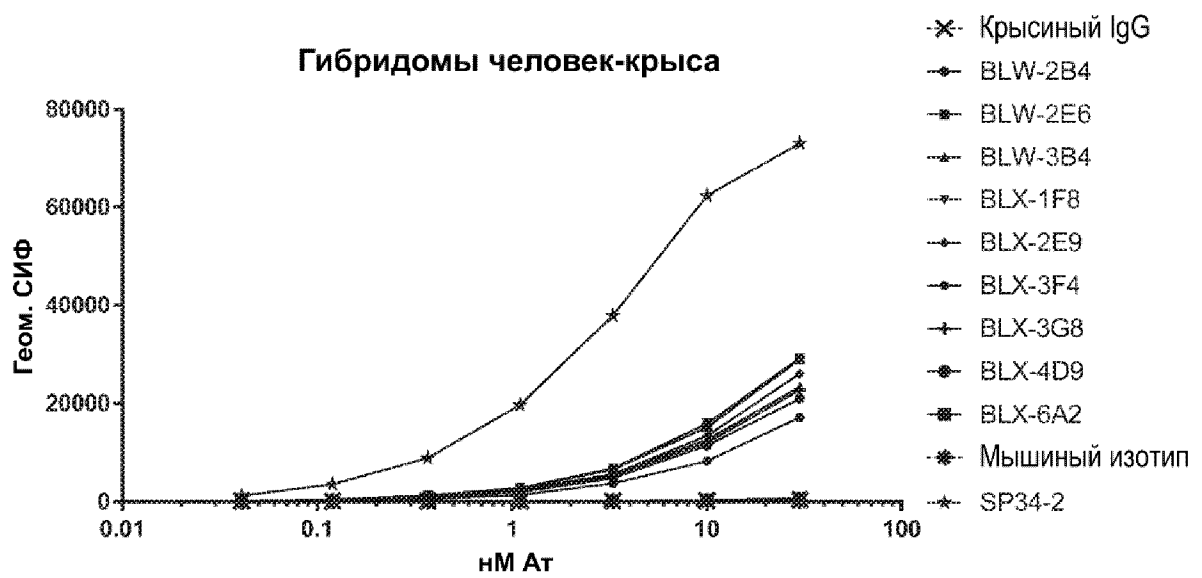
Фиг. 1А

VH		1	50
BLW-2B4-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
BLW-3B4-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
BLX-1F8-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
BLX-3G8-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWTWIRQSPSRGLEWL
BLX-3F4-гамма	(1)	QVRLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
BLW-2E6-гамма	(1)	QVQLQQSGPRLVRLP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWL
BLX-2E9-гамма	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVFNNNGAWSWIRQSPSRGLEWL
IGHV6-1*01_Homo	(1)	QVQLQQSGPGLVKP	SQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWVWIRQSPSRGLEWL
			CDR1
		51	100
BLW-2B4-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVSVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCV
BLW-3B4-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVSVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCV
BLX-1F8-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVSVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLKSVTPEDTALYYCS
BLX-3G8-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVSVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLKSVTPEDTALYYCS
BLX-3F4-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVTVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLTSVTPEDTALYYCA
BLW-2E6-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVSVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCA
BLX-2E9-гамма	(51)	GRYYRSKWLYDYAVSVKSRI	TVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCA
IGHV6-1*01_Homo	(51)	GRYYRSKWYNDYAVSVKSRI	TVNPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCA
			CDR2
		101	120
BLW-2B4-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
BLW-3B4-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
BLX-1F8-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
BLX-3G8-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
BLX-3F4-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
BLW-2E6-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
BLX-2E9-гамма	(101)	RGYSSSF	DYWGQGLVTVSS
IGHV6-1*01_Homo	(101)	R-----	-----
			CDR3

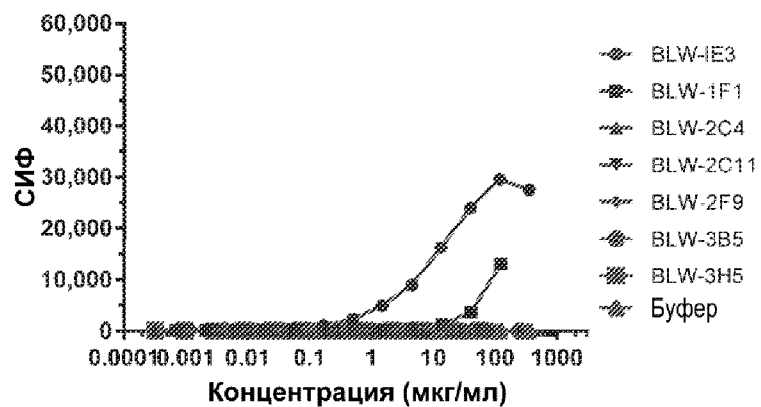
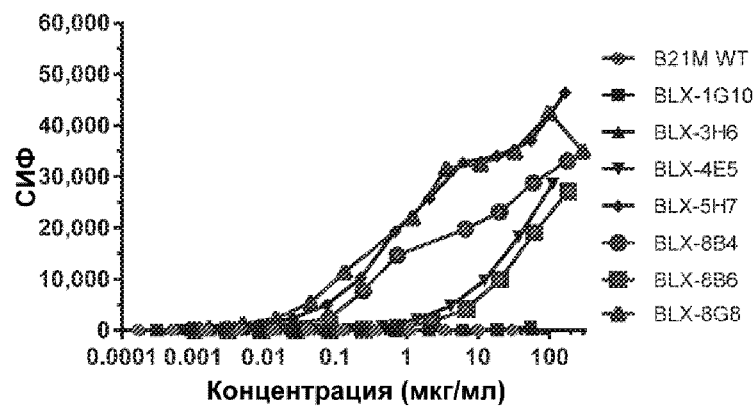
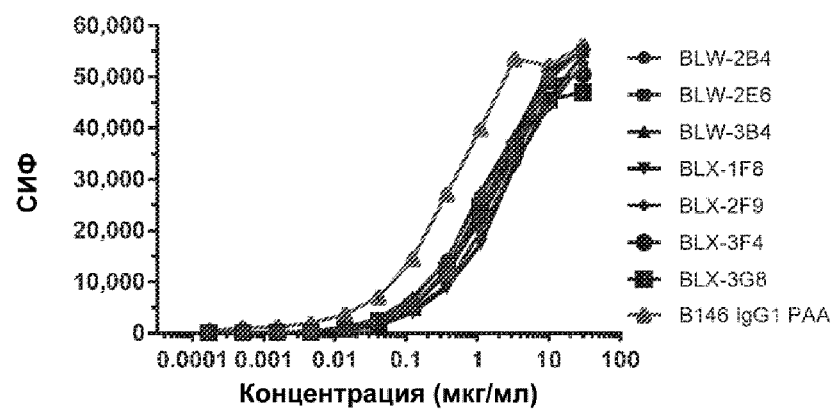
Фиг. 1В

VL		1	50
BLW-2B4-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS RD IGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
BLW-3B4-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS RD IGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
BLX-1F8-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS D IGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
BLW-2E6-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
BLX-2E9-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
BLX-3F4-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
BLX-3G8-лямбда	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLL	
IGLV2-23*02_Номо	(1)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSS DVGSYNL VSWYQQHP GKAPKLM I	
		CDR1	
		51	100
BLW-2B4-лямбда	(51)	YEVNKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLW-3B4-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-1F8-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKS D NTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLW-2E6-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-2E9-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-3F4-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
BLX-3G8-лямбда	(51)	YEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCCSYAGSGTLL	
IGLV2-23*02_Номо	(51)	YEVSKRPSGV SN RFSGSKSGNTASLTISGLQAED E ADY YCCSYAGS STF -	
		CDR2	CDR3
		101	
BLW-2B4-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
BLW-3B4-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
BLX-1F8-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
BLW-2E6-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
BLX-2E9-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
BLX-3F4-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
BLX-3G8-лямбда	(101)	FGGGTKLTVL	
IGLV2-23*02_Номо	(100)	-----	

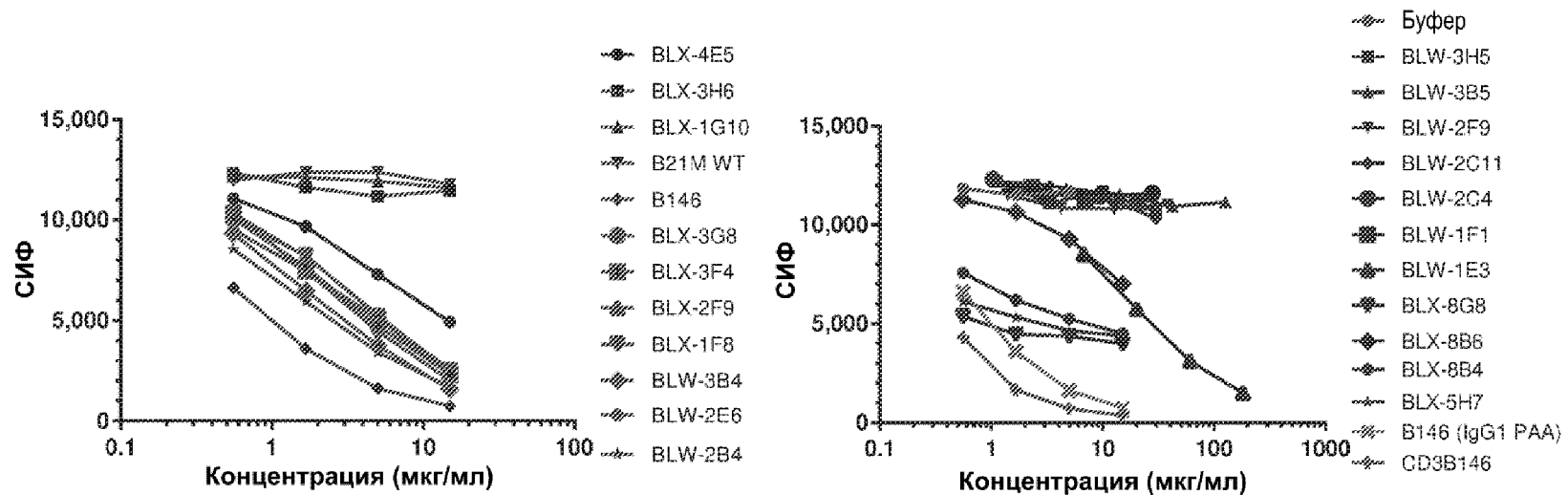
Фиг. 2



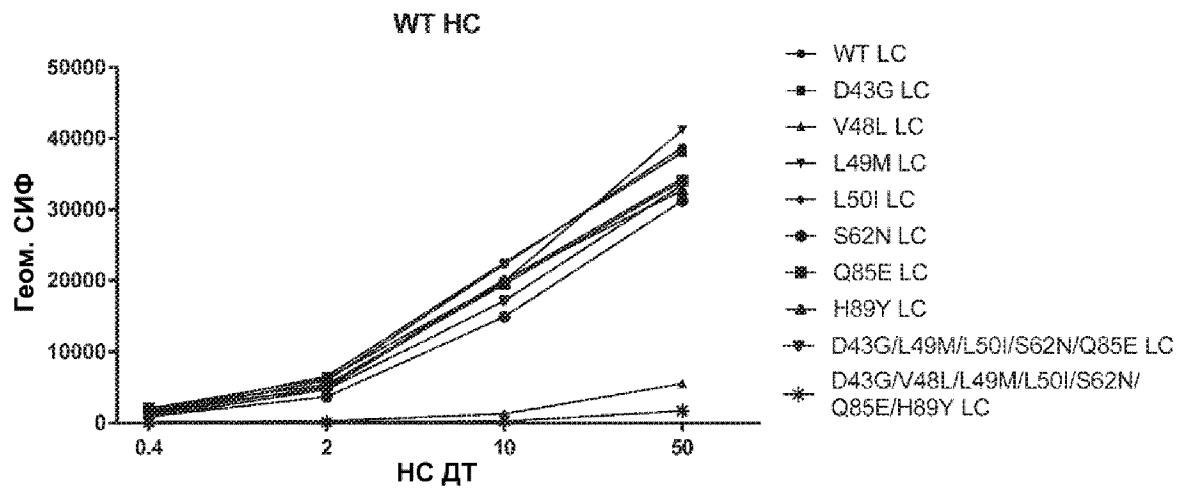
Фиг. 5



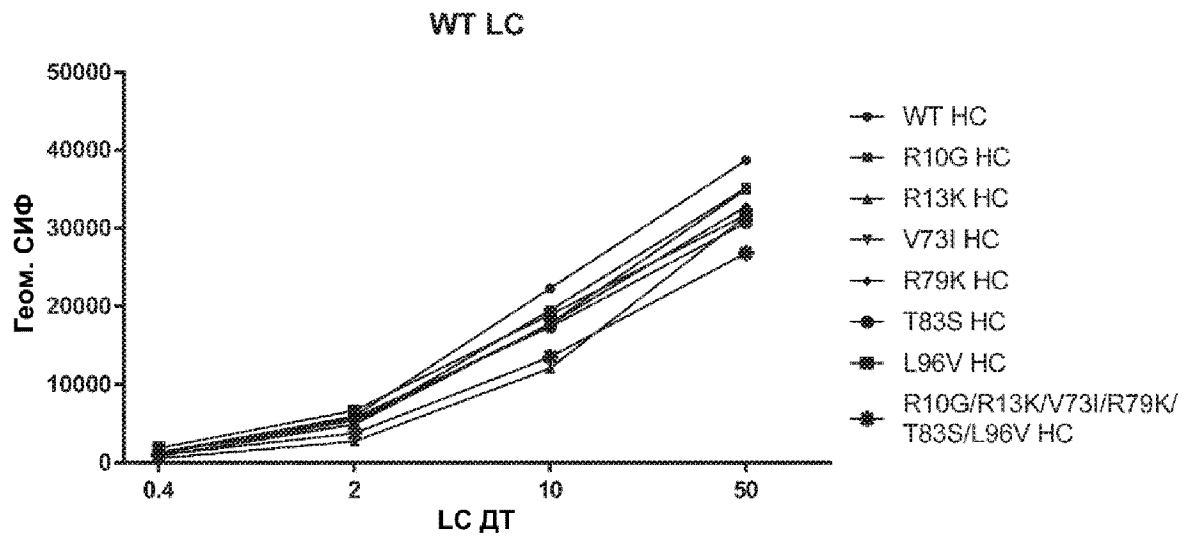
Фиг. 6



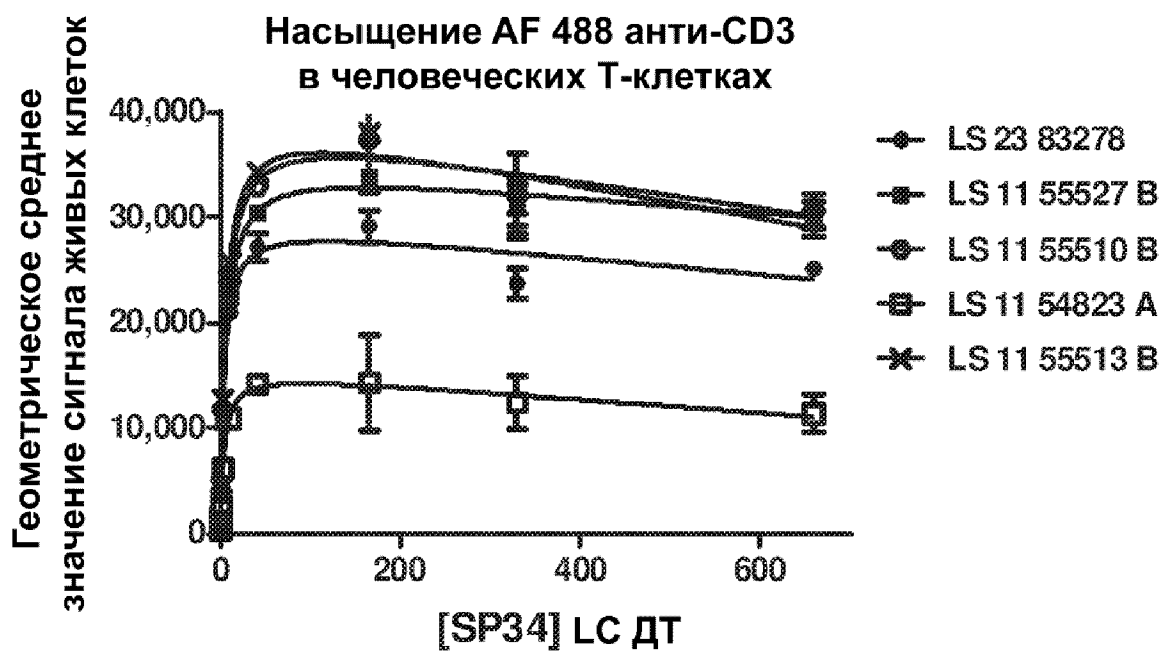
Фиг. 7



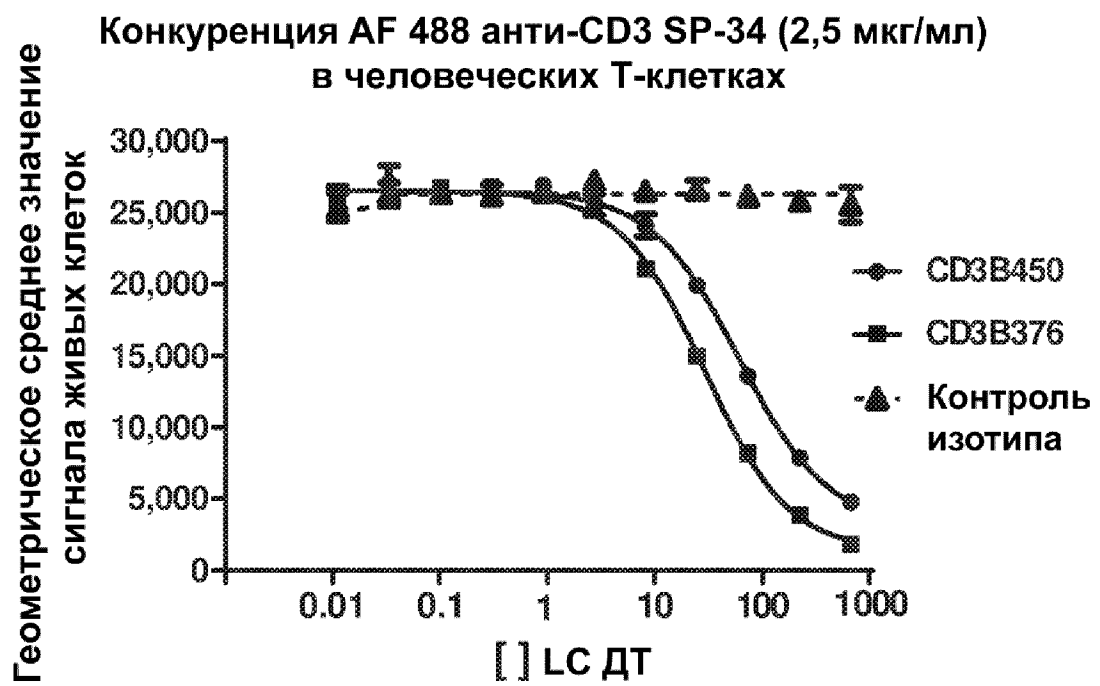
Фиг. 8



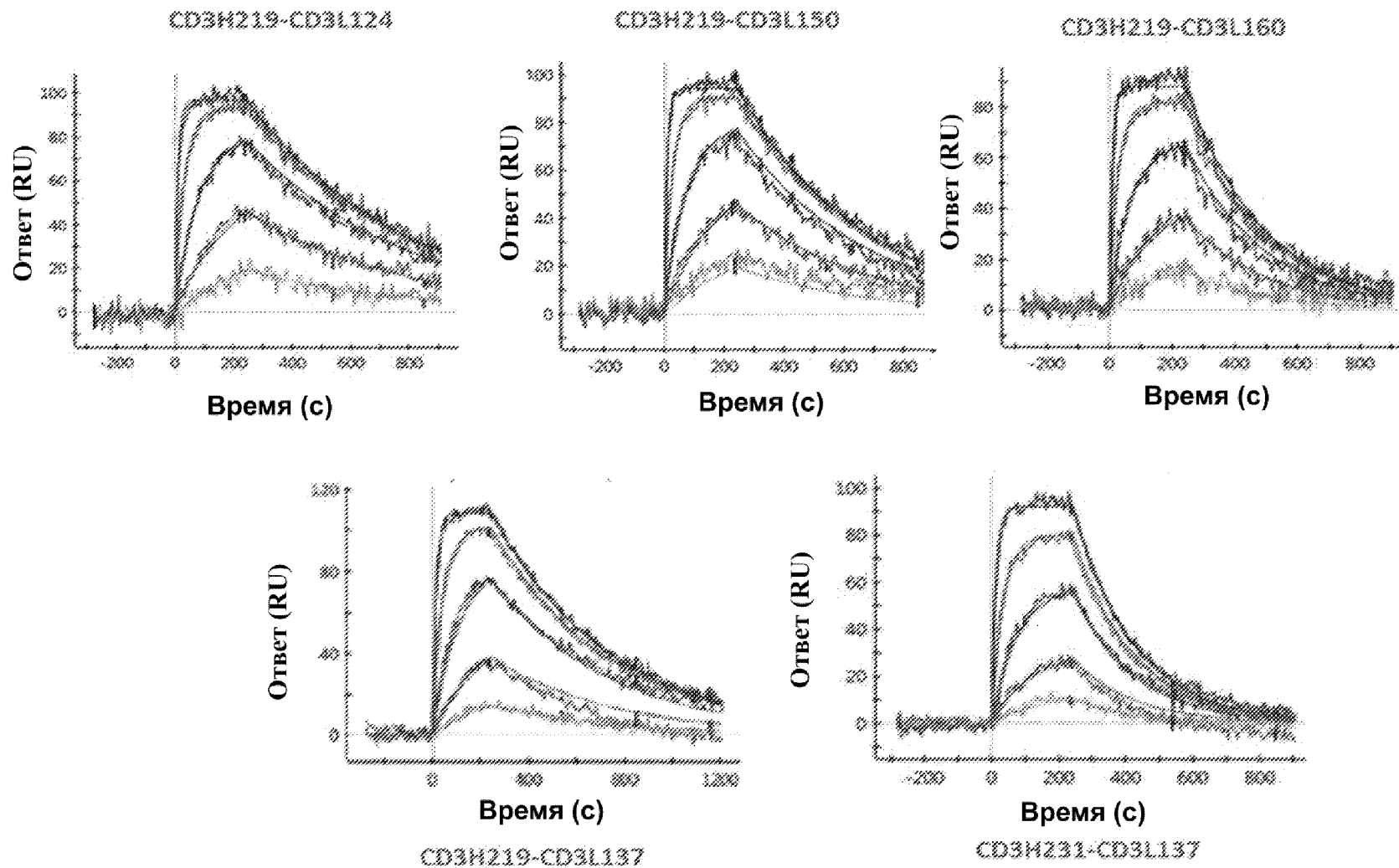
Фиг. 9



Фиг. 10

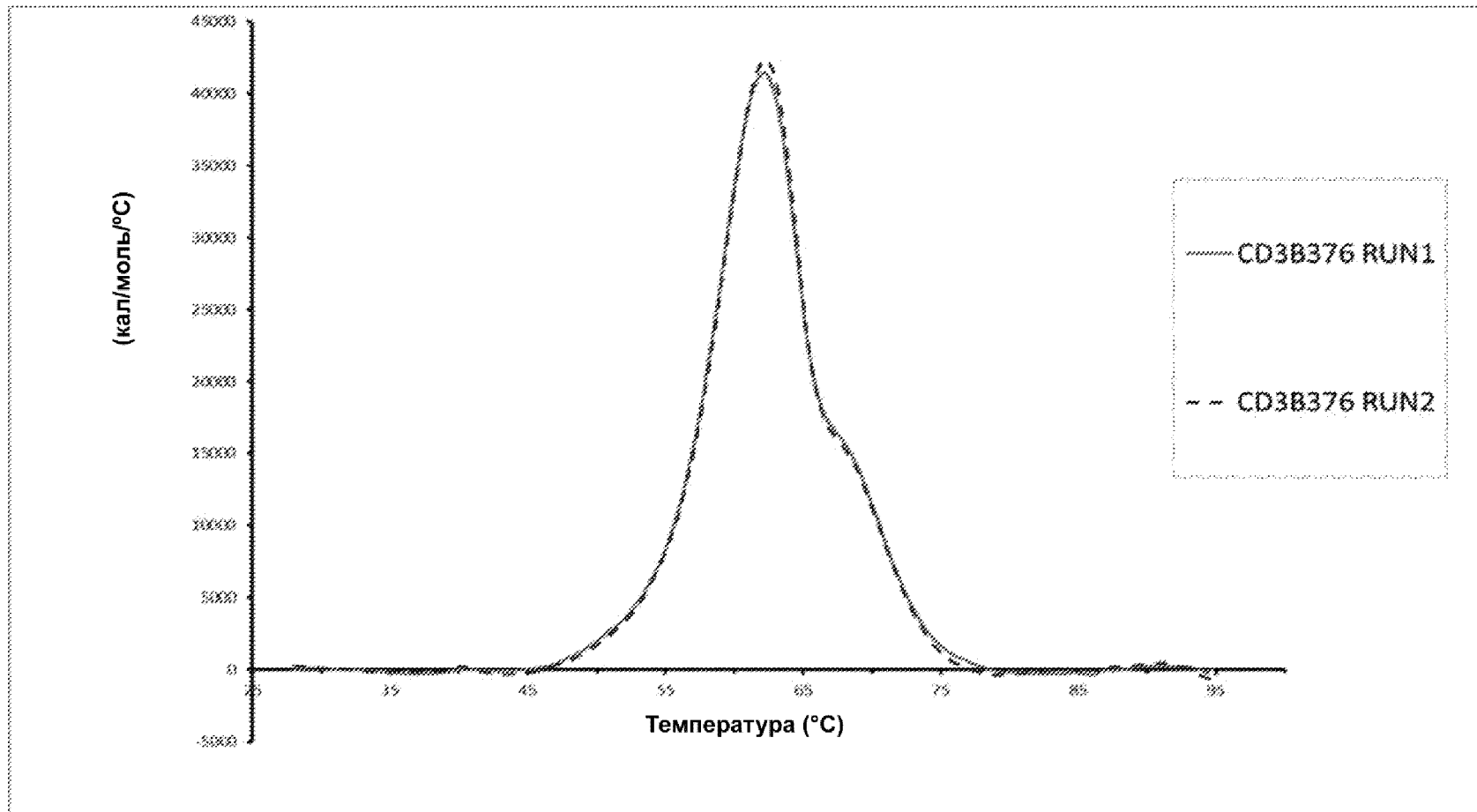


Фиг. 11

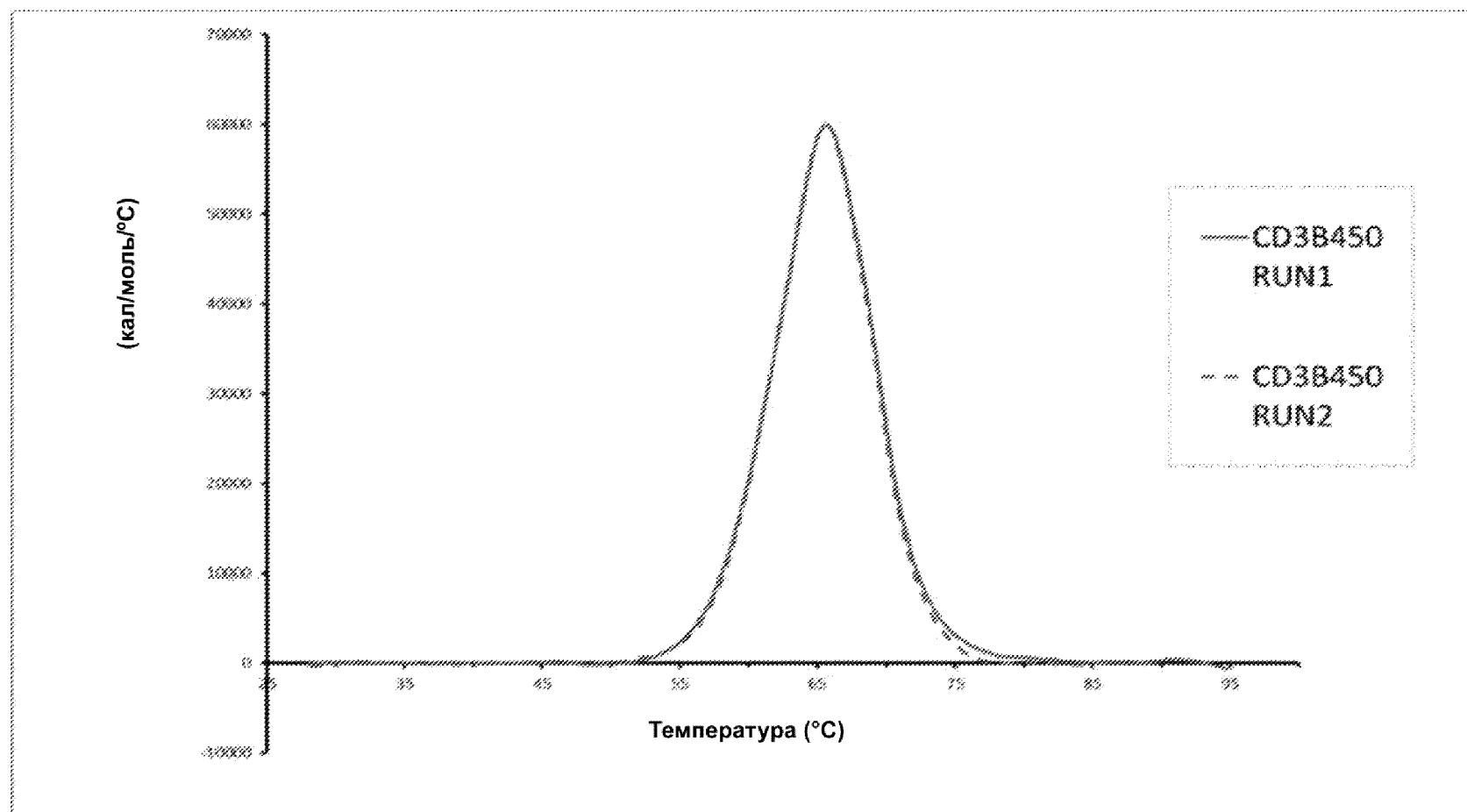


12/104

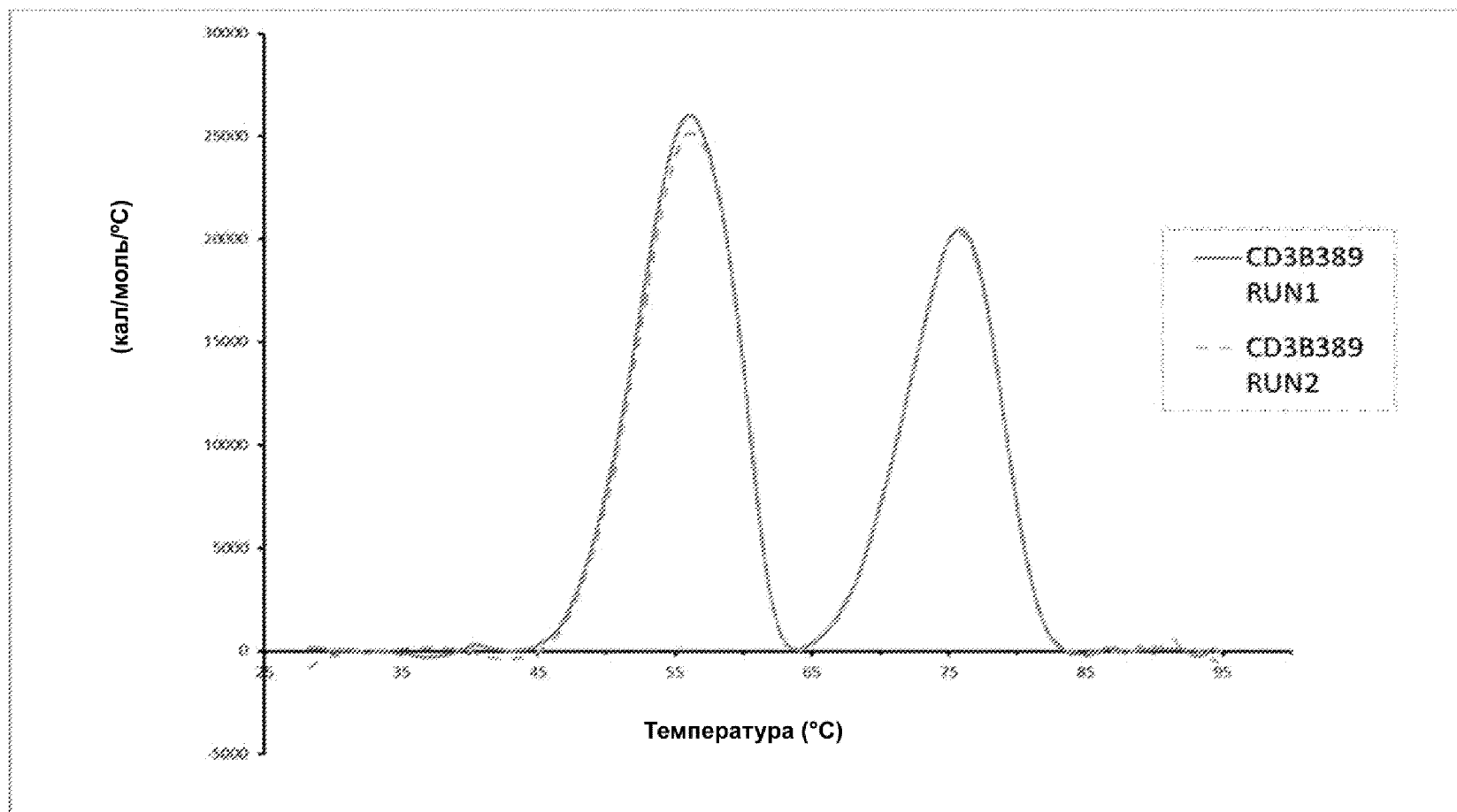
Фиг. 12А



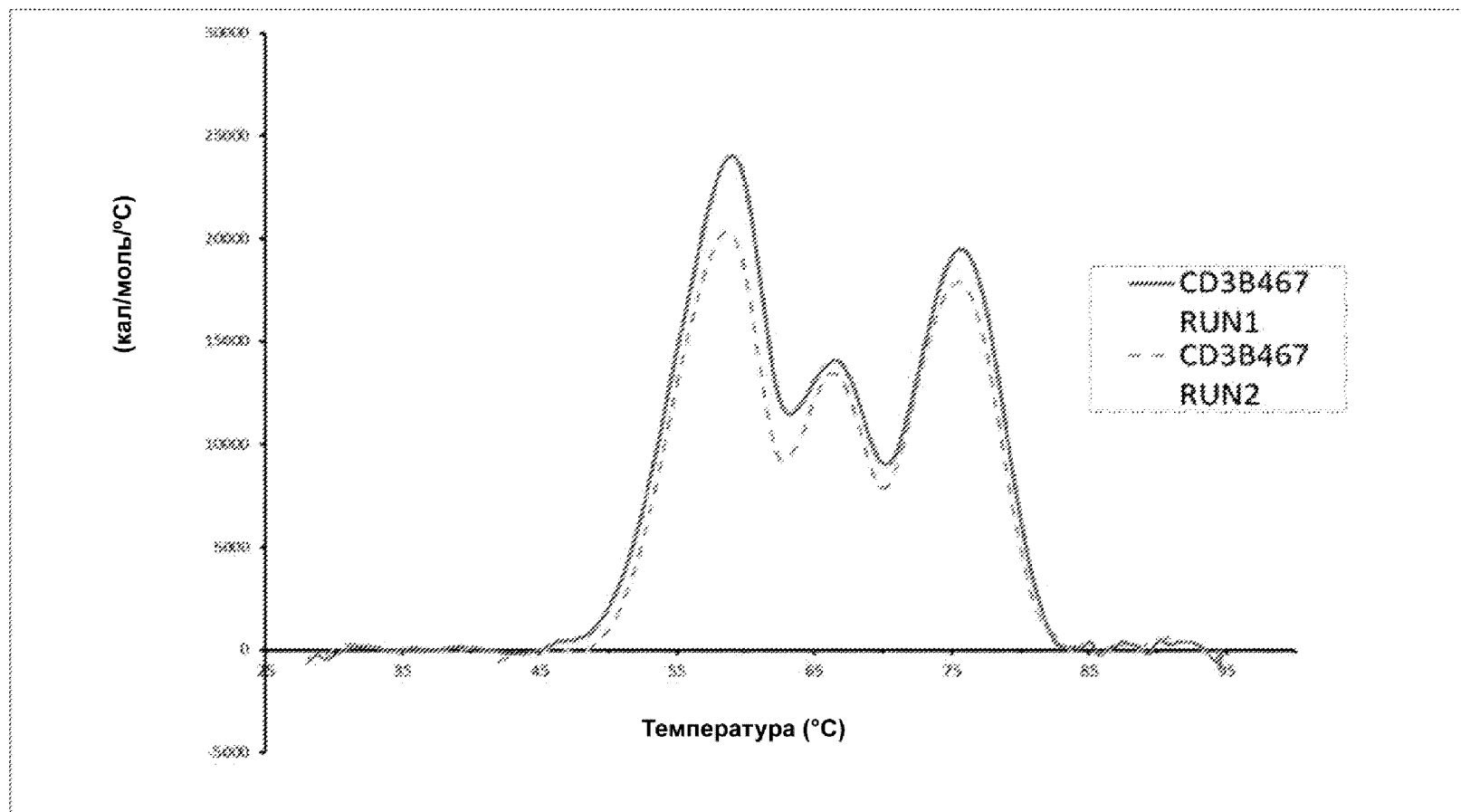
Фиг. 12В



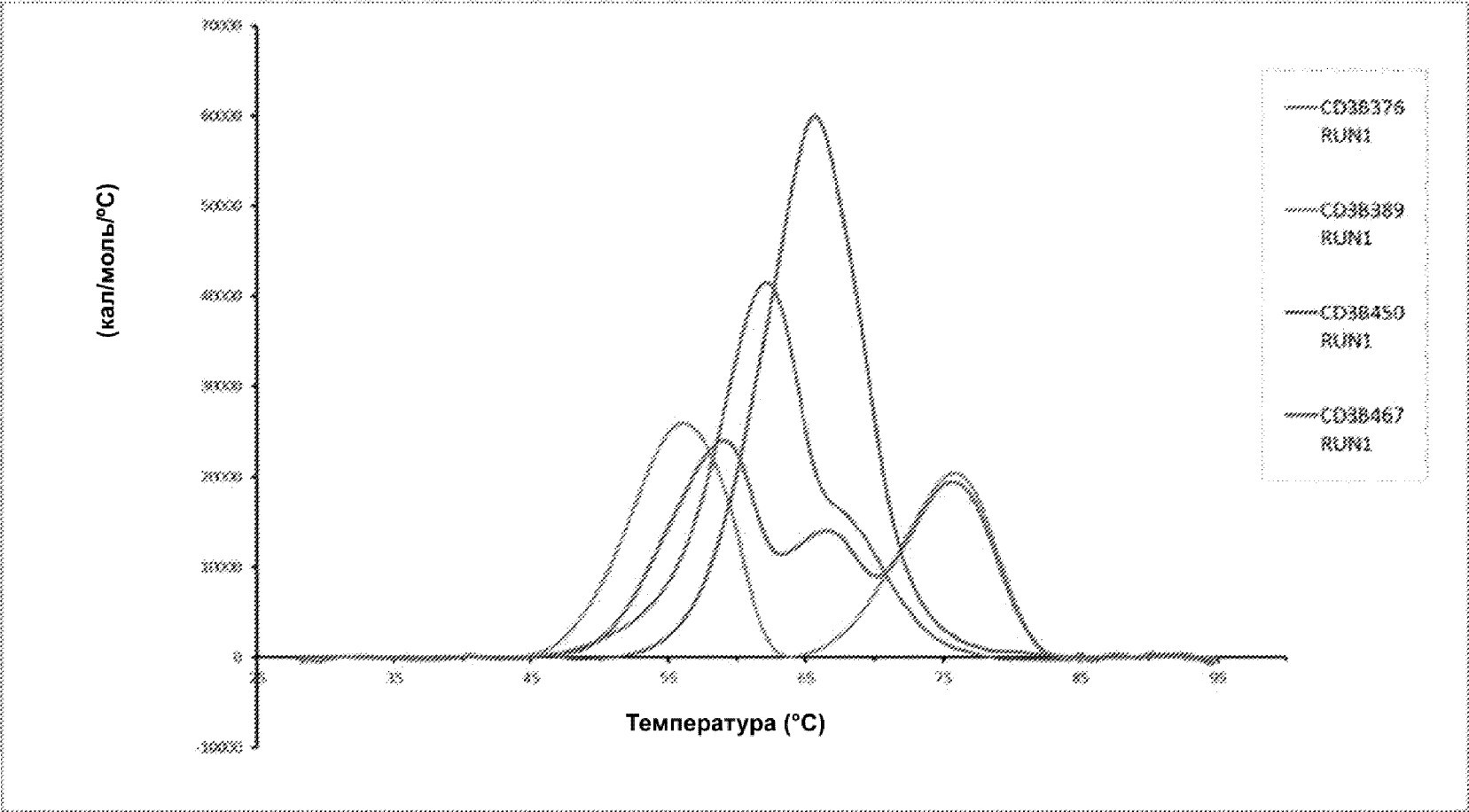
Фиг. 12С



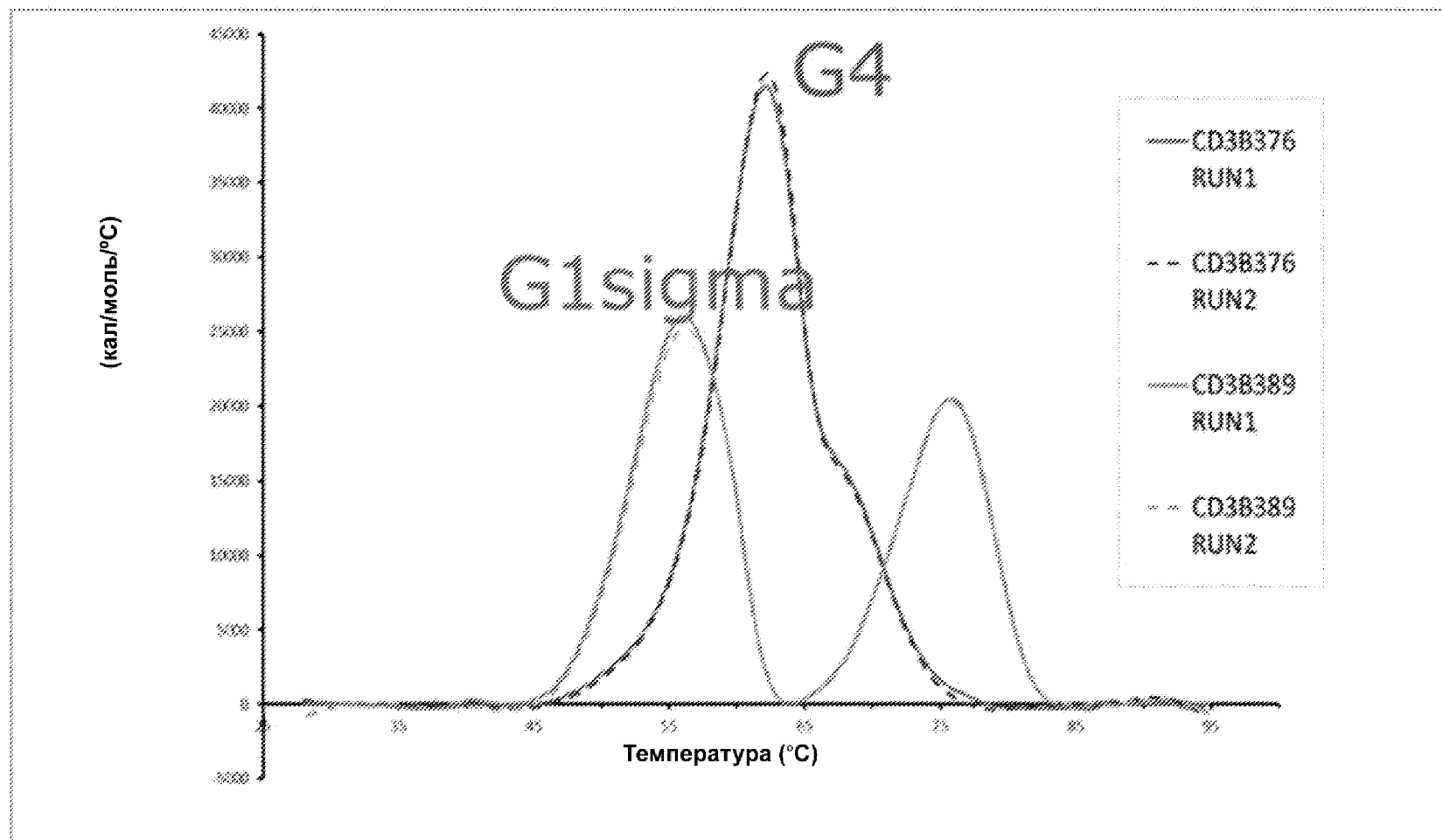
Фиг. 12D



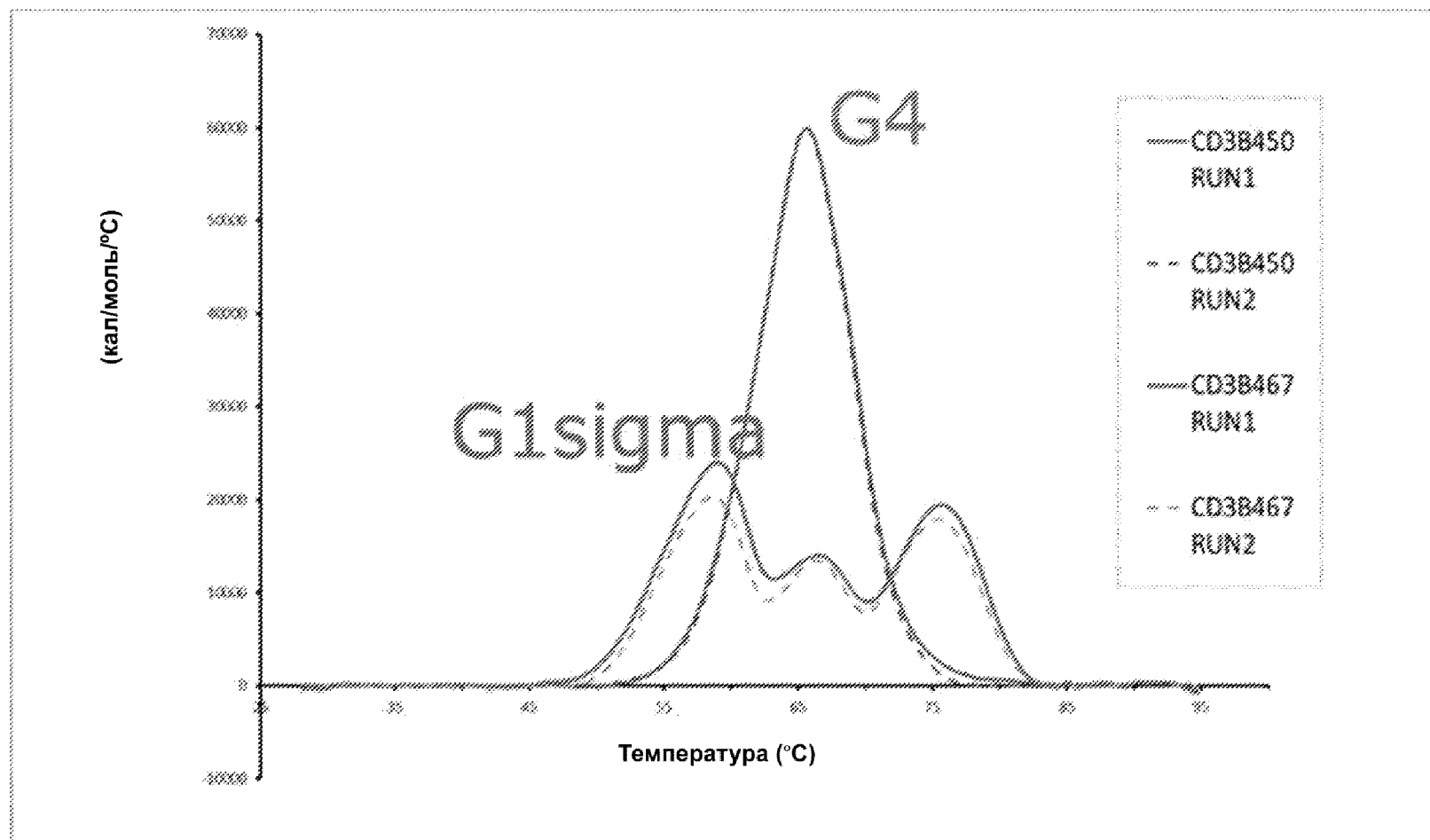
Фиг. 12Е



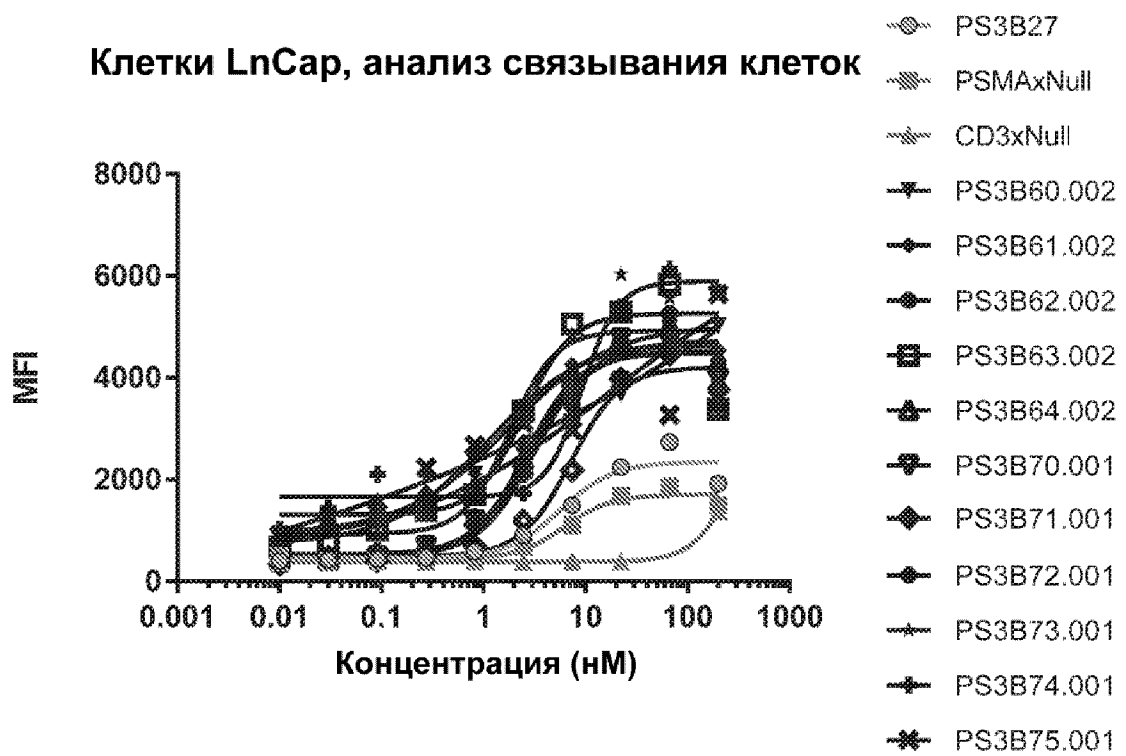
Фиг. 13А



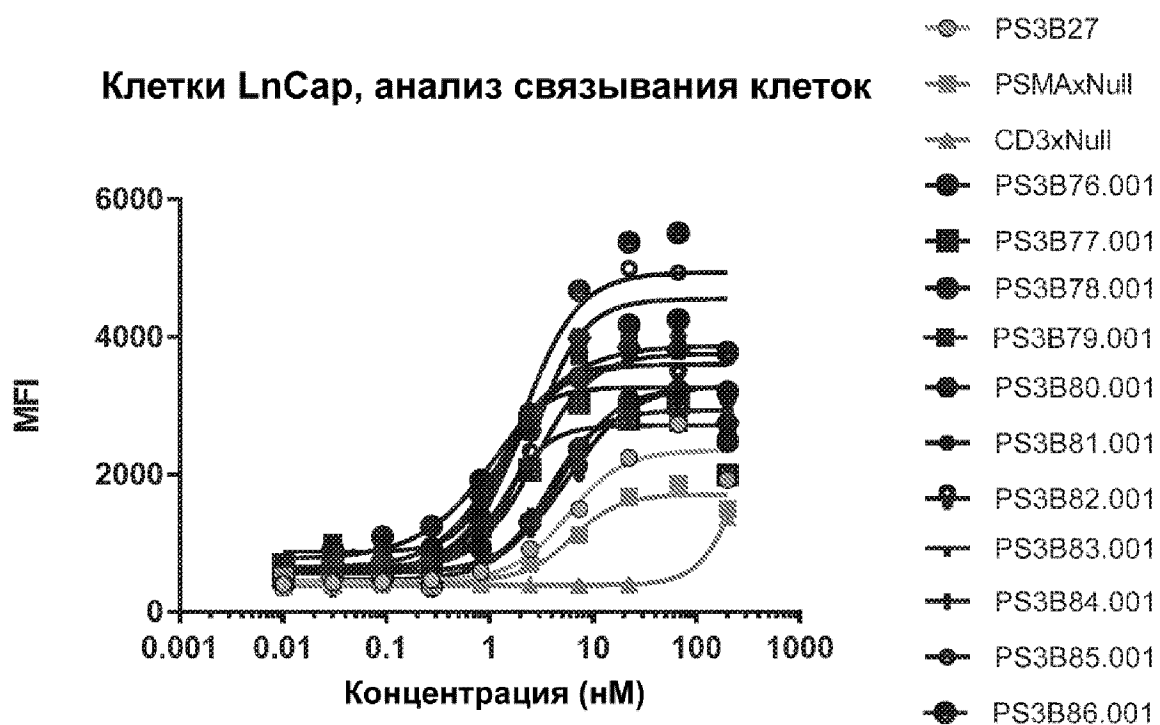
Фиг. 13В



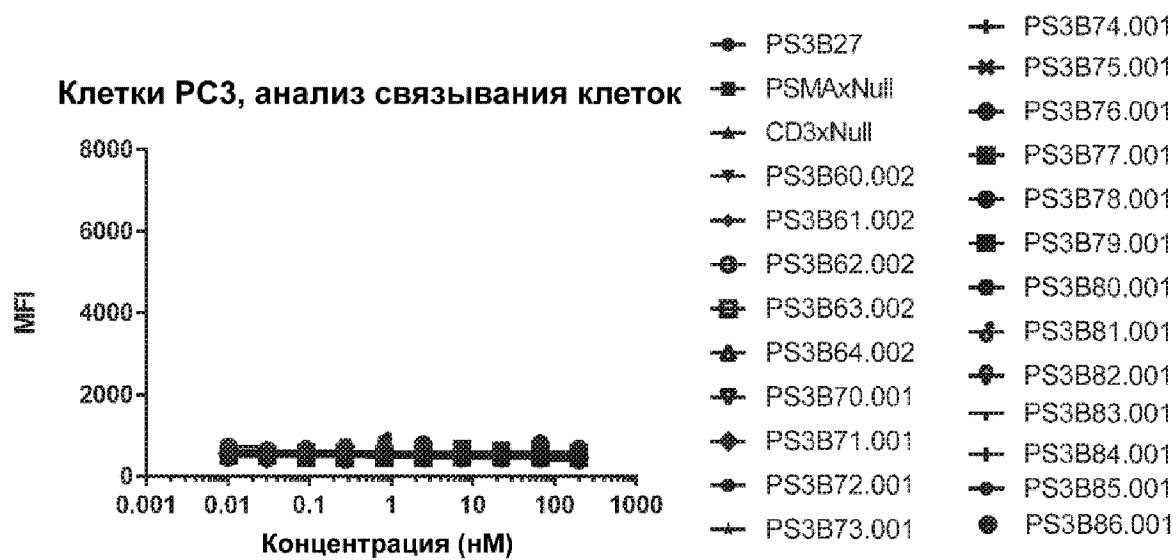
Фиг. 14



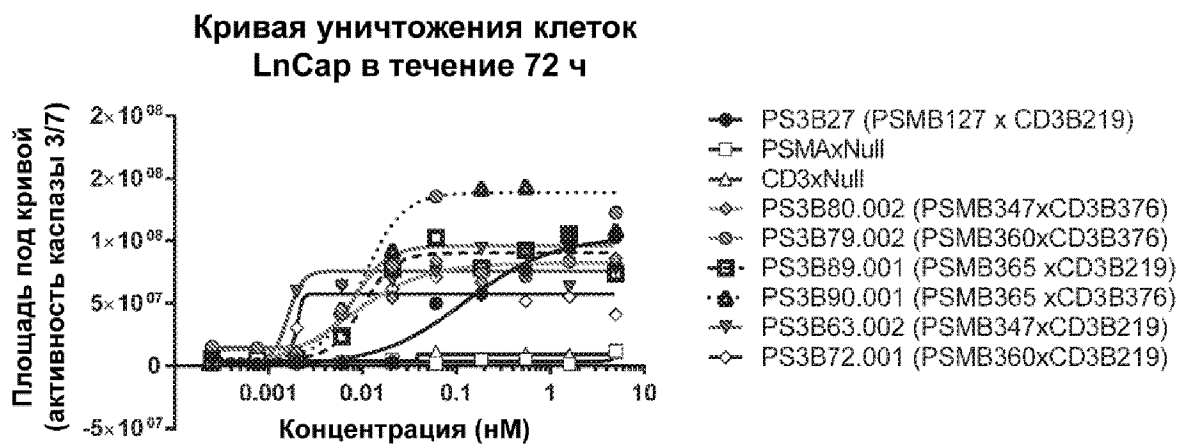
Фиг. 15



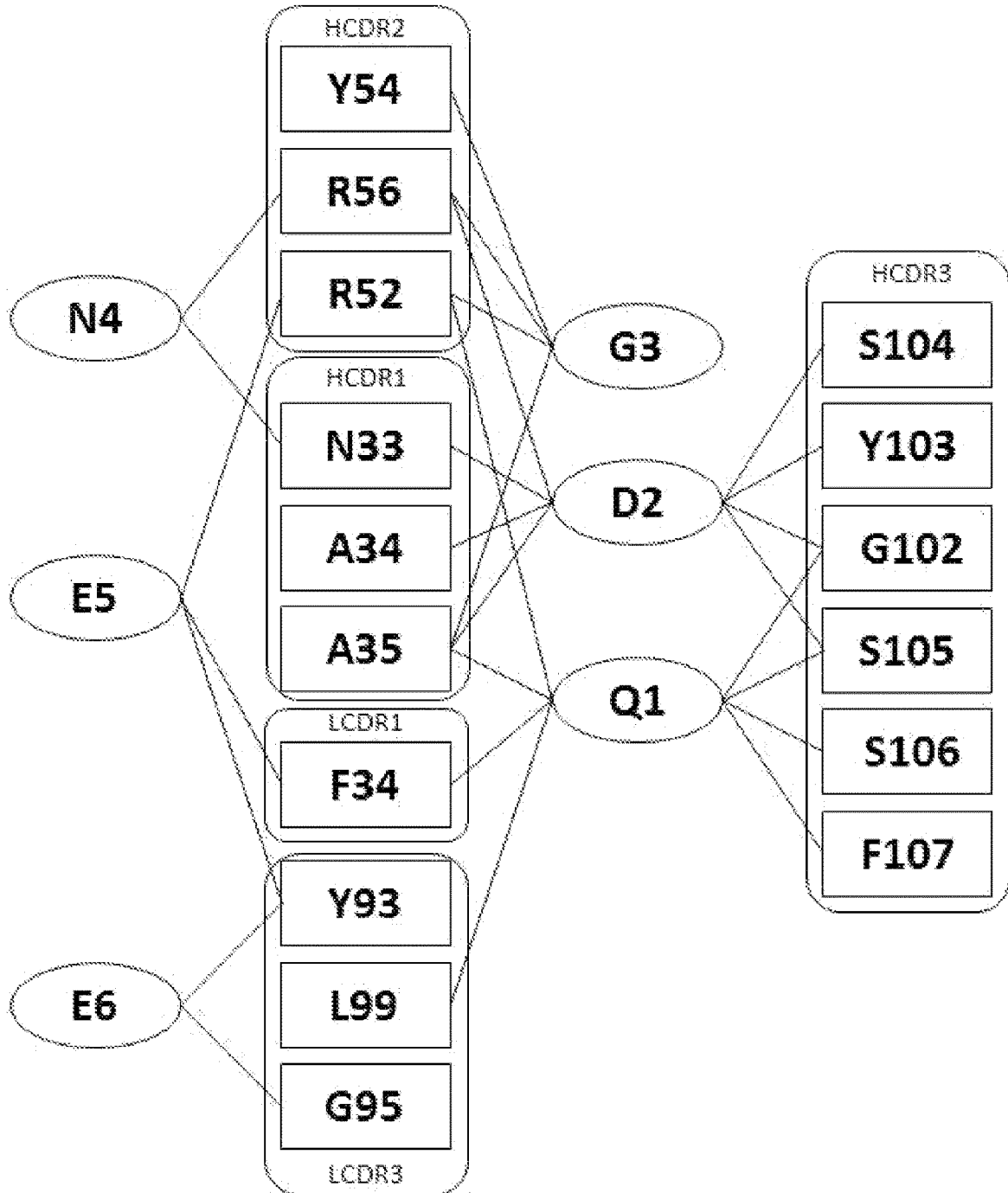
Фиг. 16



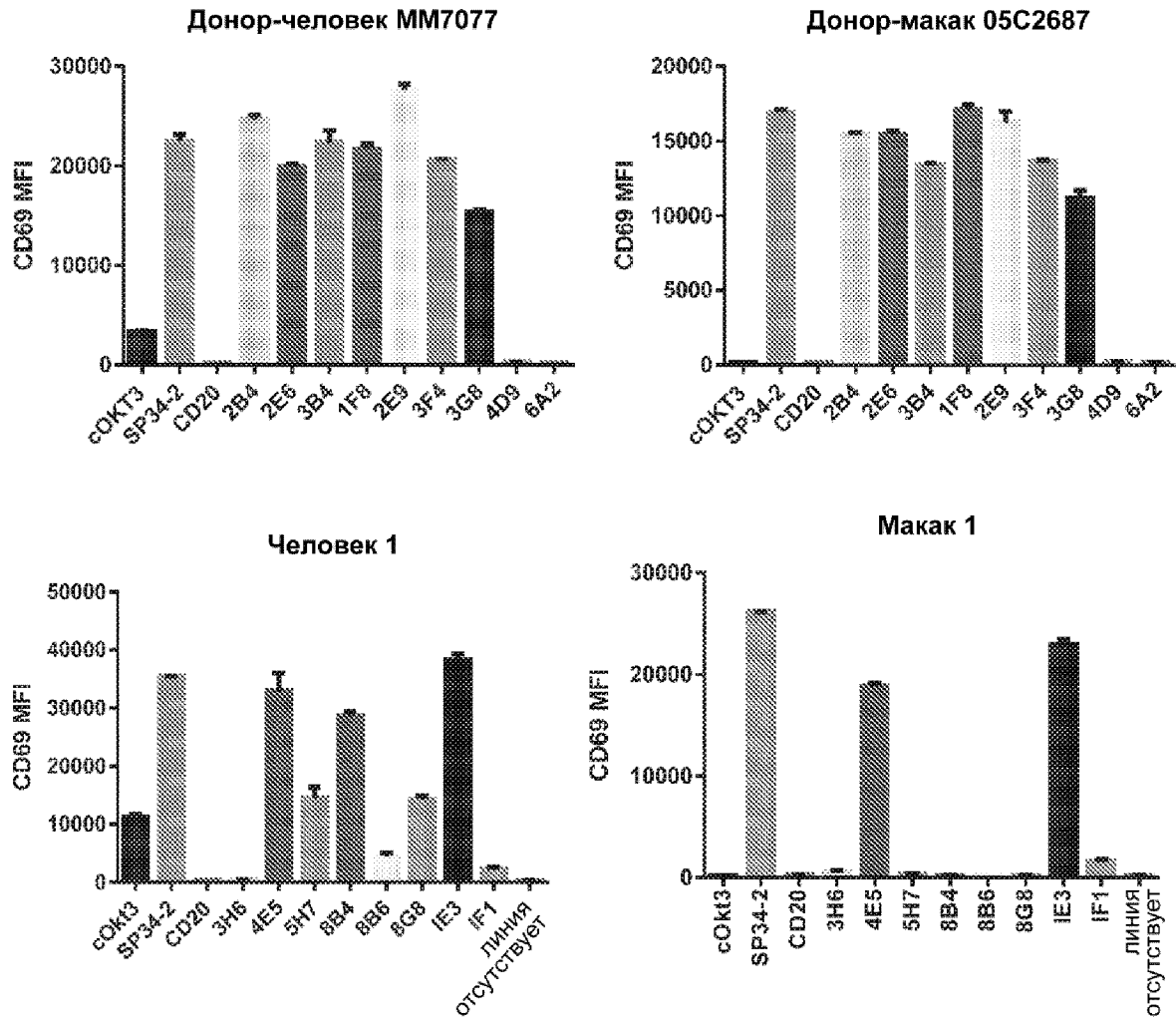
Фиг. 17



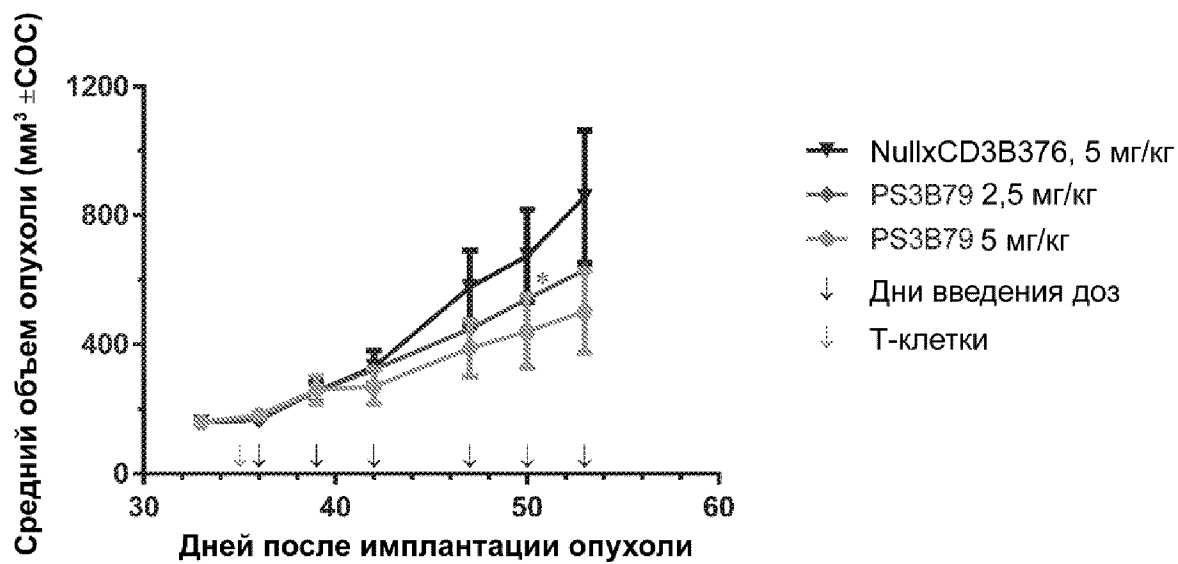
Фиг. 19



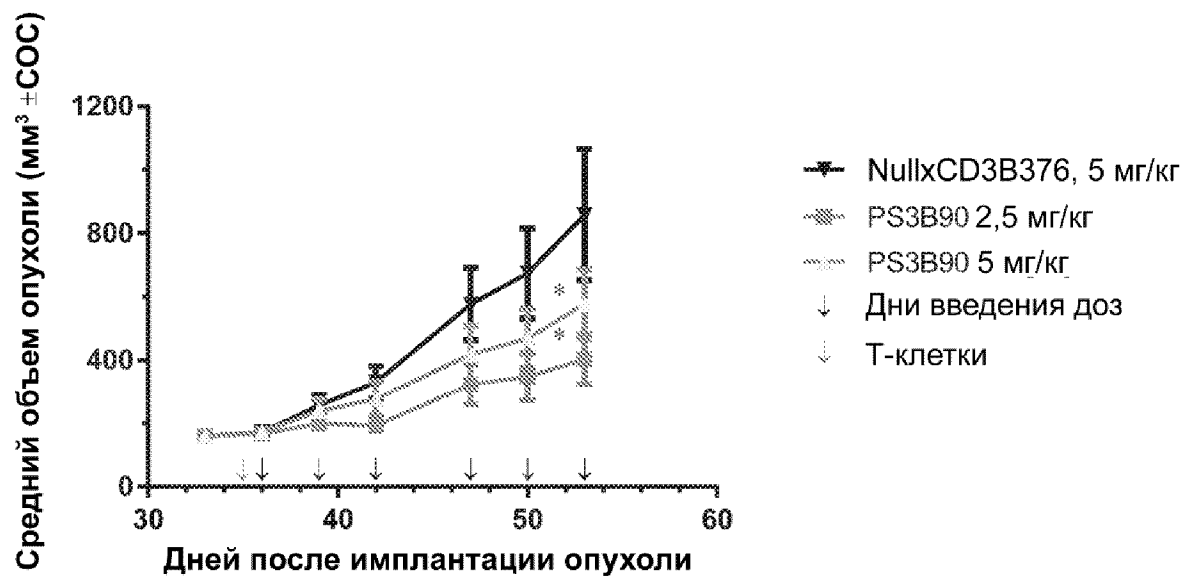
Фиг. 20



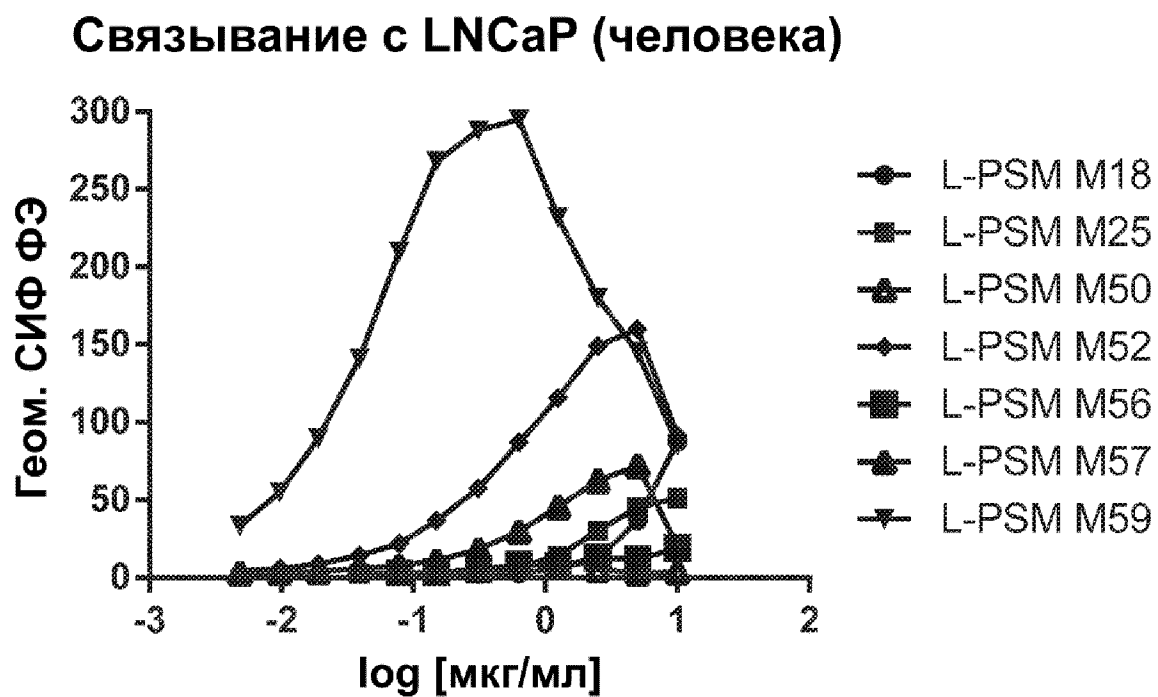
Фиг. 21



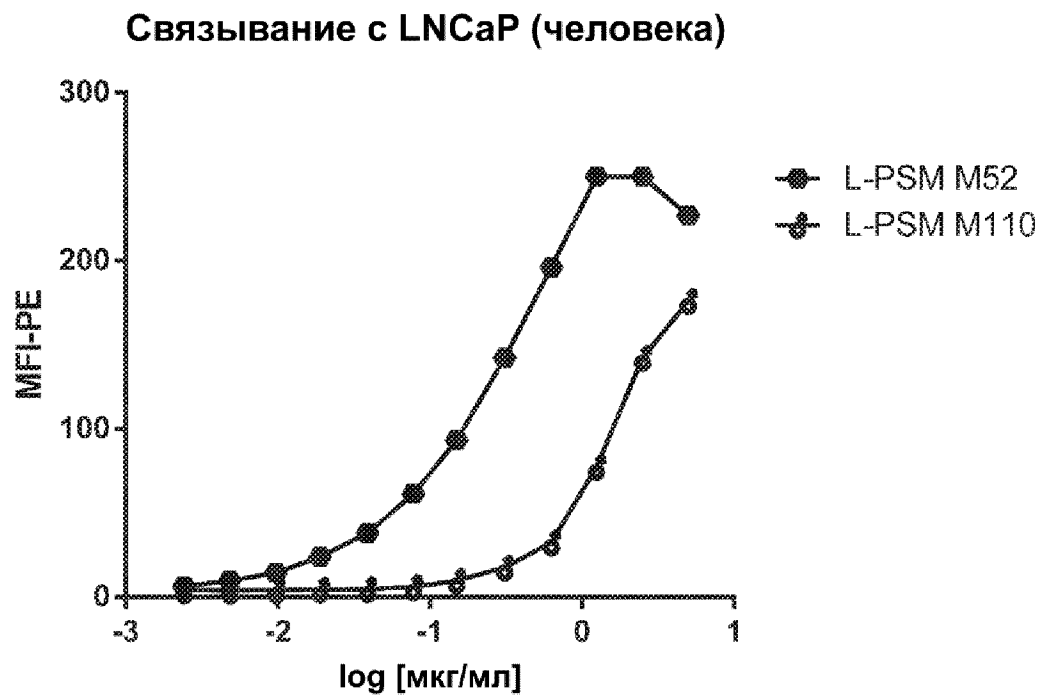
Фиг. 22



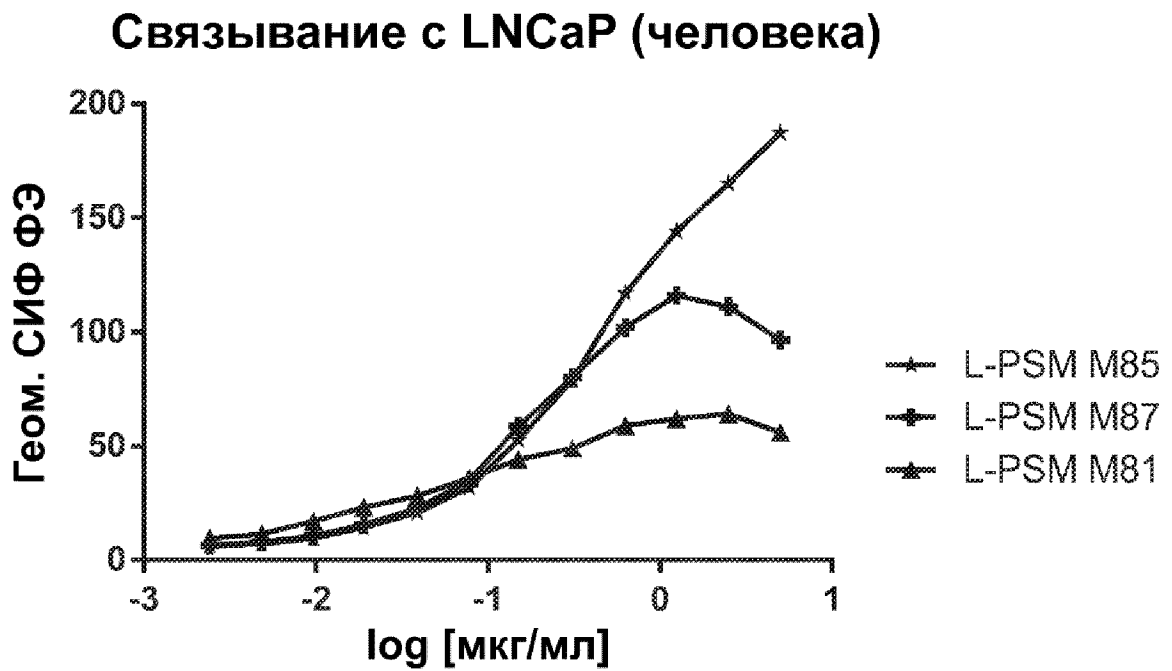
Фиг. 23А



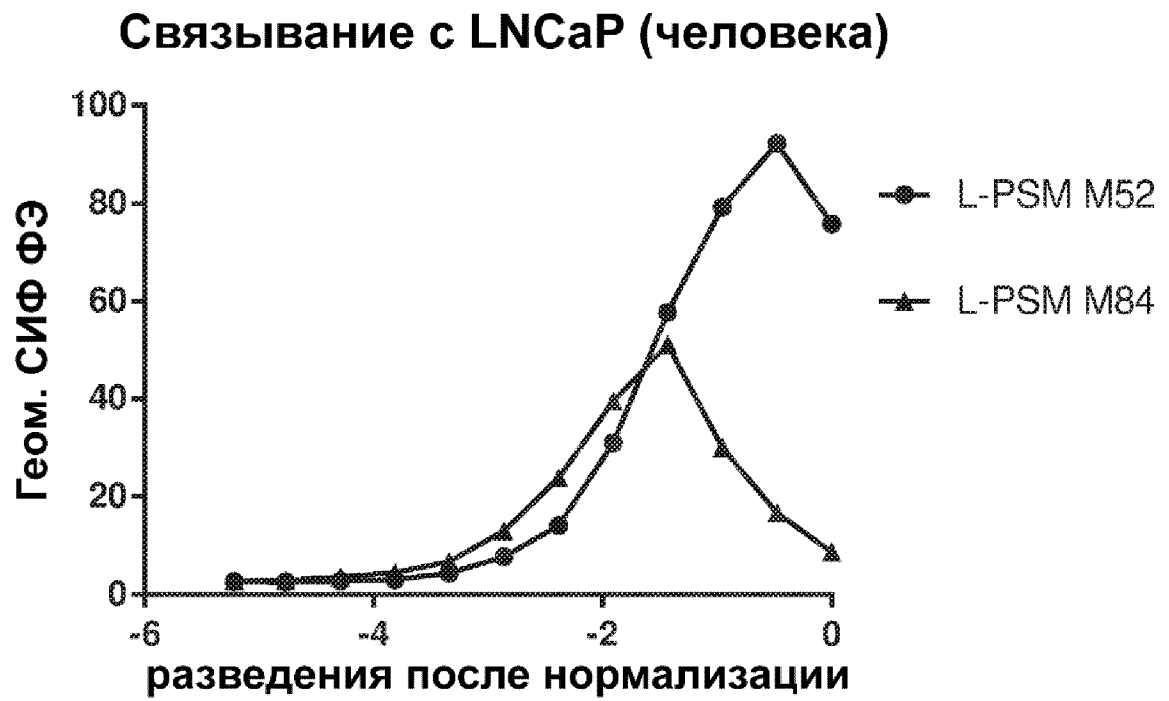
Фиг. 23В



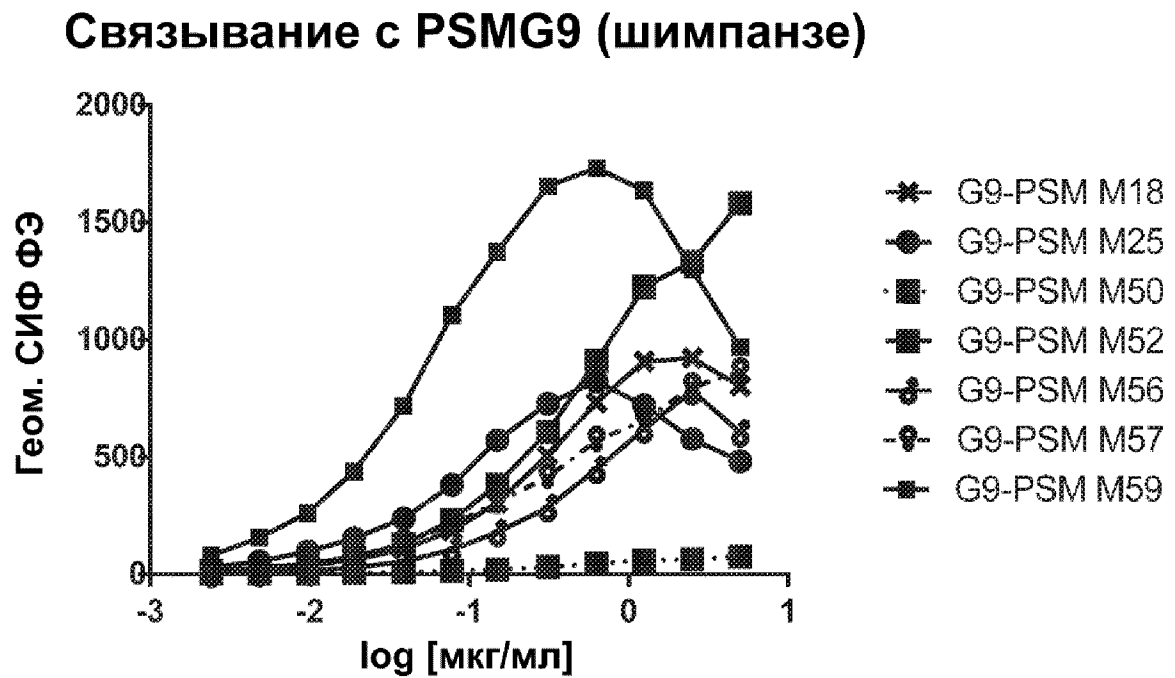
Фиг. 23С



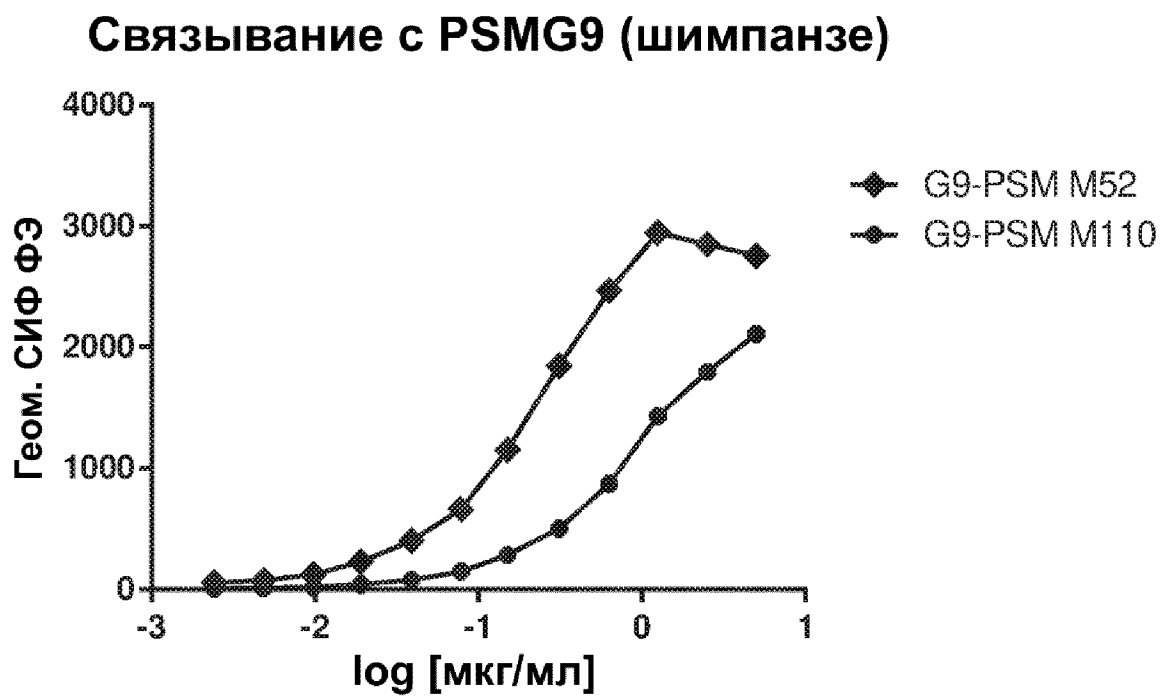
Фиг. 23D



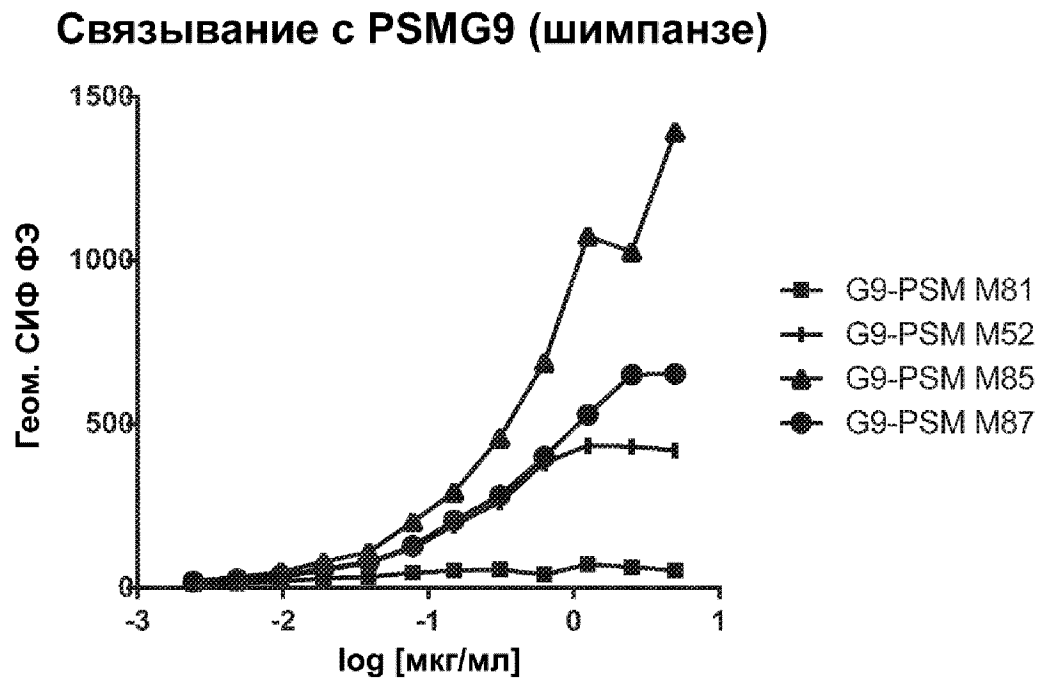
Фиг. 24А



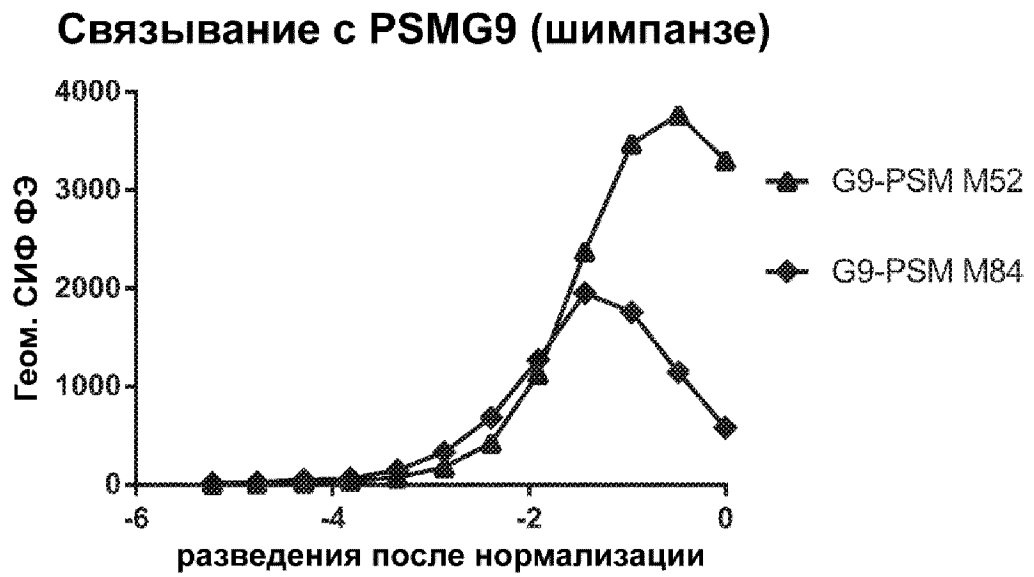
Фиг. 24В



Фиг. 24С

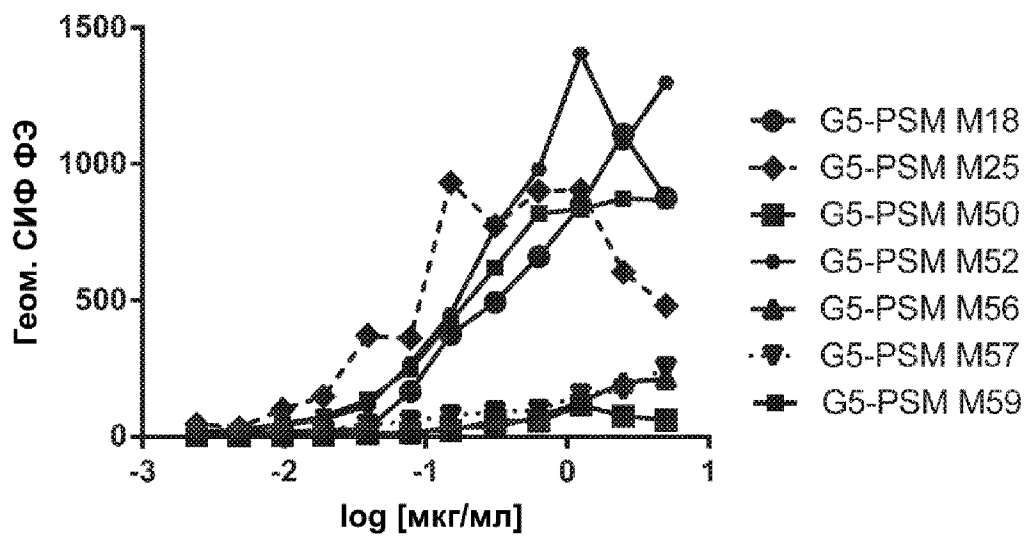


Фиг. 24D

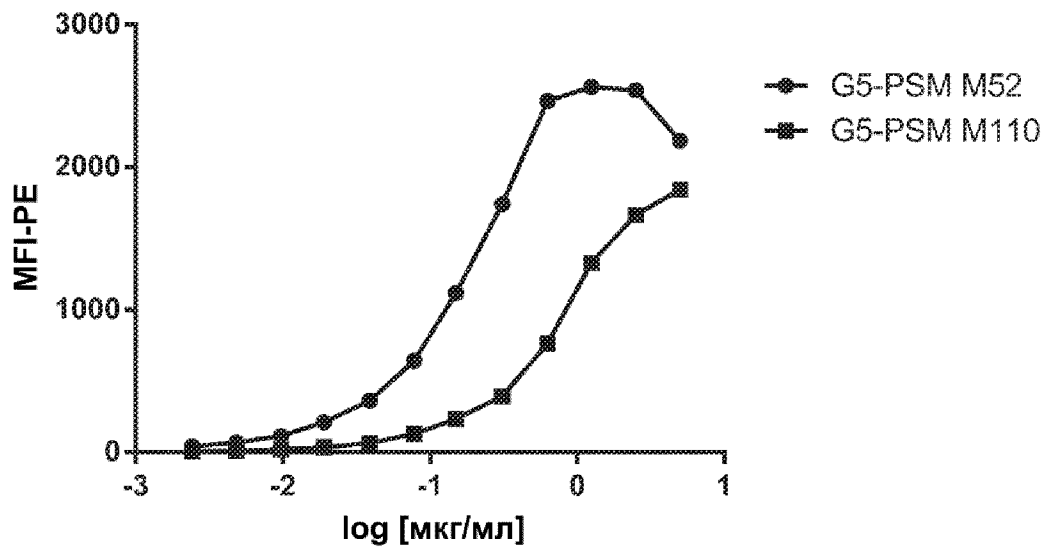


Фиг. 25А

Связывание с PSMG5 (яванского макака)

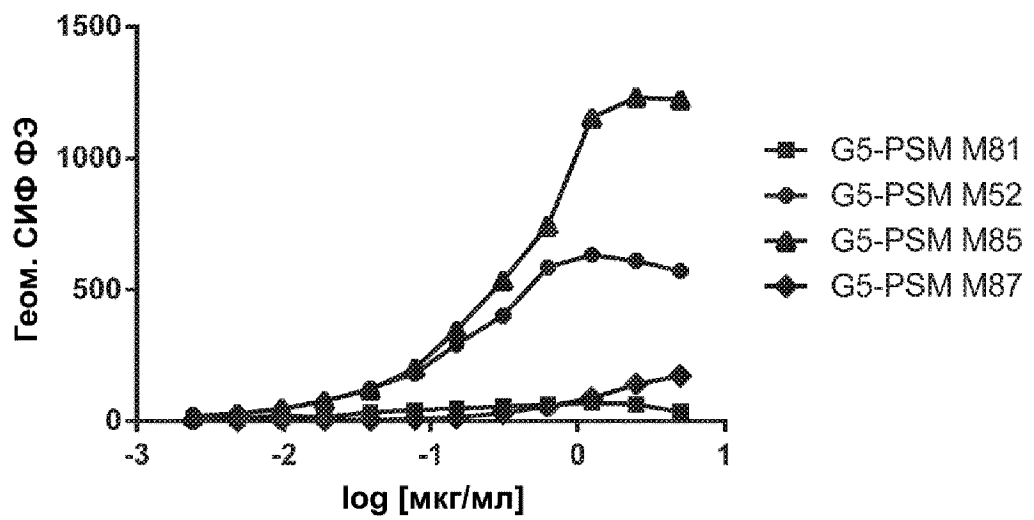


Фиг. 25В

Связывание с PSMG5 (яванского макака)

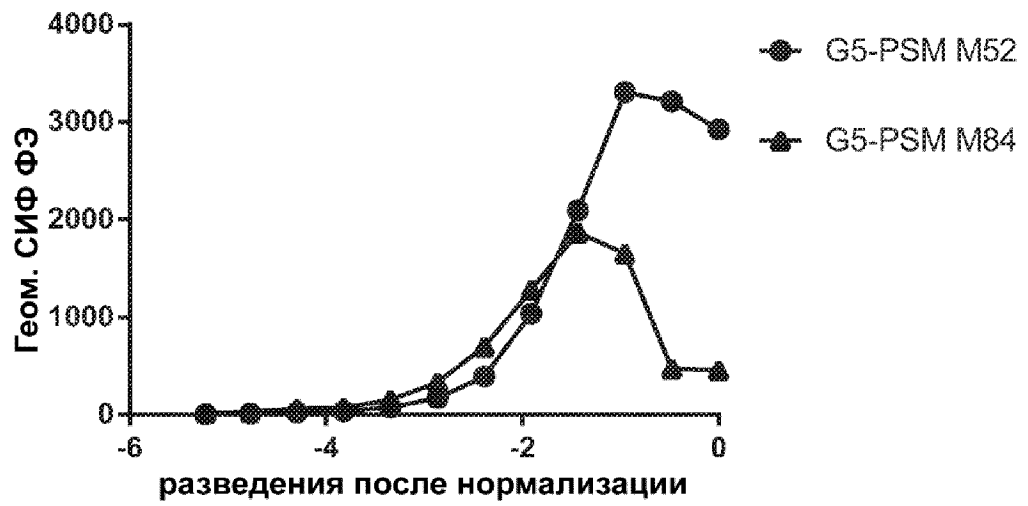
Фиг. 25С

Связывание с PSMG5 (яванского макака)



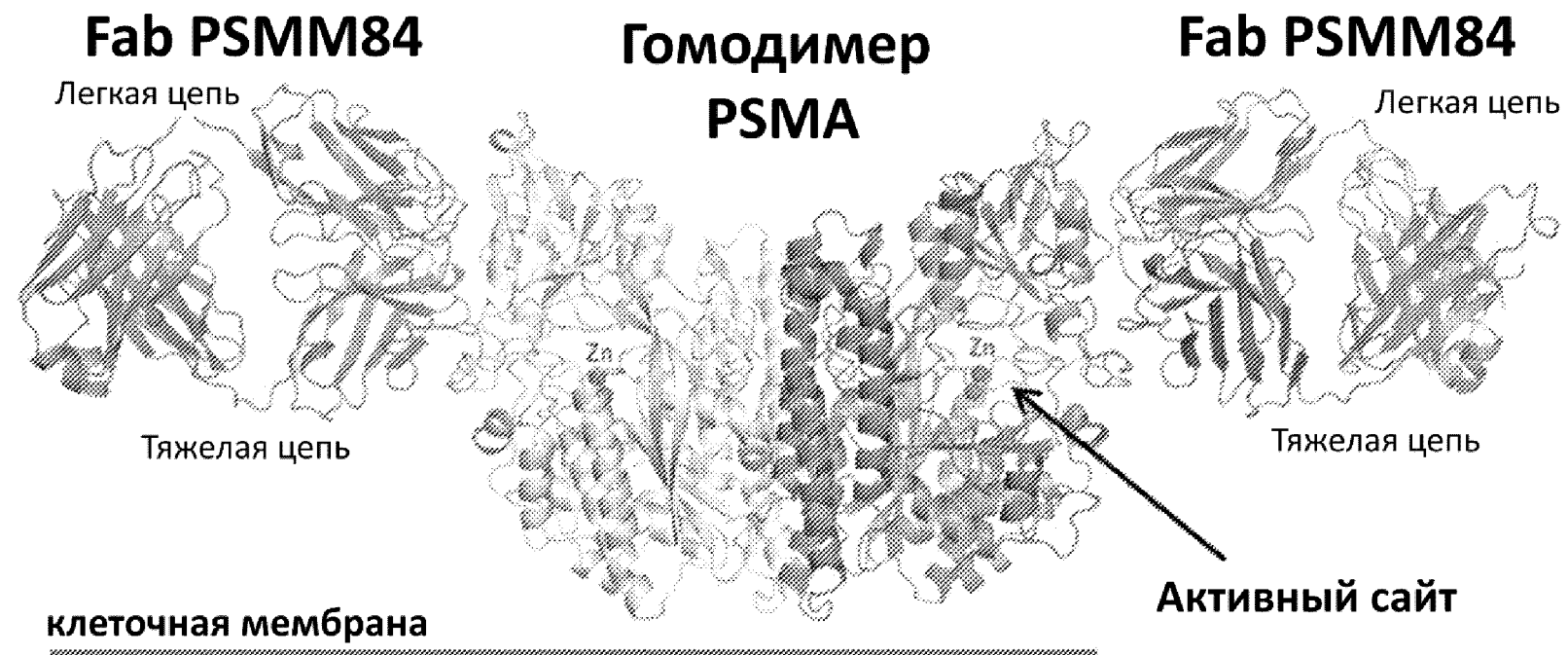
Фиг. 25D

Связывание с PSMG5 (яванского макака)

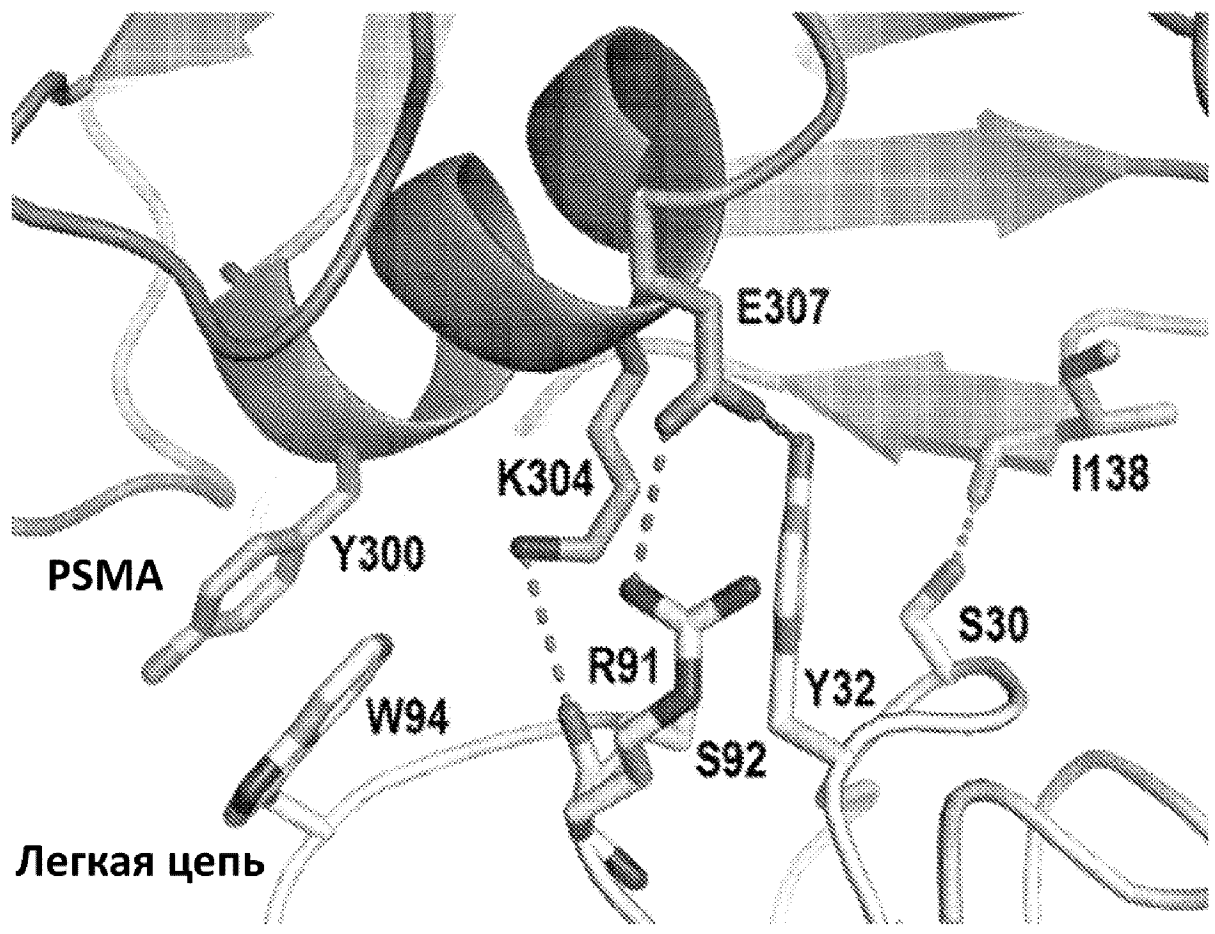


Фиг. 26

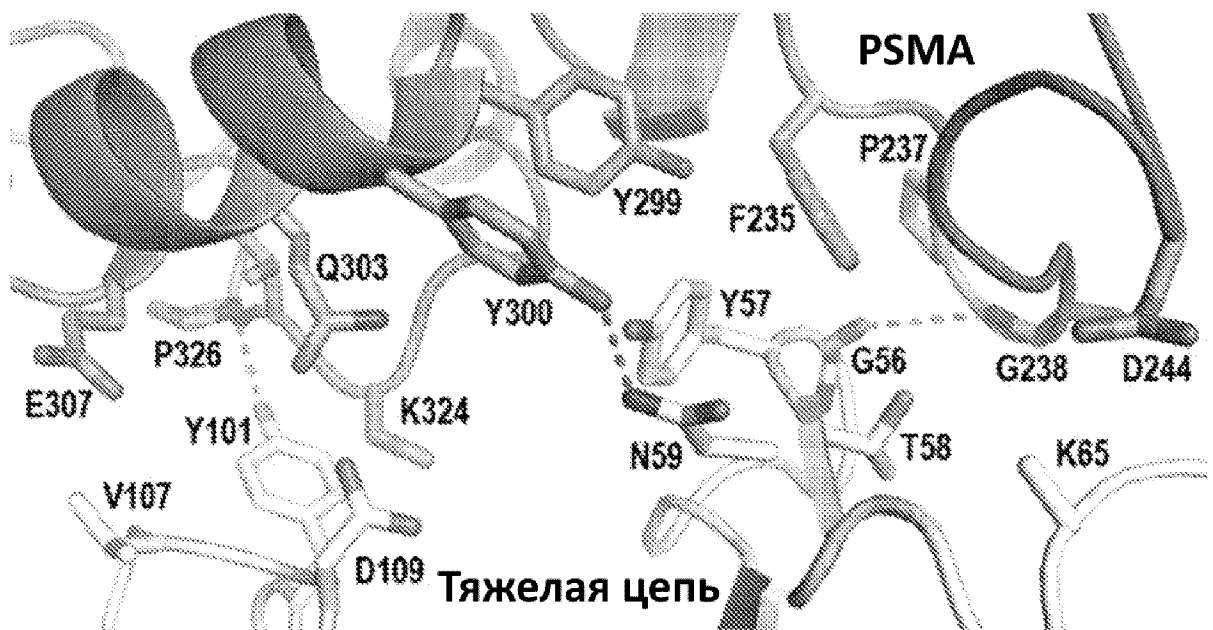
Общая структура Fab PSMM84, связанного с PSMA



Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29

Остатки эпитопа PSMM84

PSMA человека	(1)	MWNLLHETDSAVATARRRRLWCAGALVLAG-GFFLLGFLFGWFIKSSNEAT-NITPKHNMKAFLEDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQL
PSMA мыши	(1)	MWNALQDRD SAEVLGHRQRWLRVGLVLTAL TGTFLLIGFLFGWFIRPSNEATGNVSHSGMKKEFLHELKAENIKKFLYNFTRTPHLAGTQNNFEL
PSMA яванского макака	(1)	MWNLLHETDSAVATARRRRLWCAGALVLAG-GFFLLGFLFGWFIKSSSEAT-NITPKHNMKAFLEDELKAENIKKFLHNFTQIPHLAGTEQNFQL
PSMA человека	(93)	AKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYFNKTHPNYISIIINEDGNE EFNTSLFE PPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFF
PSMA мыши	(95)	AKQIHDQWKEFGLDLVELSHYDVLLSYFNKTHPNYISIIINEDGNE EFKTSLSE QPPPPGYENISDVVPPYSAFSPQGTPEGDLVYVNYARTEDFF
PSMA яванского макака	(93)	AKQIQSQWKEFGLDSVELTHYDVLLSYFNKTHPNYISIIINEDGNE EFNTSLFE PPPPAGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFF
PSMA человека	(187)	KLERDMKINCSGKIVIARYGKVFGRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADY FAFGVKSYPD GWNLPGGGVQQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYR
PSMA мыши	(189)	KLEREMKISCSGKIVIARYGKVFGRNMVKNNAQLAGAKGMILYSDPADY FVFAVKSYPD GWNLPGGGVQQRGNVNLNLNGAGDPLTPGYPANEHAYR
PSMA яванского макака	(187)	KLERDMKINCSGKIVIARYGKVFGRGNKVKNAQLAGATGVILYSDPDDY FAFGVKSYPD GWNLPGGGVQQRGNILNLNLNGAGDPLTPGYPANEYAYR
PSMA человека	(281)	RGIAEAVGLPSIPVHPIGY YDAQKLL EKMGGSPAPPDSSWRGSLK VY YVNGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA мыши	(283)	HELTNAVGLPSIPVHPIGY YDAQKLL EHMGGPAPPDSSWKGLK VY YVNGPGFAGNFSTQKVKMHIHSYTKVTRIYNVIGTLKGALEPDRYVIL
PSMA яванского макака	(281)	RGMAEAVGLPSIPVHPIGY YDAQKLL EKMGGSPAPPDSSWRGSLK VY YVNGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTSEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVIL
PSMA человека	(375)	GGH RD SWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRP RR TILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRL LQ ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP
PSMA мыши	(377)	GGH RD AWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLK KK GRRP RR TILFASWDAEEFGLLGSTEWAE EH SRL LQ ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP
PSMA яванского макака	(375)	GGH RD SWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFG ML KKEGWRP RR TILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRL LQ ERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTP
PSMA человека	(469)	LMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EF SGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNK F SGYPLYHSVYET Y ELV
PSMA мыши	(471)	LMYSLVYNLTKELQSPDEGFEGKSLYDSWKEKSPSP EF IGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKN W TNKVSSYPLYHSVYET Y ELV
PSMA яванского макака	(469)	LMYSLVYNLTKEL ES PDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EF SGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNW E TNK F SSYPLYHSVYET Y ELV
PSMA человека	(563)	EKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFE LANSIVL PFDCRDYAVVLRKYADKIYISIMKHPQEMKTYSVSFD S LFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKS
PSMA мыши	(565)	VKFYDPTFKYRLTVAQVRGAMVFE LANSIVL PFDCQSYAVALK KY ADTIYINISMKHPQEMKAYMISFD S LFSAVNNFTDVASKFNQRLQELDKS
PSMA яванского макака	(563)	EKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFE LANSVVL PFDCRDYAVVLRKYADKIYINISMKHPQEMKTYSVSFD S LFSAVKNFTEIASKFSERL R DFDKS
PSMA человека	(657)	NP IV LRRMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIE SK VDPSSKAWGEVVKRQIYVA AF TVQAA AE TLSEVA
PSMA мыши	(659)	NP ILL RIMNDQLMYLERAFIDPLGLPGRPFYRHIIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDI SS SKVNASKAWNEVVKRQISIA T FTVQAA AE TLREVA
PSMA яванского макака	(657)	NP ILL RRMNDQLMFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDI ES SKVDPSSQAWGEVVKRQISIA T FTVQAA AE TLSEVA

Остатки эпитопа заштрихованы. Дивергенция последовательностей показана подчеркиванием.

Фиг. 30

Остатки паратопа PSMM84

Паратоп PSMM84

PSMM84_HC (1) EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFKSDAMHWVRQAPGKLEWVSEISGSGGYTNYADSVKGRFTISRDNISK

PSMM84_HC (77) NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSYDSSLYVCDYEDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL

PSMM84_HC (153) VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTRKVDKKVEPKSC

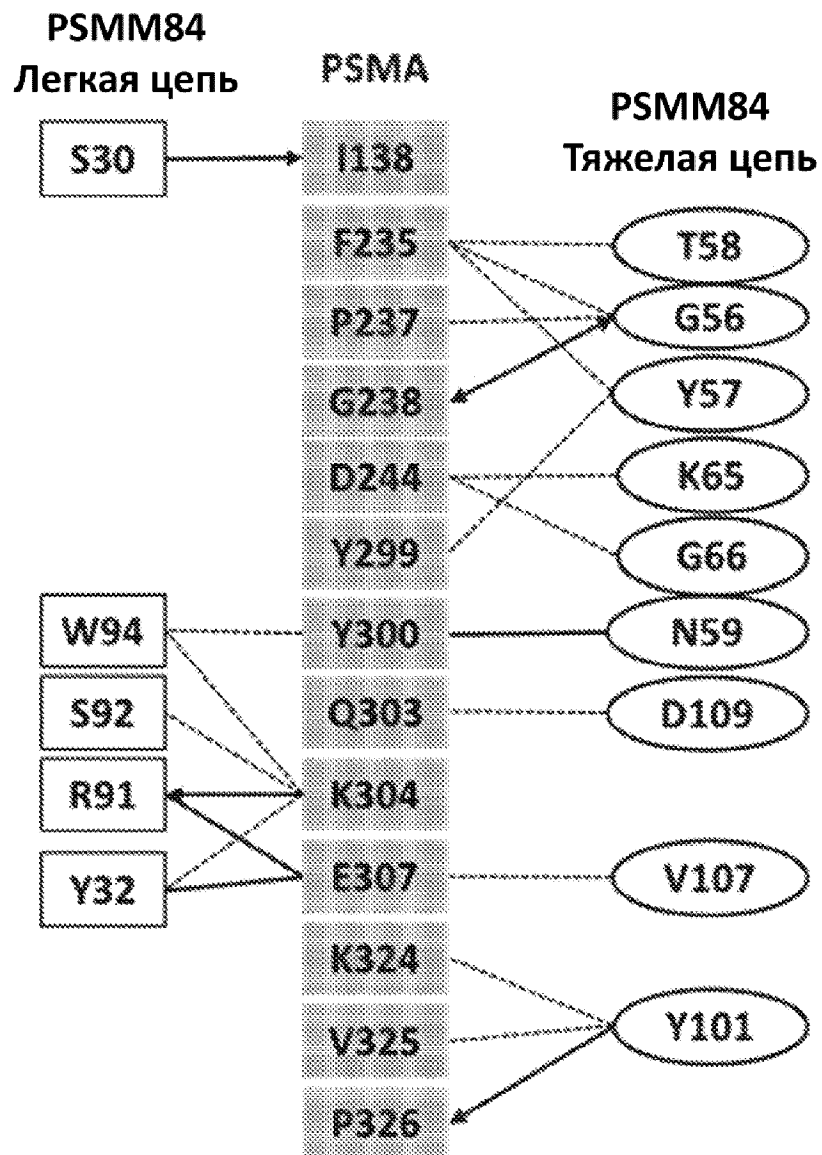
PSMM84_LC (1) EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLLAWYQOKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSDFT

PSMM84_LC (73) LTISSELEPEDFAVYYCQORSNWPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

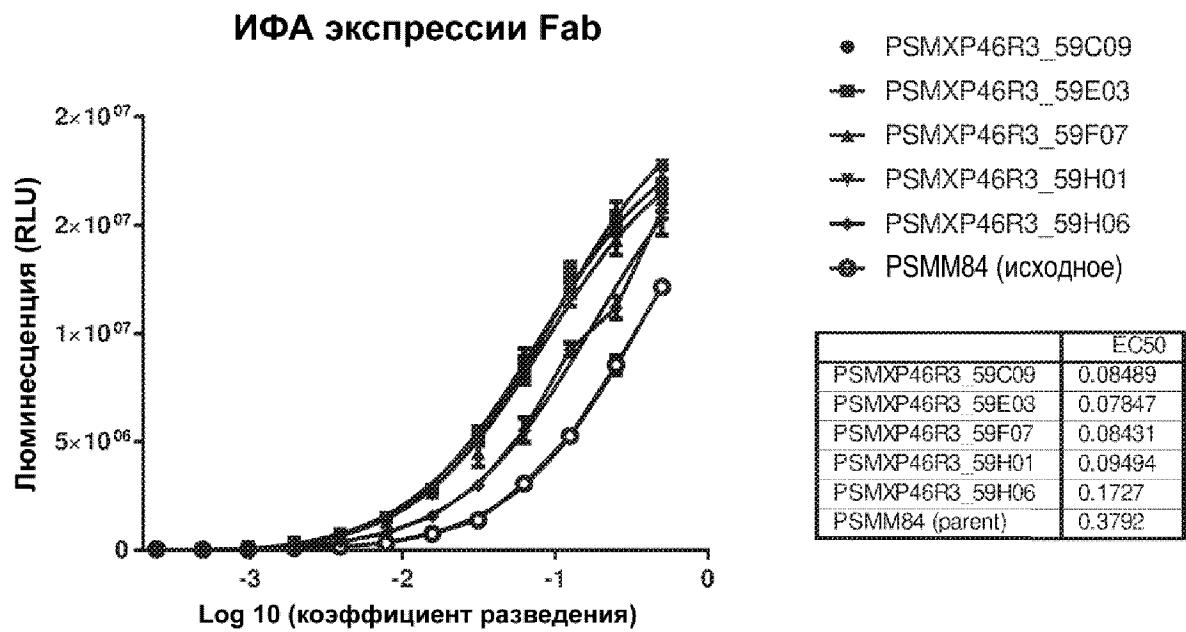
PSMM84_LC (145) KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Области CDR подчеркнуты, остатки паратопа заштрихованы.

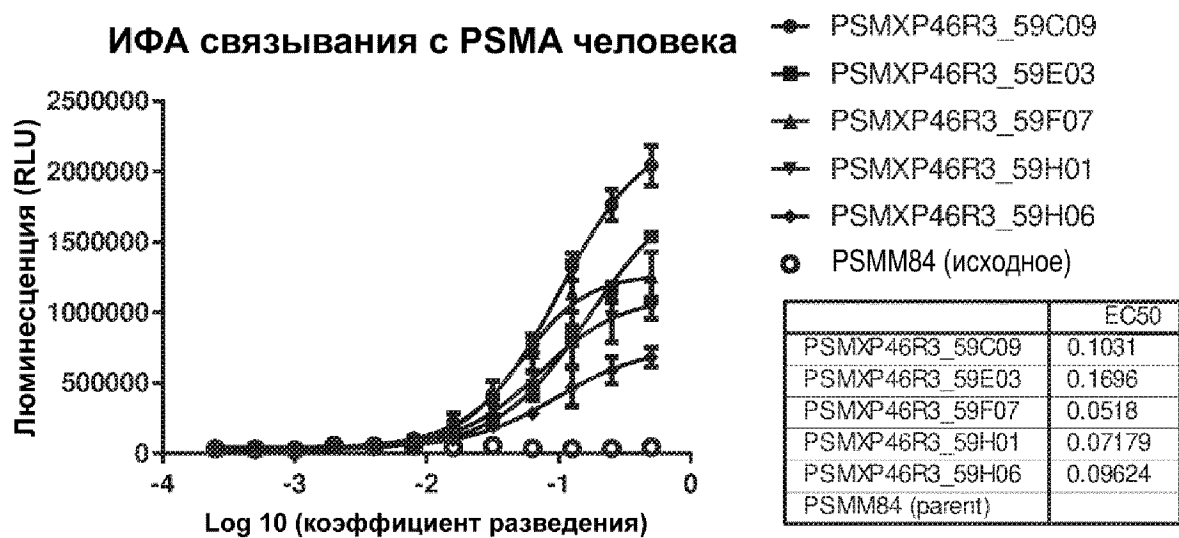
Фиг. 31



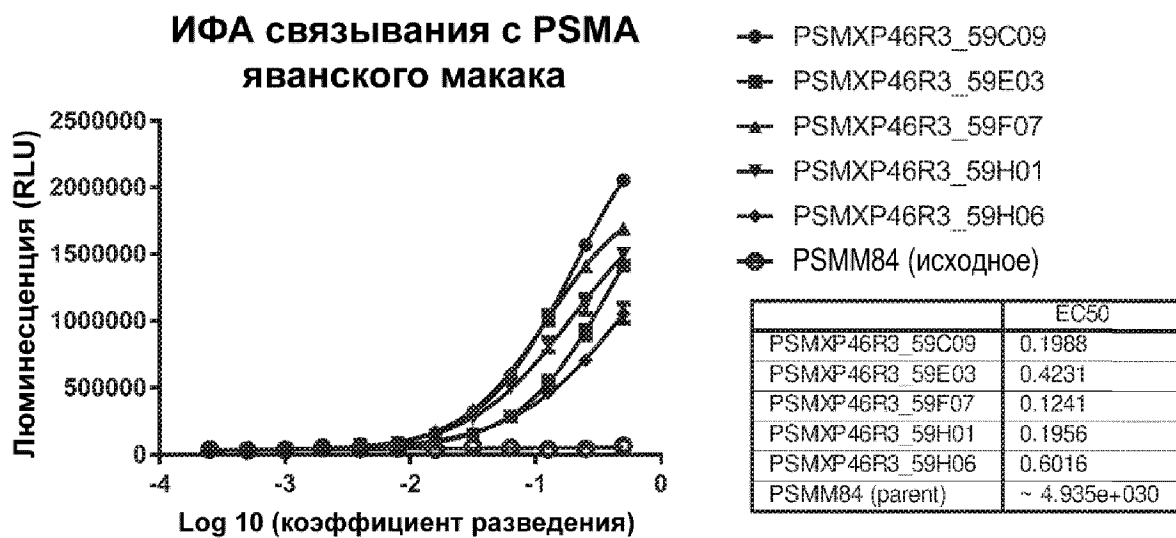
Фиг. 32



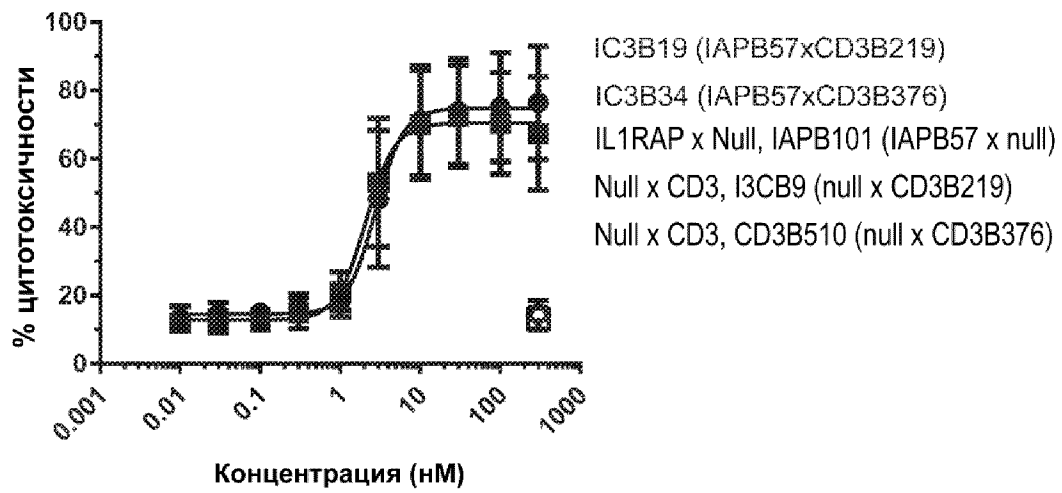
Фиг. 33



Фиг. 34

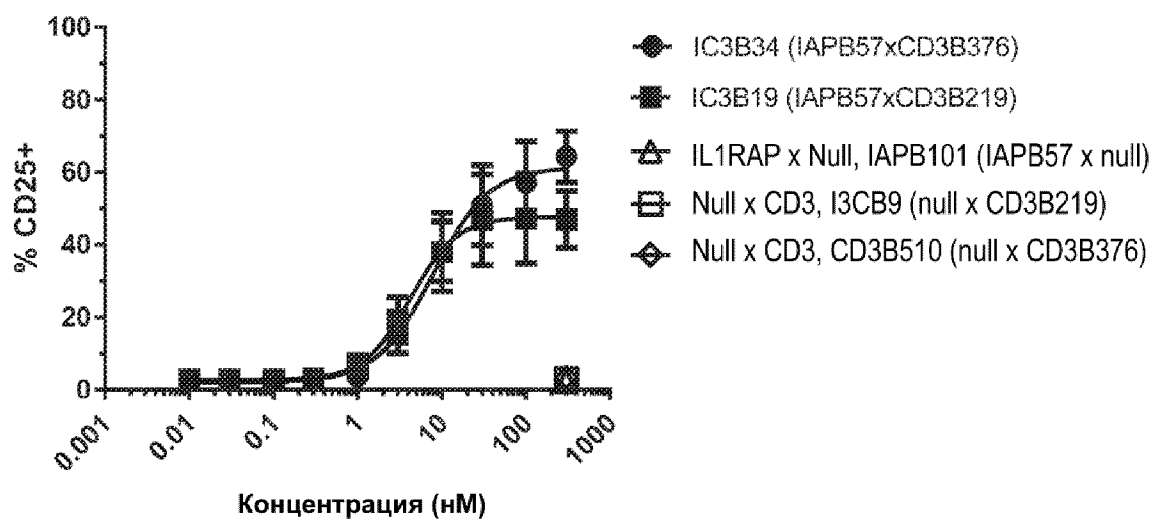


Фиг. 35



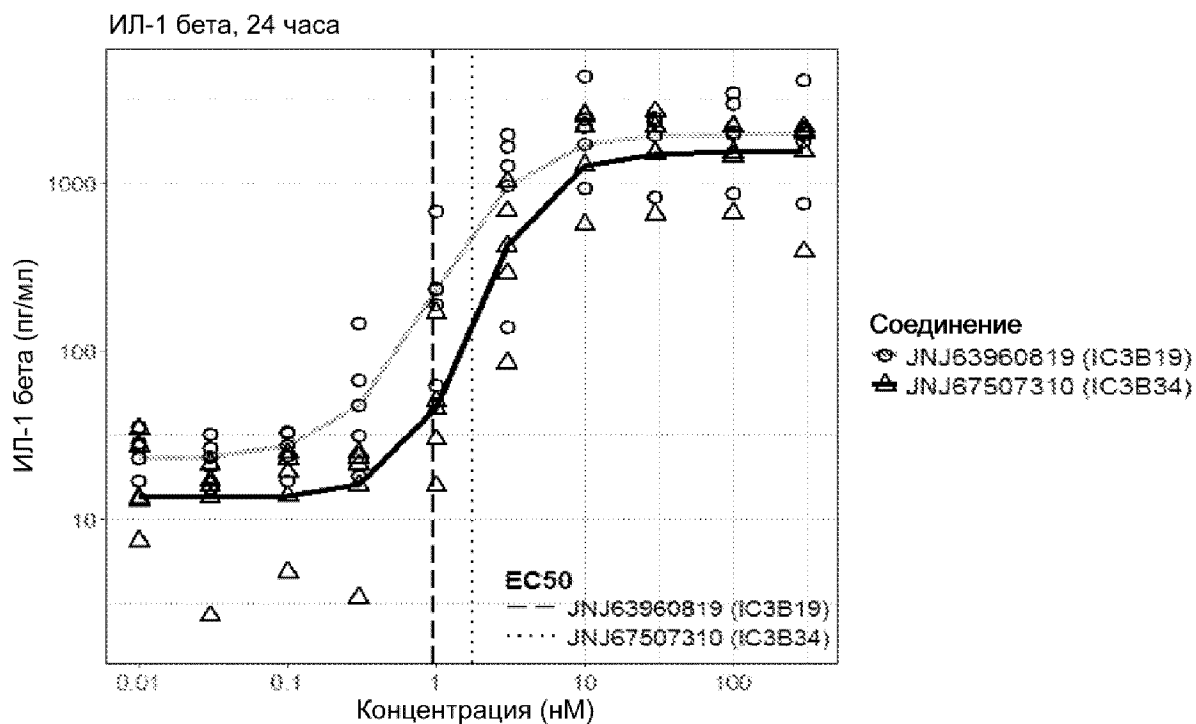
мкМ	0.0100	0.0300	0.1000	0.3000	1.0000	3.0000	10.0000	30.0000	100.0000	300.0000
мкг/мл	0.0015	0.0045	0.0150	0.0450	0.1500	0.4500	1.5000	4.5000	15.0000	45.0000

Фиг. 36



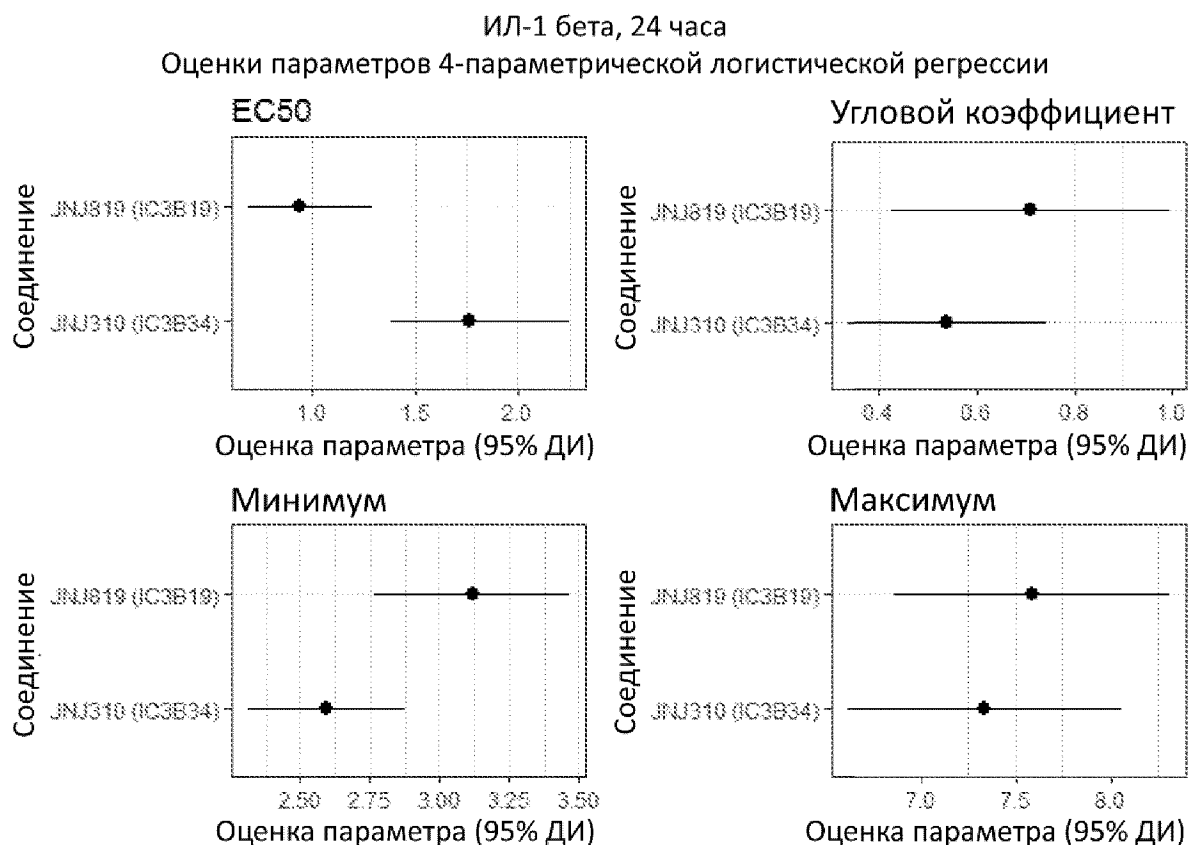
мкМ	0.0100	0.0300	0.1000	0.3000	1.0000	3.0000	10.0000	30.0000	100.0000	300.0000
мкг/мл	0.0015	0.0045	0.0150	0.0450	0.1500	0.4500	1.5000	4.5000	15.0000	45.0000

Фиг. 37А



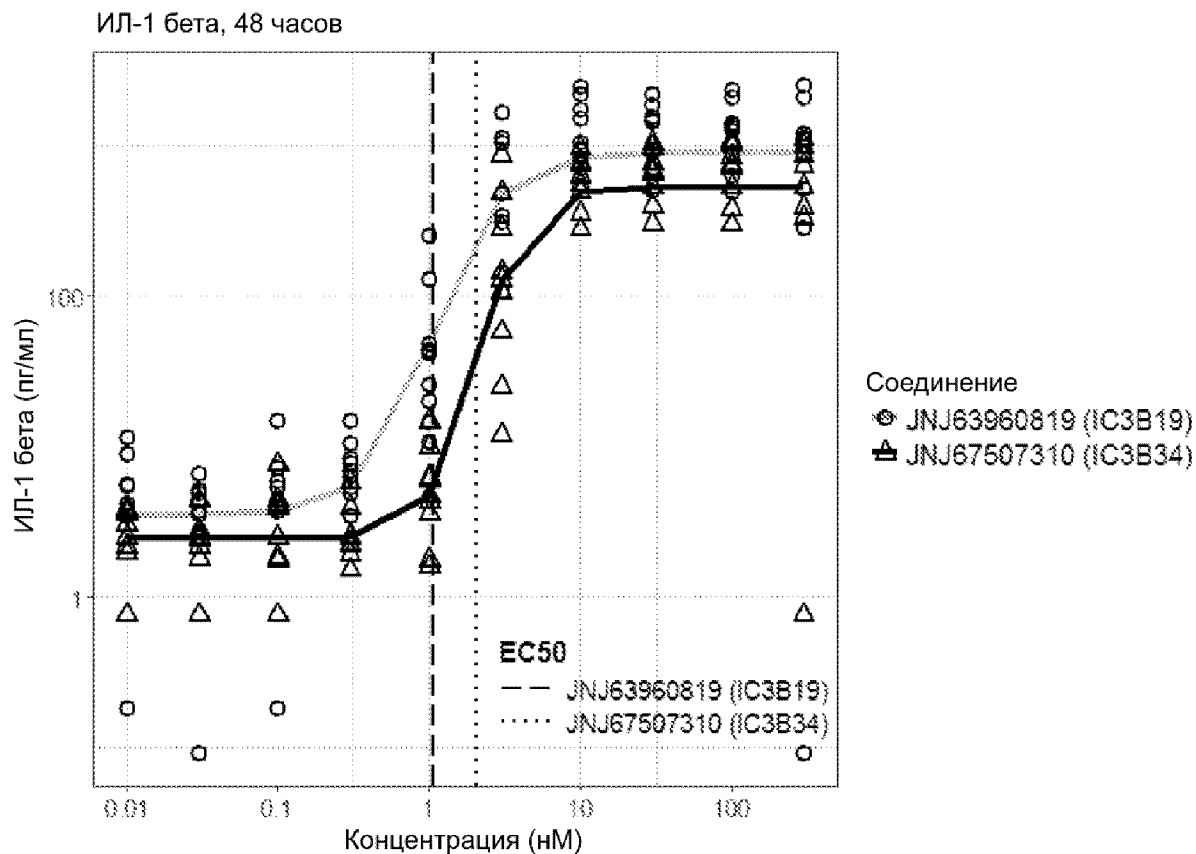
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.414	0.553	0.9439
Разность при 0,03	-0.718	0.553	0.5723
Разность при 0,1	-0.537	0.553	0.8182
Разность при 0,3	-1.227	0.553	0.1172
Разность при 1	-1.547	0.553	0.0281
Разность при 3	-0.875	0.553	0.3817
Разность при 10	-0.248	0.553	0.9983
Разность при 30	-0.164	0.553	0.9999
Разность при 100	-0.348	0.553	0.9797
Разность при 300	-0.281	0.553	0.9955

Фиг. 37В



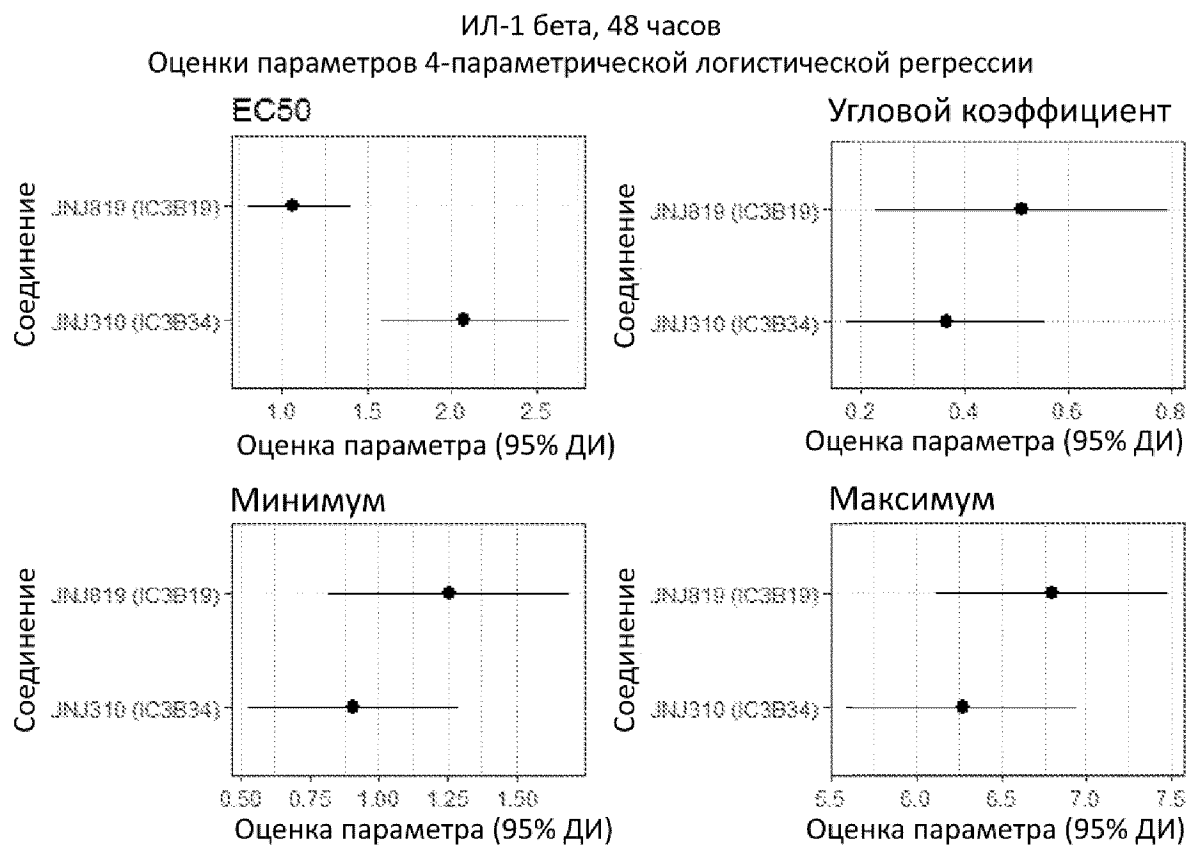
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	0.940 (0.682, 1.295)	1.763 (1.381, 2.252)	0.0027
Углов. коэфф.	0.710 (0.423, 0.996)	0.540 (0.335, 0.744)	0.3046
Минимум	3.119 (2.769, 3.469)	2.592 (2.309, 2.875)	0.0268
Максимум	7.589 (6.865, 8.313)	7.335 (6.613, 8.058)	0.2033

Фиг. 38А



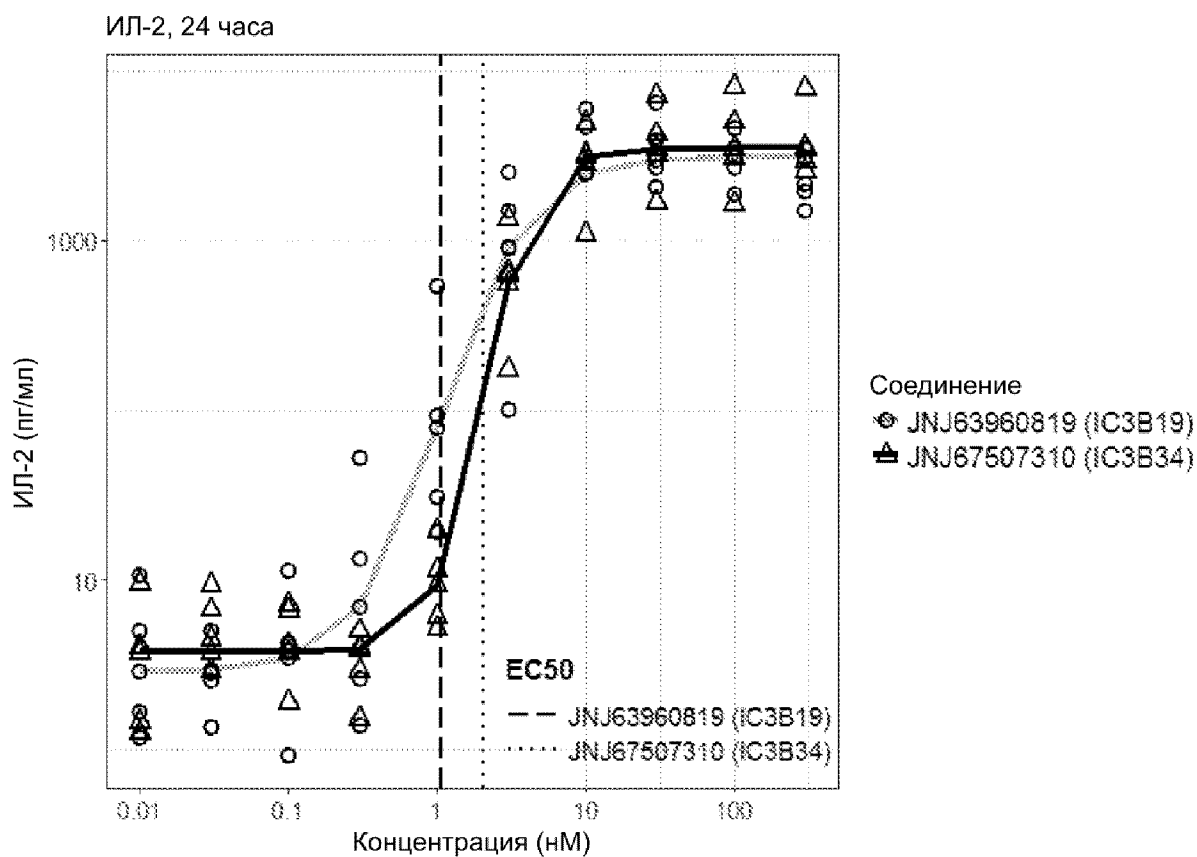
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.431	0.618	0.9976
Разность при 0,03	-0.183	0.618	1.0000
Разность при 0,1	-0.321	0.618	0.9998
Разность при 0,3	-1.020	0.618	0.5913
Разность при 1	-2.105	0.618	0.0064
Разность при 3	-1.508	0.618	0.1255
Разность при 10	-0.806	0.618	0.8424
Разность при 30	-0.624	0.618	0.9635
Разность при 100	-0.556	0.618	0.9834
Разность при 300	-0.049	0.618	1.0000

Фиг. 38В



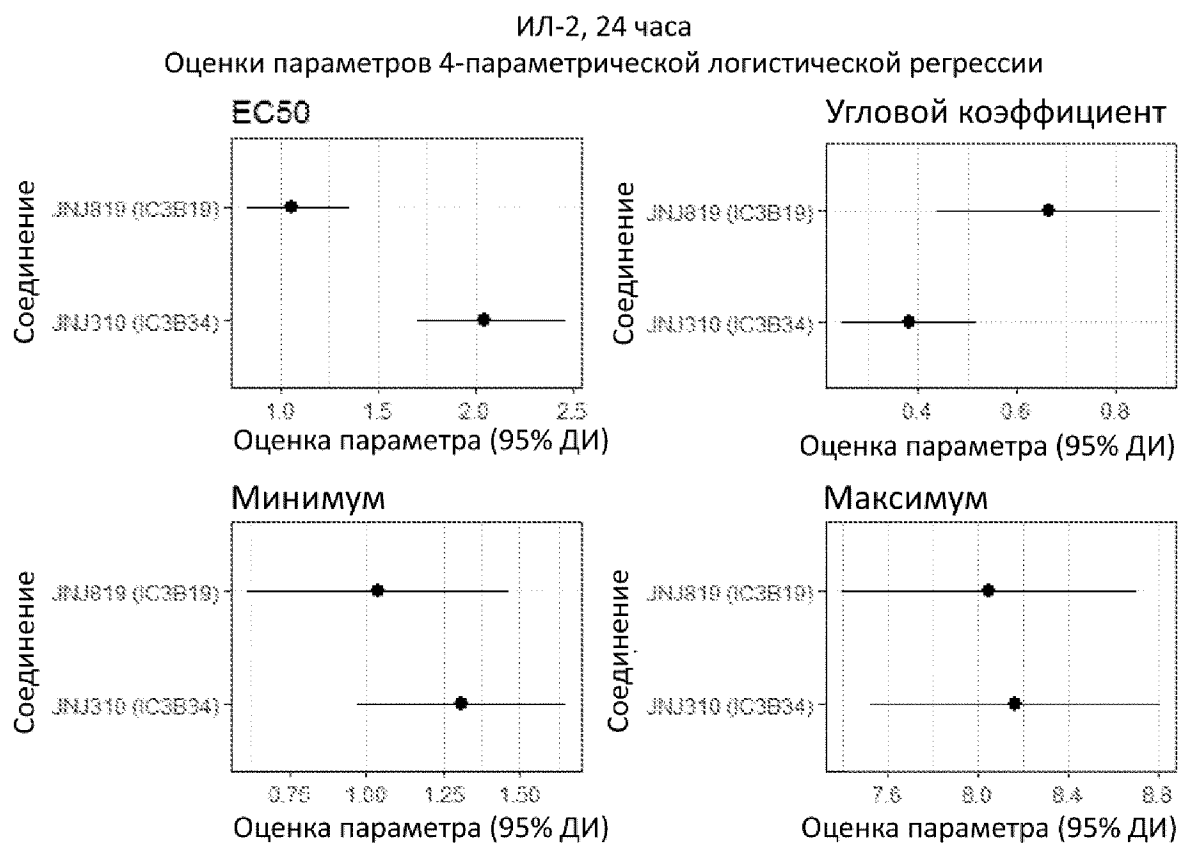
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	1.060 (0.798, 1.408)	2.068 (1.587, 2.695)	0.0010
Углов. коэфф.	0.512 (0.230, 0.794)	0.365 (0.173, 0.557)	0.3951
Минимум	1.254 (0.818, 1.690)	0.905 (0.525, 1.286)	0.2543
Максимум	6.798 (6.117, 7.478)	6.268 (5.589, 6.947)	0.0528

Фиг. 39А



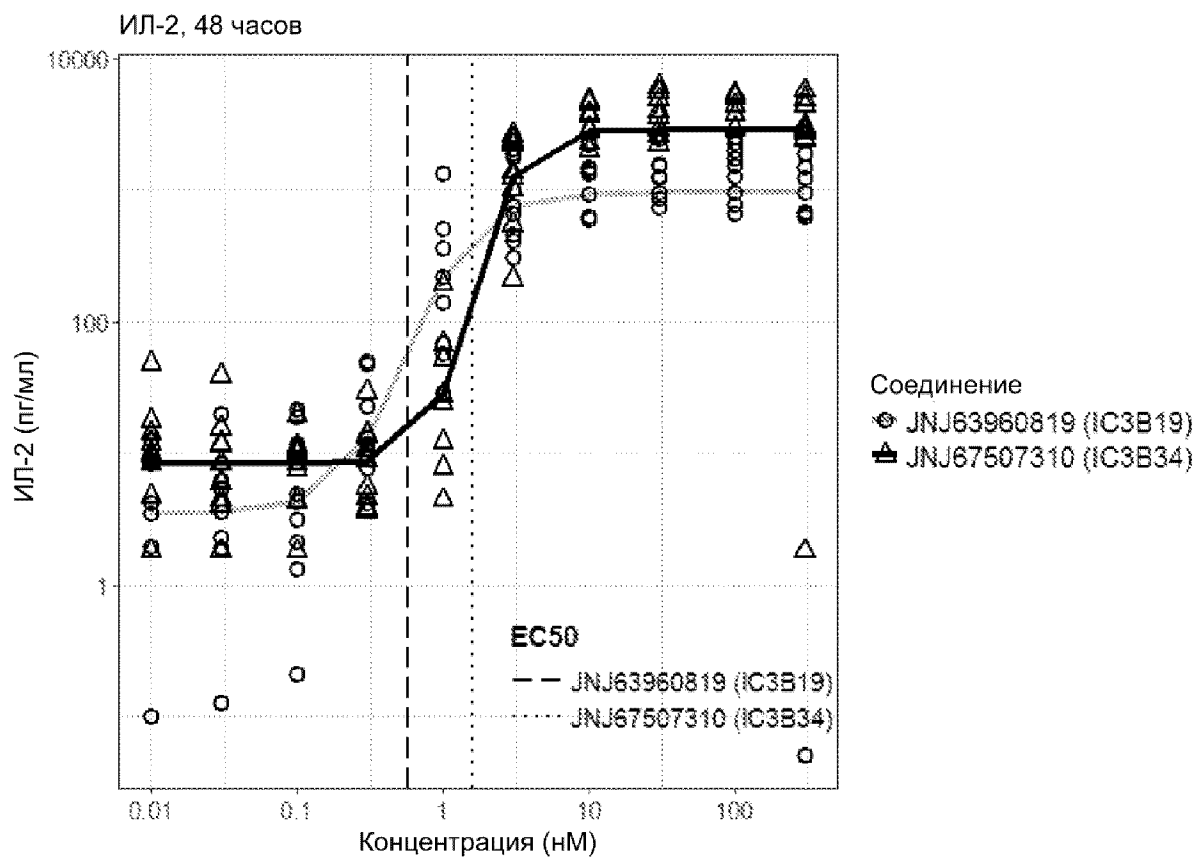
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.105	0.599	1.0000
Разность при 0,03	0.704	0.599	0.8315
Разность при 0,1	0.198	0.599	1.0000
Разность при 0,3	-0.841	0.599	0.6679
Разность при 1	-2.095	0.599	0.0041
Разность при 3	-0.330	0.599	0.9989
Разность при 10	-0.382	0.599	0.9963
Разность при 30	0.026	0.599	1.0000
Разность при 100	0.222	0.599	1.0000
Разность при 300	0.568	0.599	0.9440

Фиг. 39В



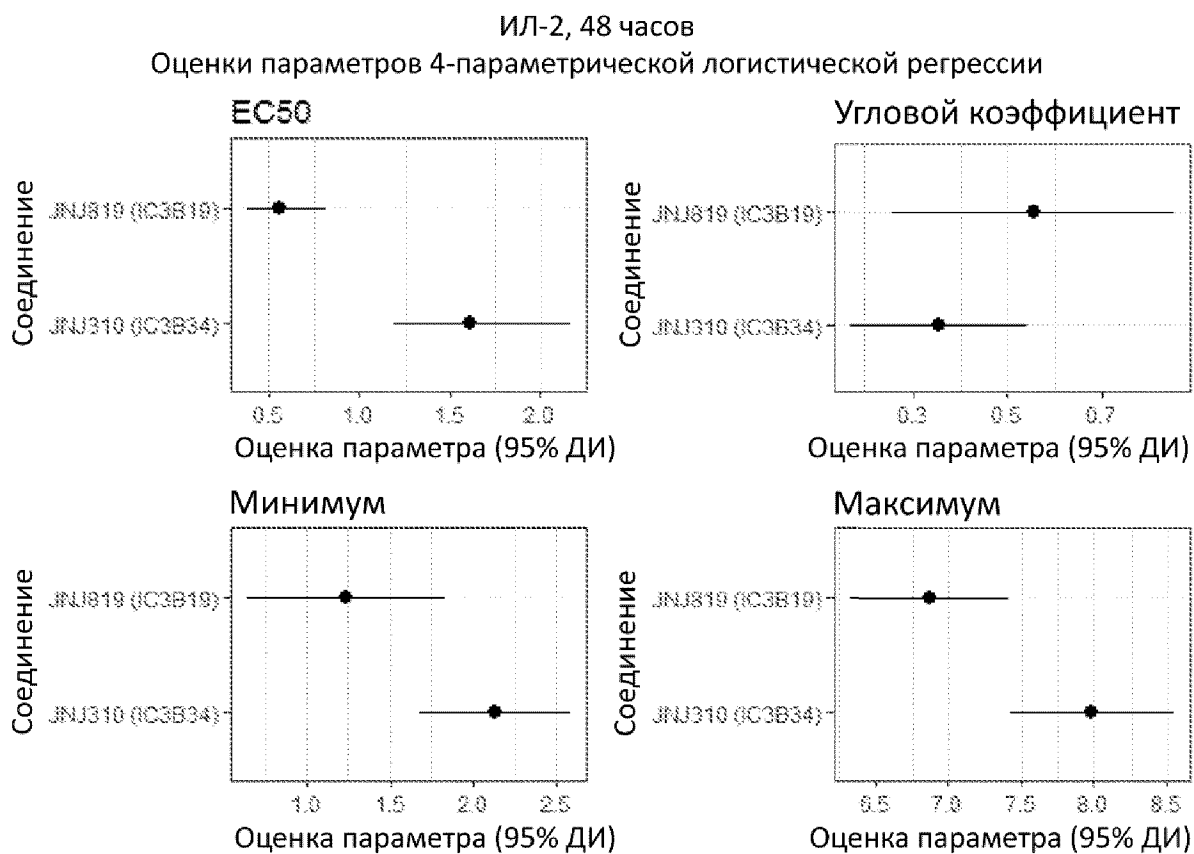
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	1.063 (0.829, 1.361)	2.044 (1.697, 2.463)	0.0001
Углов. коэфф.	0.665 (0.440, 0.890)	0.383 (0.247, 0.520)	0.0256
Минимум	1.038 (0.613, 1.463)	1.311 (0.973, 1.650)	0.3103
Максимум	8.053 (7.398, 8.707)	8.168 (7.527, 8.809)	0.6466

Фиг. 40А



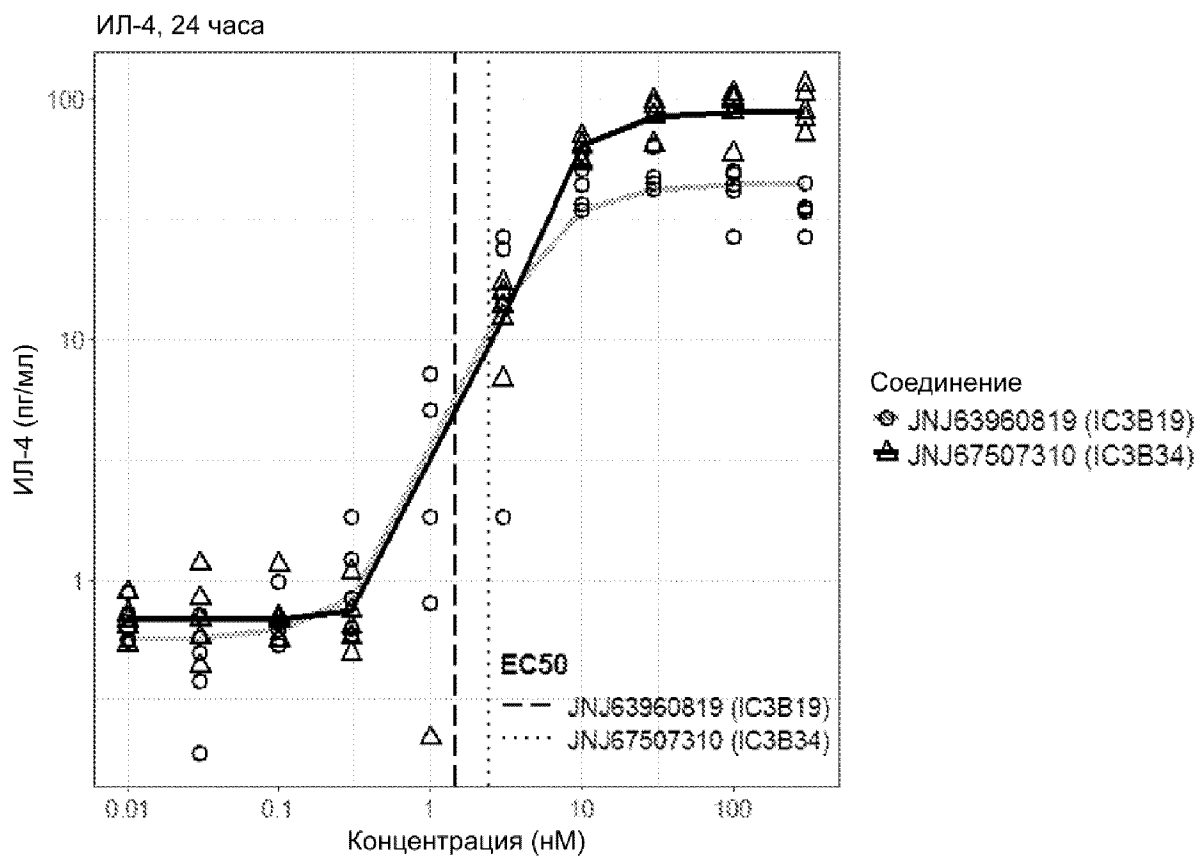
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.928	0.676	0.8169
Разность при 0,03	0.859	0.676	0.8755
Разность при 0,1	0.737	0.676	0.9485
Разность при 0,3	-0.567	0.676	0.9917
Разность при 1	-1.950	0.676	0.0370
Разность при 3	0.372	0.676	0.9998
Разность при 10	0.954	0.676	0.7914
Разность при 30	0.987	0.676	0.7576
Разность при 100	1.066	0.676	0.6693
Разность при 300	1.488	0.676	0.2289

Фиг. 40В



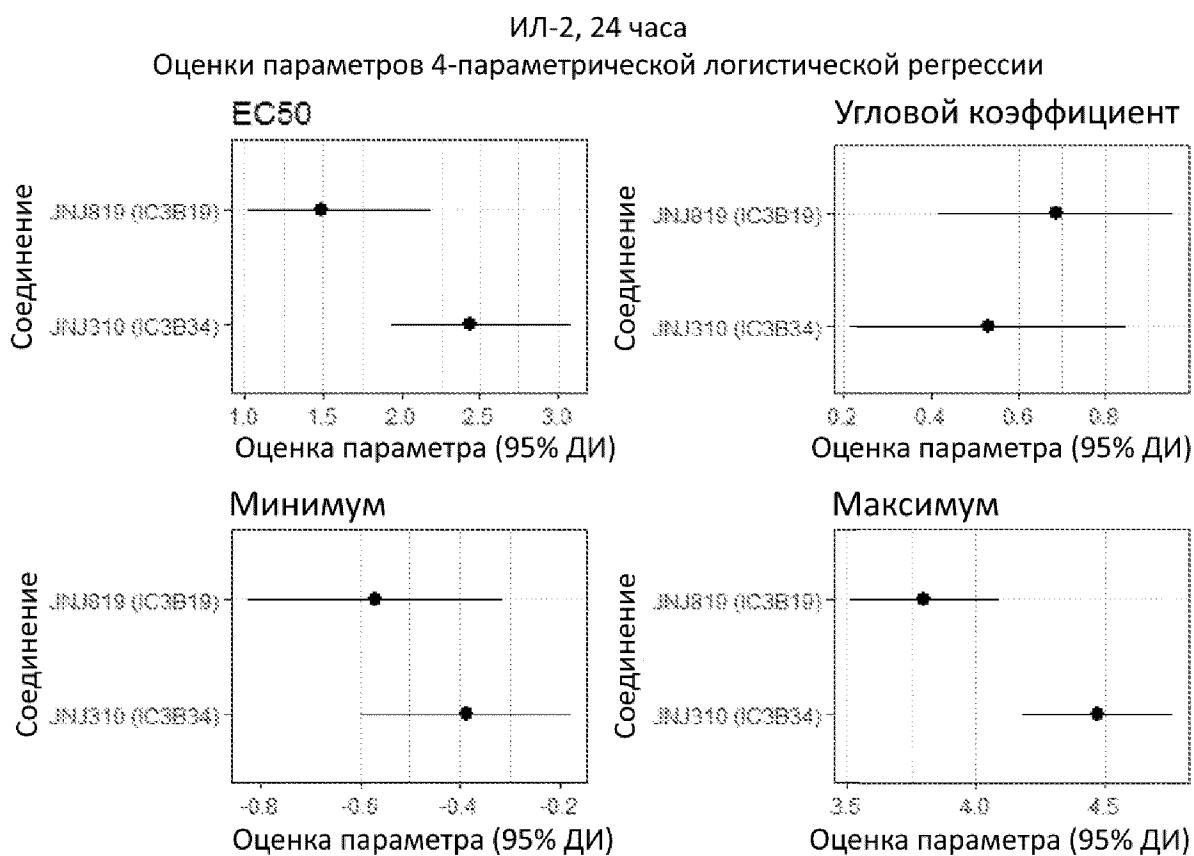
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение знач.
EC50	0.558 (0.380, 0.821)	1.611 (1.199, 2.166)	
Углов. коэфф.	0.554 (0.256, 0.851)	0.353 (0.168, 0.539)	0.2079
Минимум	1.231 (0.638, 1.824)	2.129 (1.674, 2.584)	0.0158
Максимум	6.874 (6.327, 7.421)	7.988 (7.425, 8.551)	0.0008

Фиг. 41А



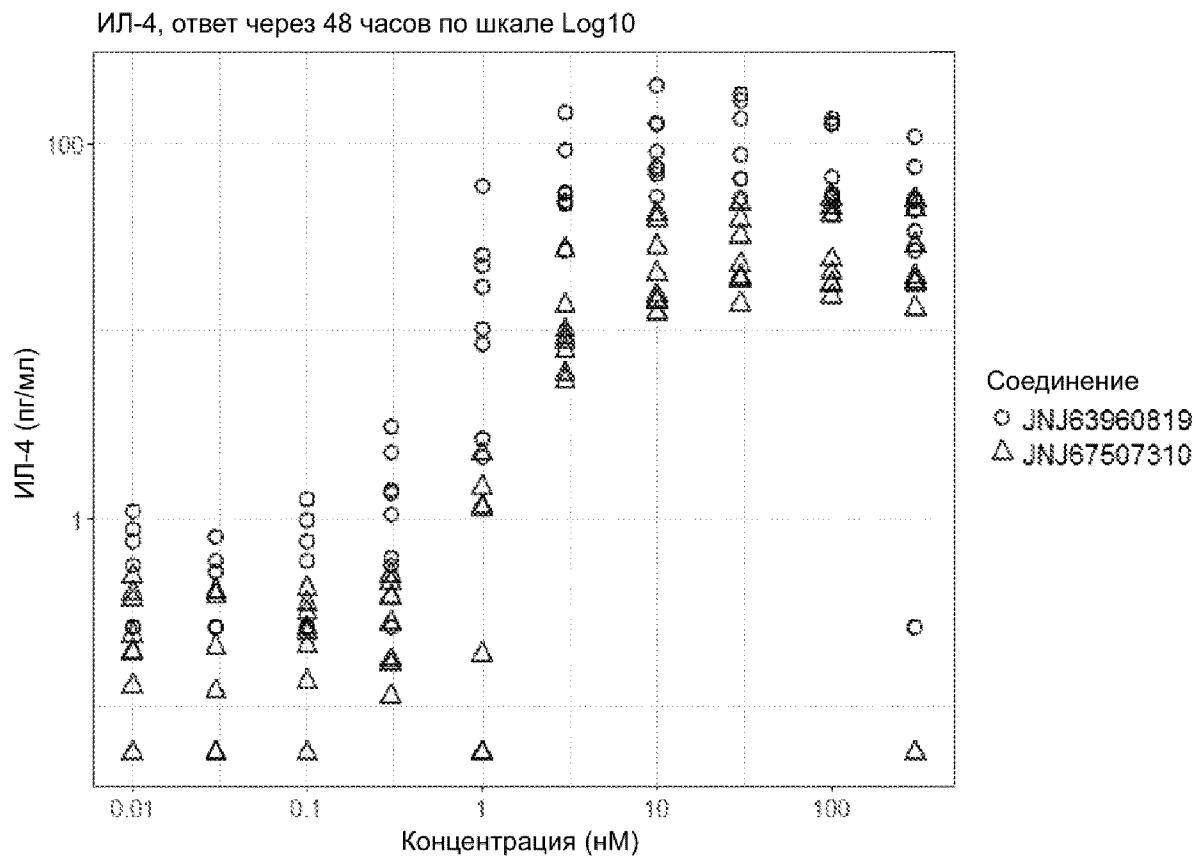
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.010	0.301	1.0000
Разность при 0,03	0.563	0.301	0.3761
Разность при 0,1	0.110	0.301	1.0000
Разность при 0,3	-0.361	0.301	0.8592
Разность при 3	0.081	0.301	1.0000
Разность при 10	0.253	0.301	0.9815
Разность при 30	0.439	0.301	0.6850
Разность при 100	0.780	0.301	0.0749
Разность при 300	1.031	0.301	0.0054

Фиг. 41В



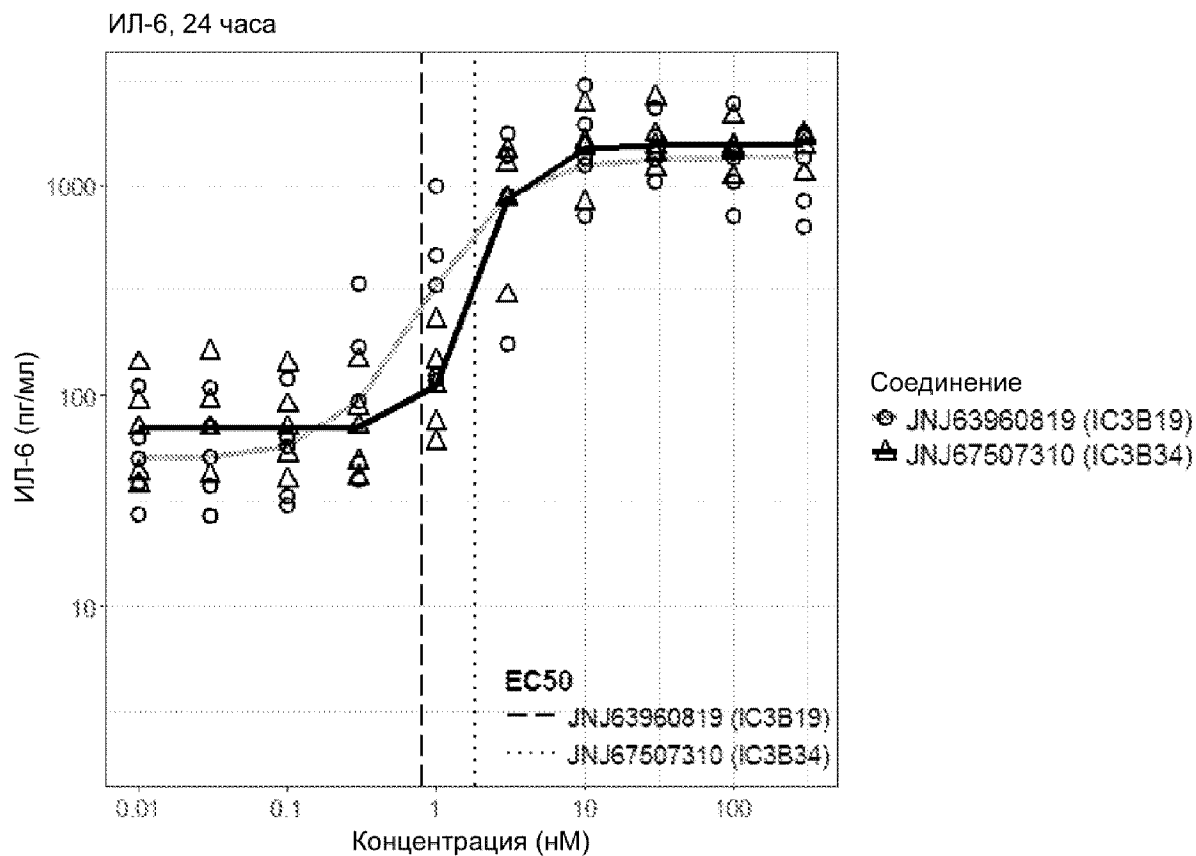
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	1.493 (1.016, 2.192)	2.440 (1.932, 3.081)	0.2415
Углов. коэфф.	0.686 (0.416, 0.957)	0.532 (0.214, 0.849)	0.4668
Минимум	-0.570 (-0.827, -0.313)	-0.387 (-0.598, -0.176)	0.2942
Максимум	3.799 (3.510, 4.088)	4.476 (4.183, 4.769)	0.0043

Фиг. 42



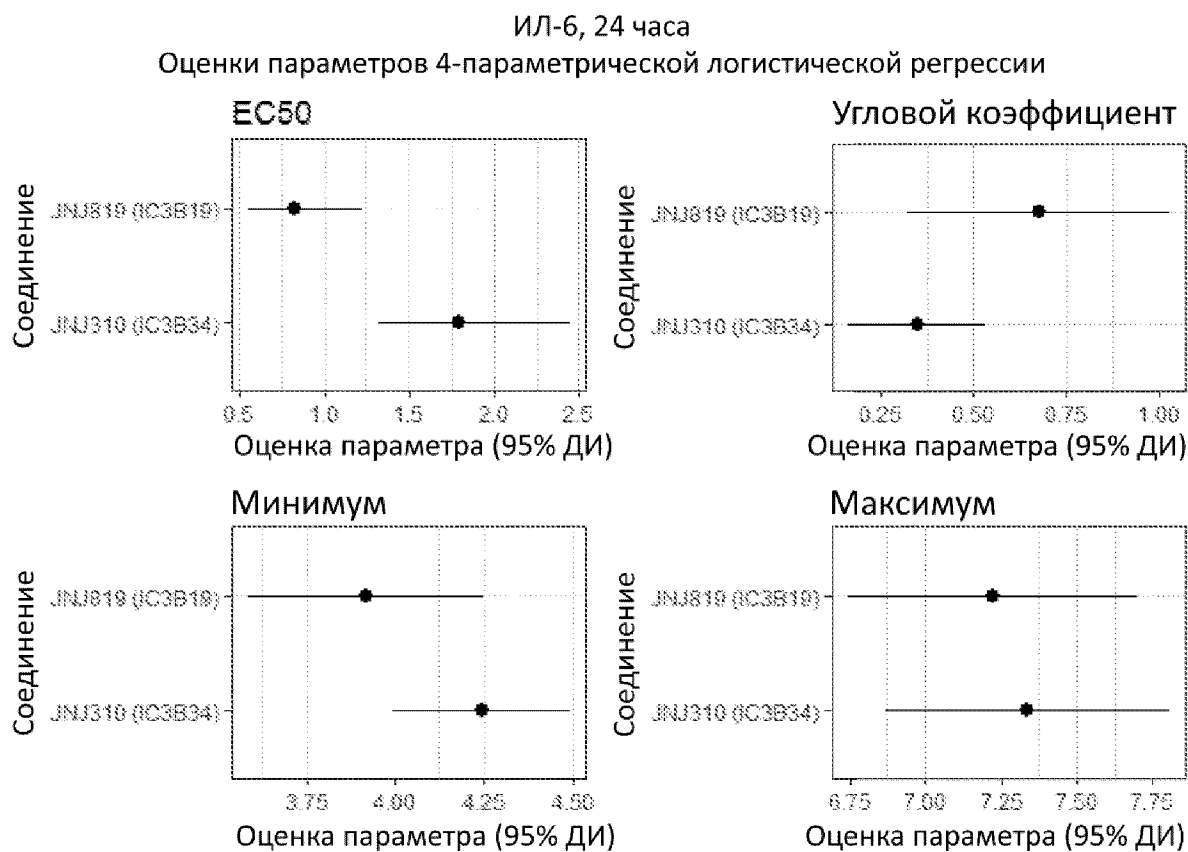
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.756	0.474	0.6568
Разность при 0,03	-0.882	0.474	0.4482
Разность при 0,1	-0.795	0.474	0.5915
Разность при 0,3	-1.337	0.474	0.0454
Разность при 1	-3.54	0.474	<0.0001
Разность при 3	-1.786	0.474	0.0016
Разность при 10	-1.504	0.474	0.0146
Разность при 30	-1.329	0.474	0.0475
Разность при 100	-1.043	0.474	0.2301
Разность при 300	-0.831	0.474	0.5305

Фиг. 43А



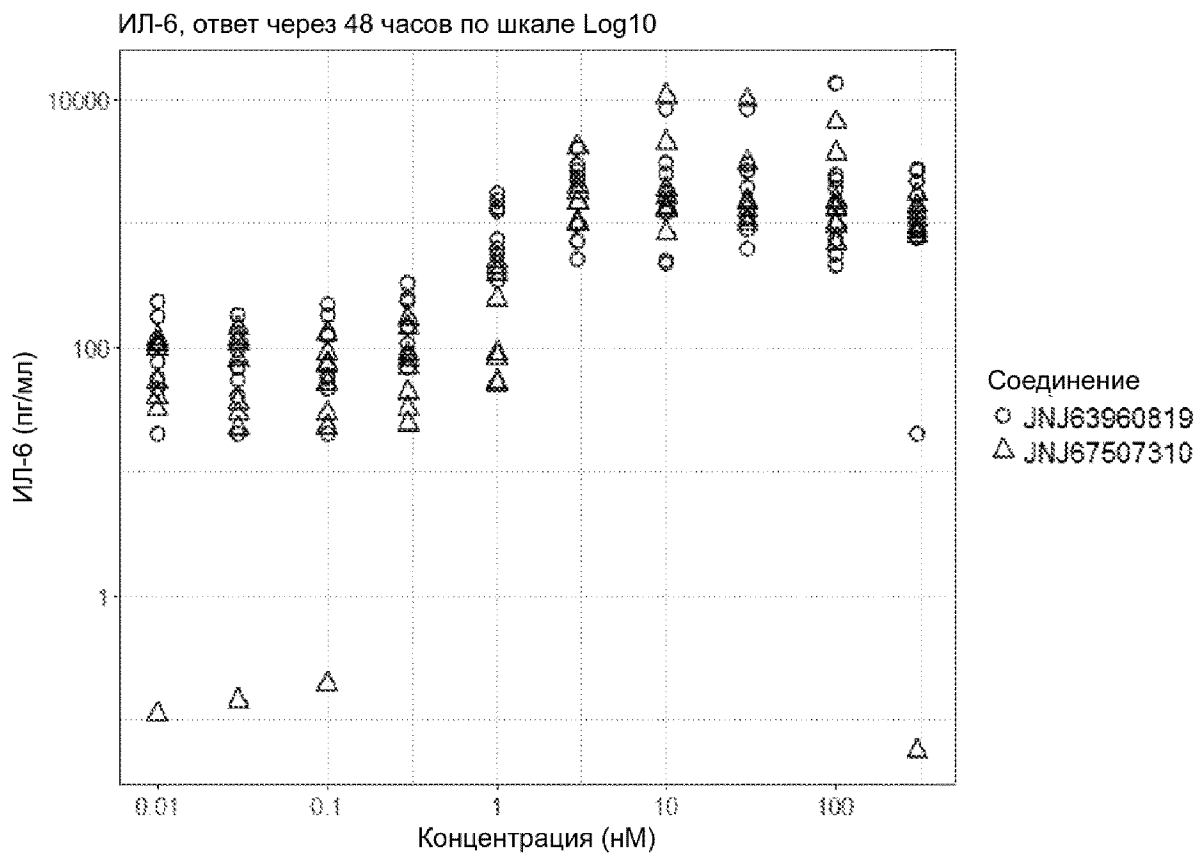
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.263	0.456	0.9990
Разность при 0,03	0.302	0.456	0.9970
Разность при 0,1	0.304	0.456	0.9968
Разность при 0,3	-0.367	0.456	0.9866
Разность при 1	-0.962	0.456	0.2340
Разность при 3	-0.059	0.456	1.0000
Разность при 10	-0.037	0.456	1.0000
Разность при 30	0.056	0.456	1.0000
Разность при 100	0.156	0.456	1.0000
Разность при 300	0.314	0.456	0.9958

Фиг. 43В



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение знач.
EC50	0.821 (0.549, 1.229)	1.796 (1.320, 2.444)	
Углов. коэфф.	0.678 (0.324, 1.031)	0.349 (0.162, 0.536)	0.0819
Минимум	3.917 (3.582, 4.252)	4.243 (3.993, 4.493)	0.1151
Максимум	7.221 (6.742, 7.700)	7.337 (6.865, 7.808)	0.5224

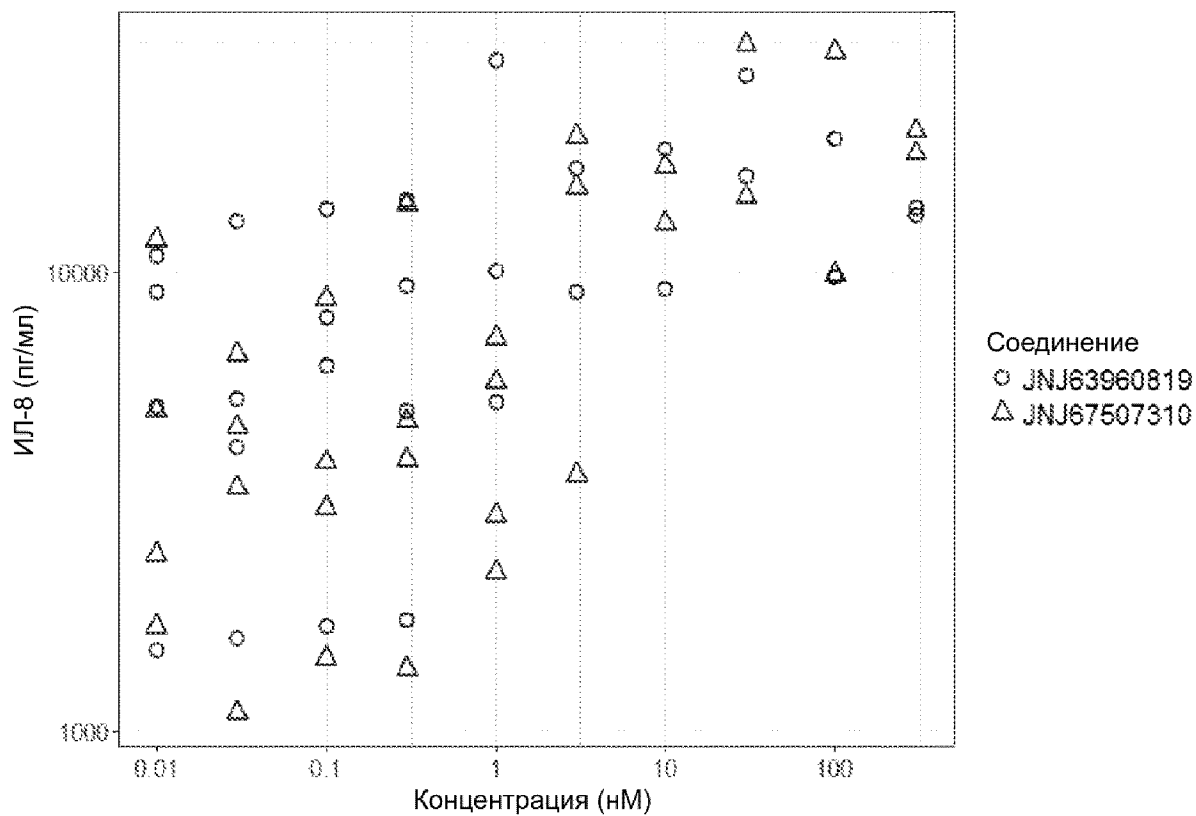
Фиг. 44



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.948	0.698	0.8438
Разность при 0,03	-0.875	0.698	0.8982
Разность при 0,1	-1.071	0.698	0.7261
Разность при 0,3	-0.811	0.698	0.9349
Разность при 1	-1.724	0.698	0.1254
Разность при 3	-0.090	0.698	1.0000
Разность при 10	0.207	0.698	1.0000
Разность при 30	-0.061	0.698	1.0000
Разность при 100	-0.001	0.698	1.0000
Разность при 300	-1.001	0.698	0.7966

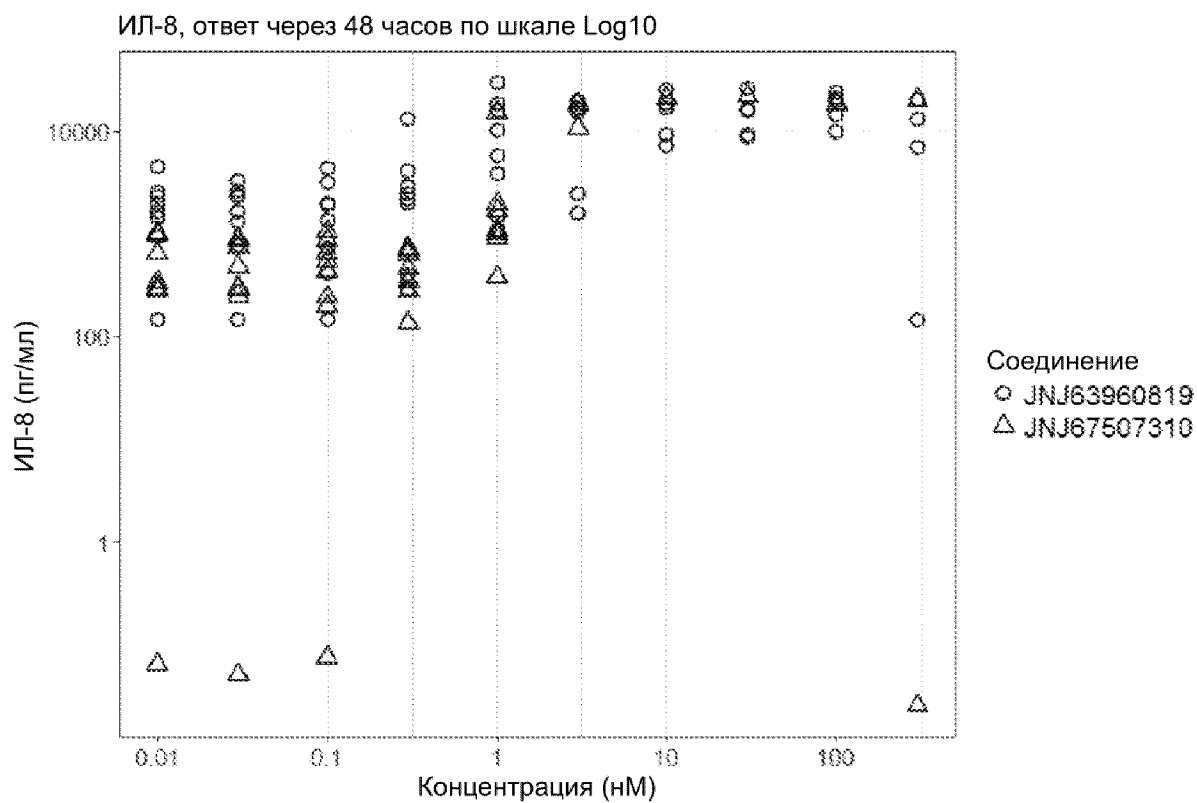
Фиг. 45

ИЛ-8, ответ через 24 часа по шкале Log10



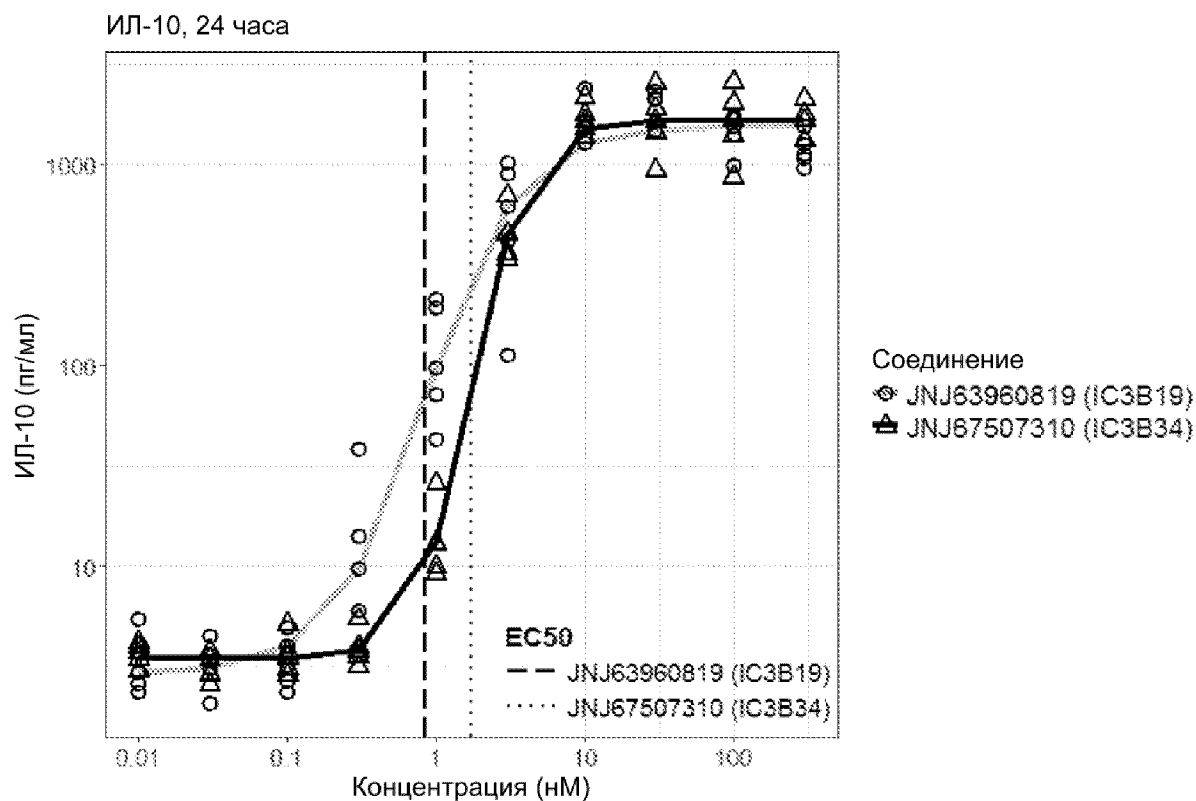
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.285	0.560	0.9985
Разность при 0,03	-0.349	0.560	0.9927
Разность при 0,1	-0.512	0.560	0.9192
Разность при 0,3	-0.299	0.560	0.9977
Разность при 1	-1.276	0.576	0.1433
Разность при 3	-0.311	0.621	0.9986
Разность при 10	0.158	0.649	1.0000
Разность при 30	0.062	0.649	1.0000
Разность при 100	0.259	0.649	0.9998
Разность при 300	0.386	0.649	0.9948

Фиг. 46



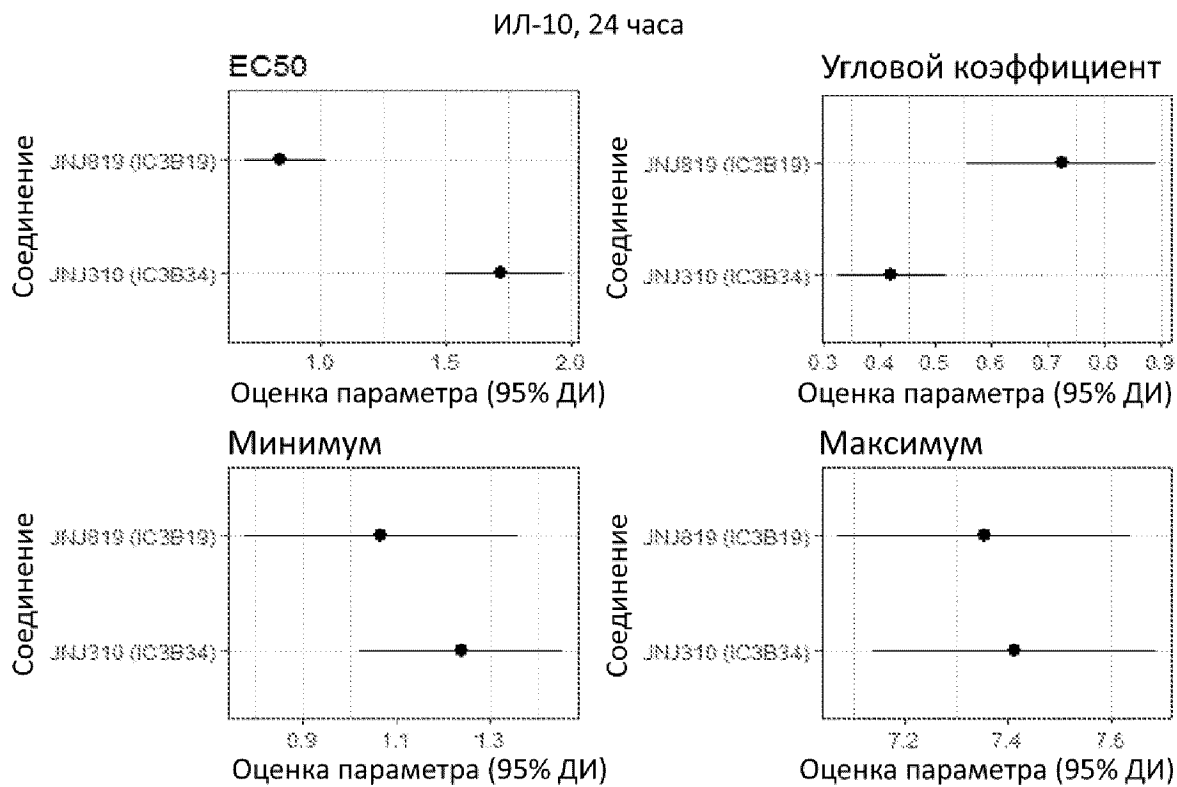
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-2.073	1.303	0.3365
Разность при 0,03	-2.198	1.303	0.2873
Разность при 0,1	-1.972	1.303	0.3811
Разность при 0,3	-2.753	1.309	0.1302
Разность при 1	-2.650	1.309	0.1533
Разность при 3	-0.834	1.419	0.9715
Разность при 10	-0.880	1.551	0.9766
Разность при 30	-0.819	1.551	0.9847
Разность при 100	-1.189	1.551	0.8961
Разность при 300	-1.909	1.445	0.5029

Фиг. 47А



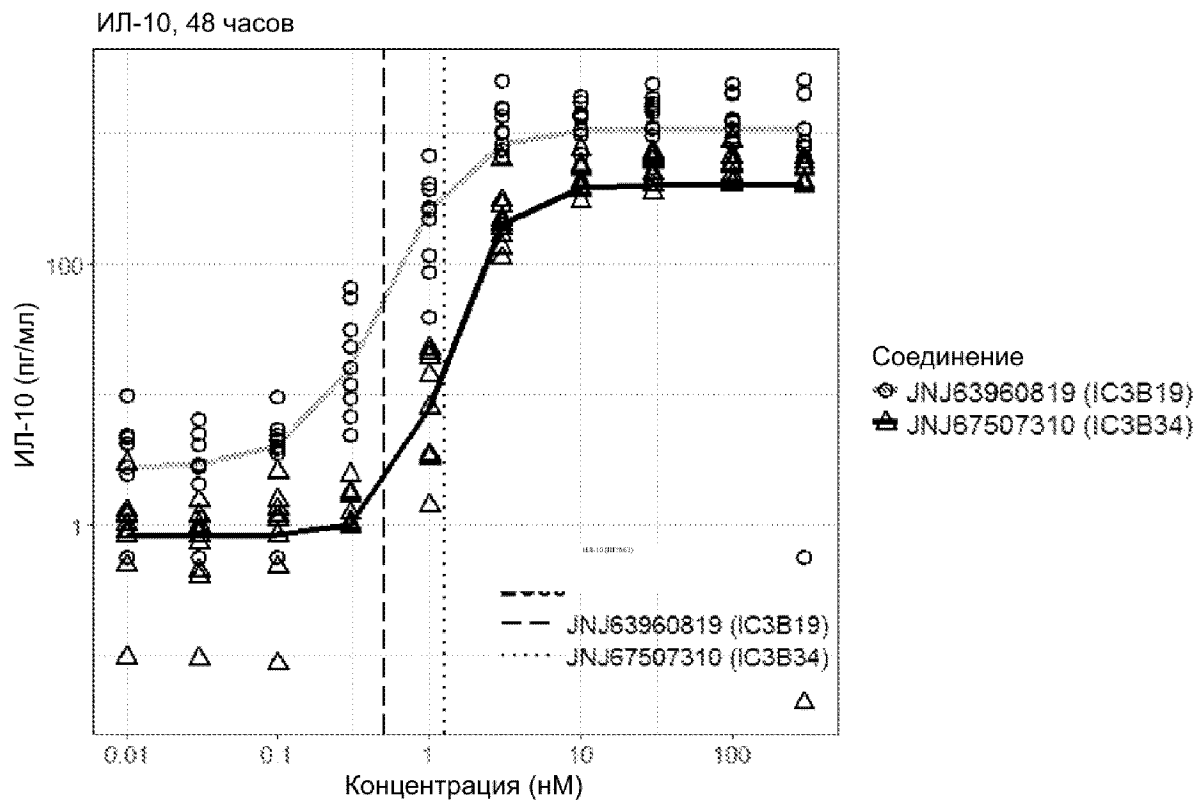
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.098	0.325	1.0000
Разность при 0,03	-0.077	0.325	1.0000
Разность при 0,1	0.127	0.325	1.0000
Разность при 0,3	-0.963	0.325	0.0293
Разность при 1	-2.09	0.325	<0.0001
Разность при 3	-0.026	0.325	1.0000
Разность при 10	-0.037	0.325	1.0000
Разность при 30	-0.245	0.325	0.9967
Разность при 100	0.098	0.325	1.0000
Разность при 300	0.375	0.325	0.9308

Фиг. 47В



	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	0.844 (0.698, 1.021)	1.718 (1.500, 1.968)	<0.0001
Углов. коэфф.	0.724 (0.557, 0.892)	0.421 (0.325, 0.517)	0.0010
Минимум	1.067 (0.775, 1.359)	1.237 (1.020, 1.453)	0.3406
Максимум	7.353 (7.070, 7.636)	7.413 (7.140, 7.686)	0.7036

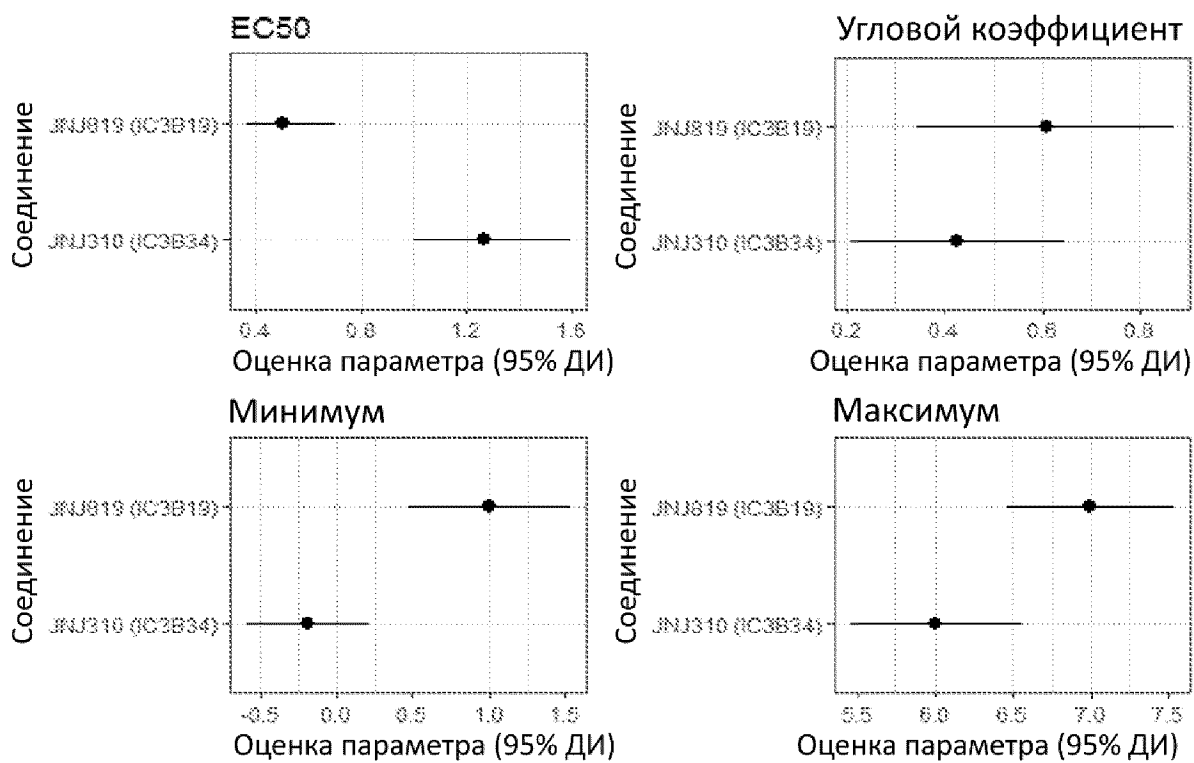
Фиг. 48А



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-1.404	0.583	0.1405
Разность при 0,03	-1.391	0.583	0.1484
Разность при 0,1	-1.472	0.583	0.1043
Разность при 0,3	-2.546	0.583	1e-04
Разность при 1	-3.33	0.583	<0.0001
Разность при 3	-1.693	0.583	0.0352
Разность при 10	-0.98	0.583	0.5852
Разность при 30	-1.011	0.583	0.5434
Разность при 100	-0.898	0.583	0.6952
Разность при 300	-0.956	0.583	0.6178

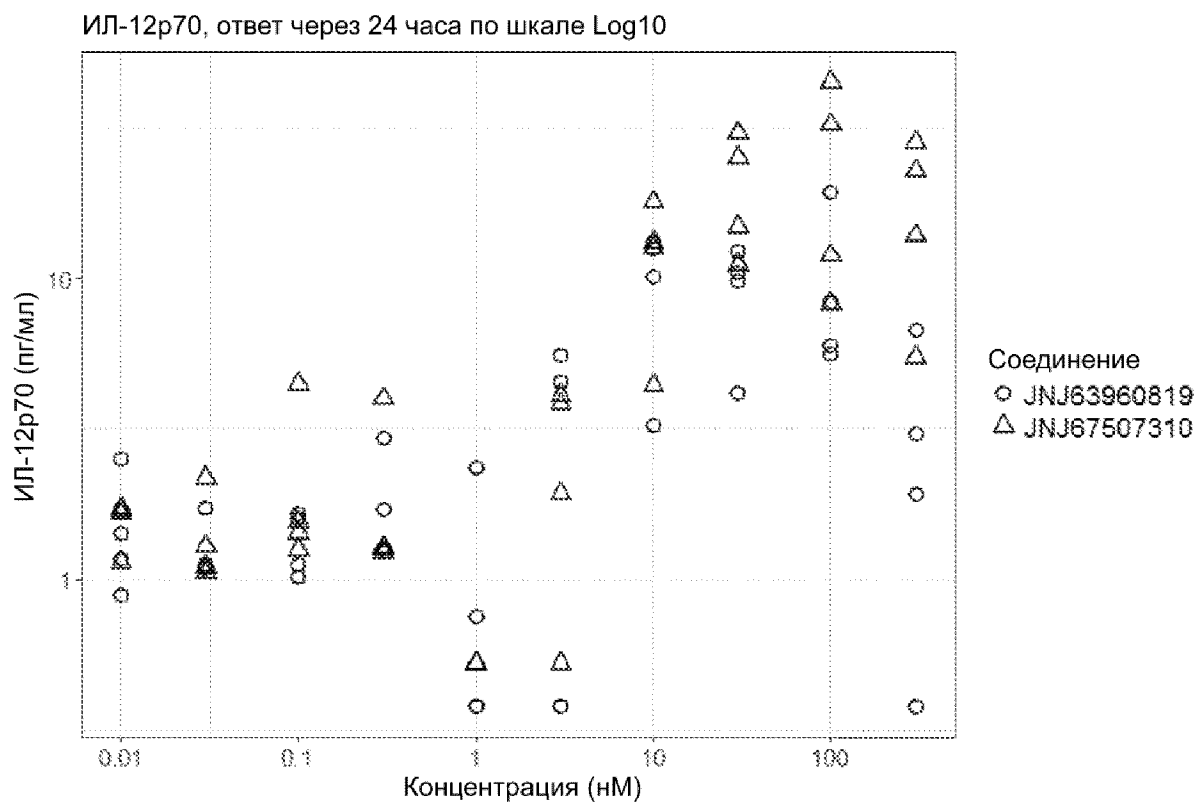
Фиг. 48В

ИЛ-10, 48 часов



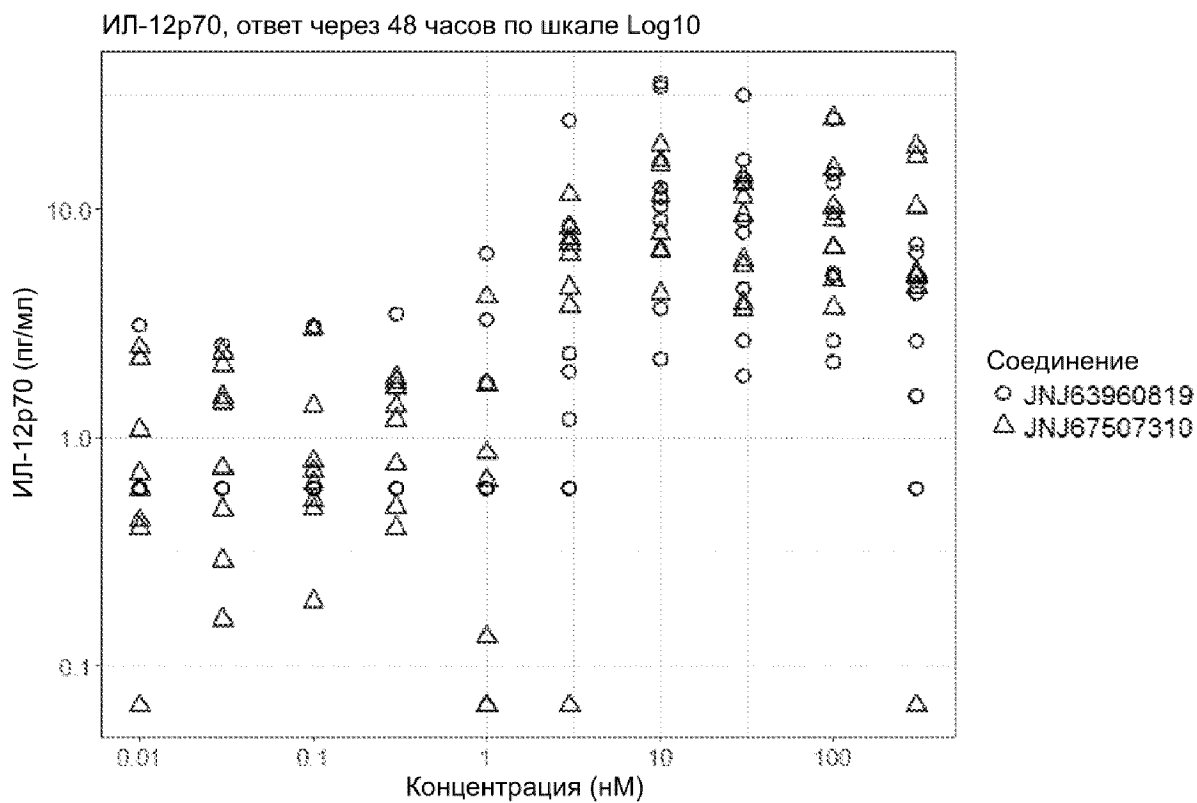
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение
EC50	0.503 (0.362, 0.697)	1.263 (1.000, 1.595)	<0.0001
Углов. коэфф.	0.607 (0.344, 0.870)	0.425 (0.206, 0.644)	0.2702
Минимум	1.006 (0.471, 1.540)	-0.192 (-0.599, 0.214)	0.0011
Максимум	6.999 (6.459, 7.539)	6.004 (5.453, 6.554)	0.0004

Фиг. 49



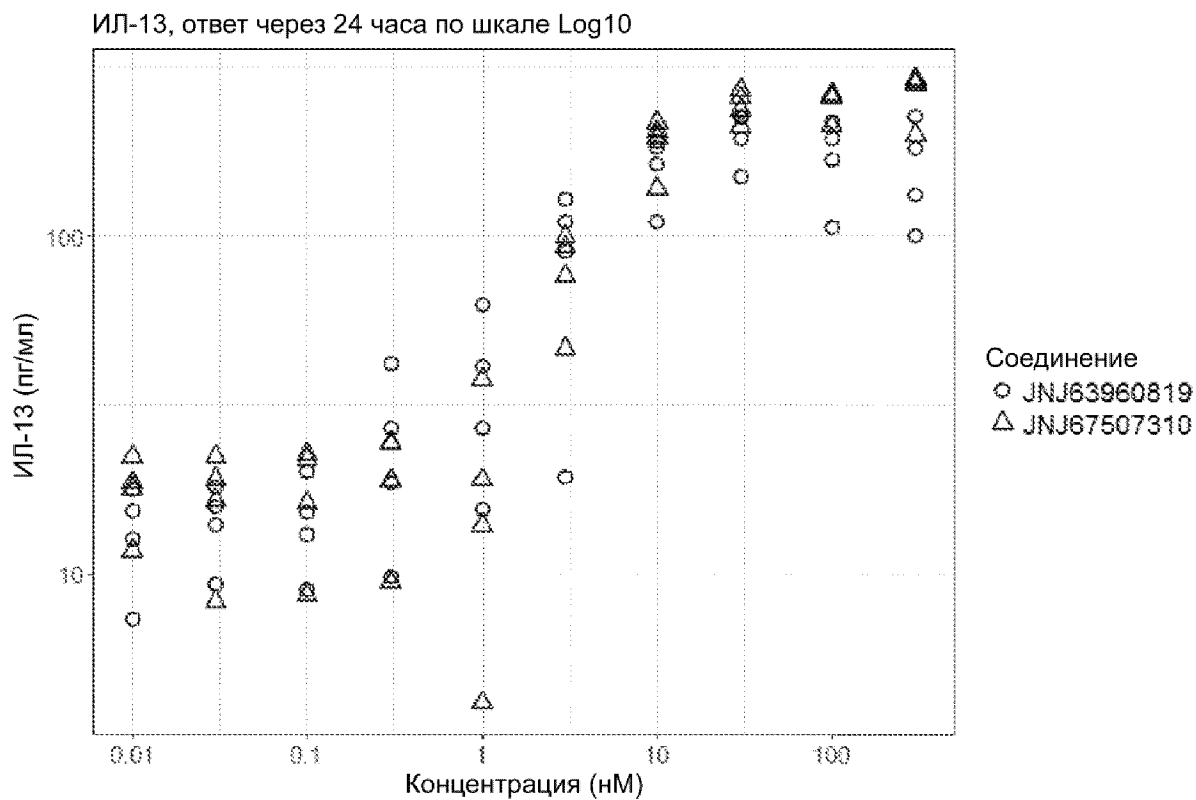
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.096	0.485	1.0000
Разность при 0,03	0.081	0.485	1.0000
Разность при 0,1	0.351	0.485	0.9953
Разность при 0,3	0.002	0.485	1.0000
Разность при 1	-0.302	0.485	0.9986
Разность при 3	0.369	0.485	0.9931
Разность при 10	0.216	0.485	0.9999
Разность при 30	0.792	0.485	0.5672
Разность при 100	0.814	0.485	0.5321
Разность при 300	2.024	0.485	0.0003

Фиг. 50



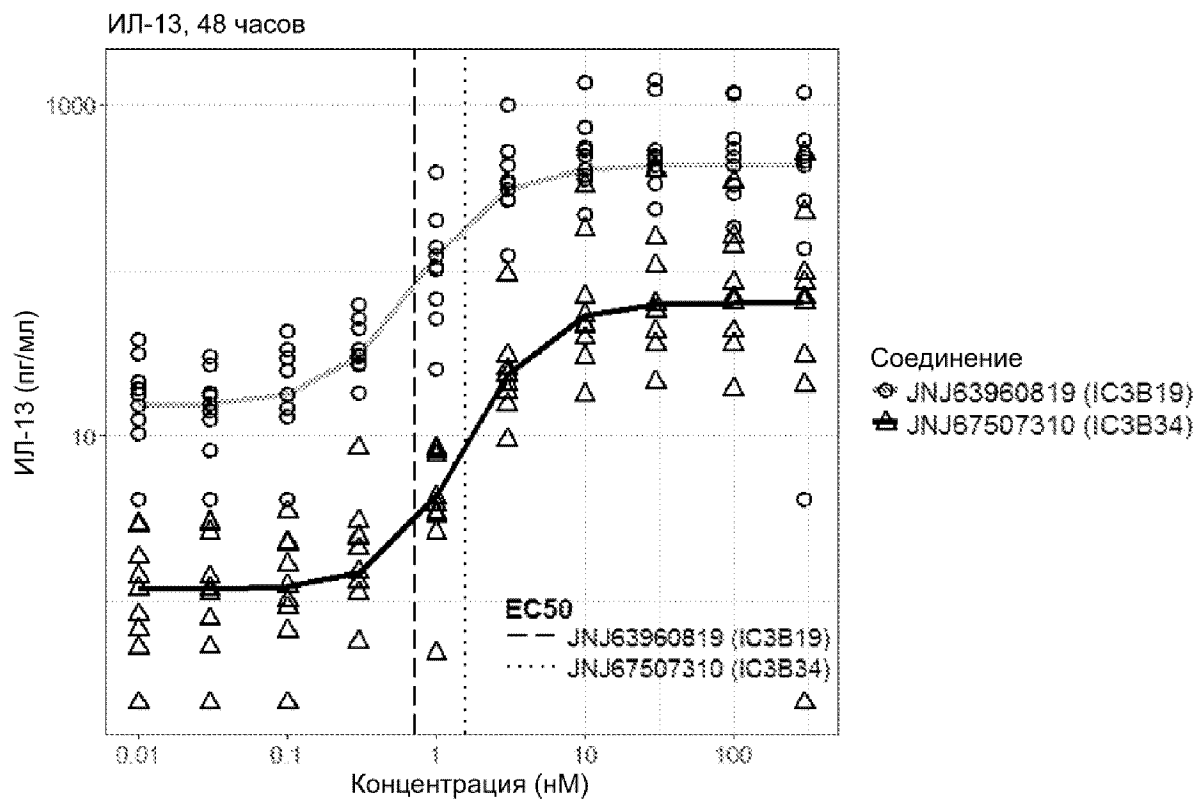
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-0.140	0.503	1.0000
Разность при 0,03	0.108	0.503	1.0000
Разность при 0,1	-0.022	0.503	1.0000
Разность при 0,3	0.324	0.503	0.9988
Разность при 1	-0.822	0.503	0.6083
Разность при 3	0.623	0.503	0.8814
Разность при 10	-0.059	0.503	1.0000
Разность при 30	-0.022	0.503	1.0000
Разность при 100	0.178	0.503	1.0000
Разность при 300	0.718	0.503	0.7659

Фиг. 51



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.307	0.312	0.8941
Разность при 0,03	0.108	0.312	1.0000
Разность при 0,1	0.161	0.312	0.9985
Разность при 0,3	-0.170	0.312	0.9978
Разность при 1	-0.817	0.312	0.0565
Разность при 3	0.071	0.312	1.0000
Разность при 10	0.159	0.312	0.9987
Разность при 30	0.212	0.312	0.9886
Разность при 100	0.393	0.312	0.7092
Разность при 300	0.536	0.312	0.3785

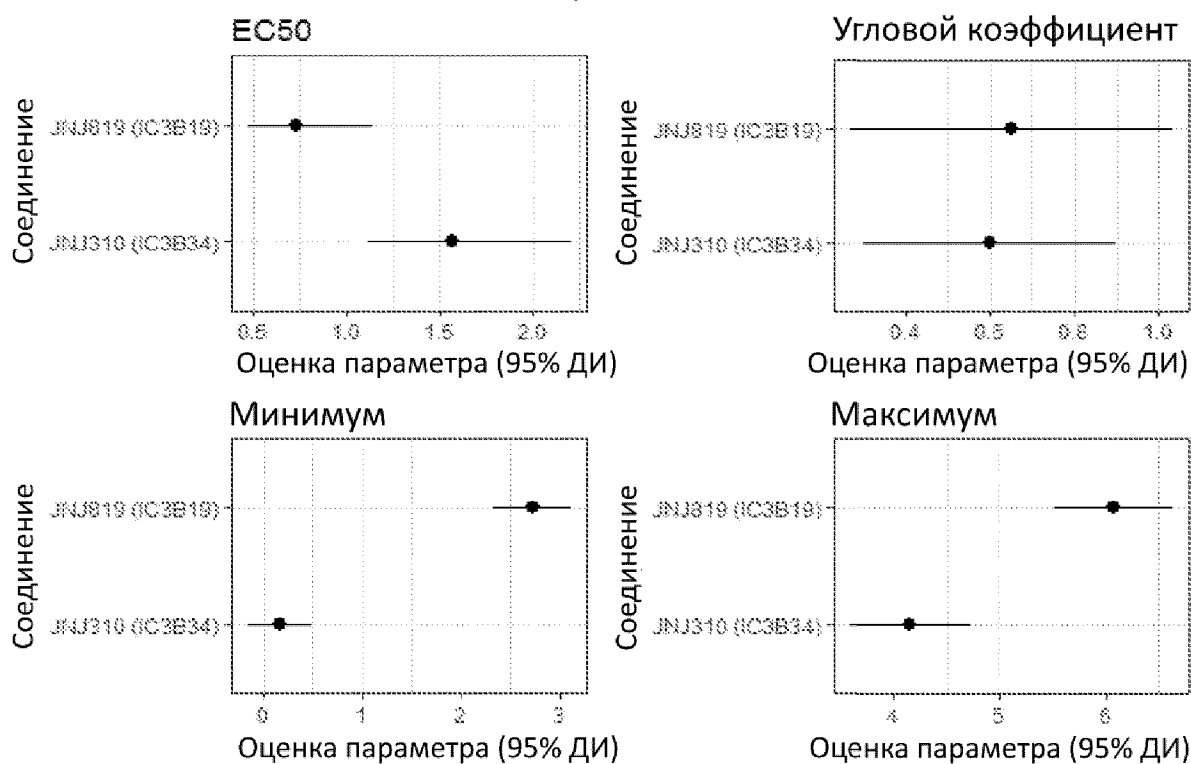
Фиг. 52А



	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-2.735	0.49	<0.0001
Разность при 0,03	-2.489	0.49	<0.0001
Разность при 0,1	-2.726	0.49	<0.0001
Разность при 0,3	-2.846	0.49	<0.0001
Разность при 1	-3.337	0.49	<0.0001
Разность при 3	-2.707	0.49	<0.0001
Разность при 10	-2.132	0.49	1e-04
Разность при 30	-2.005	0.49	4e-04
Разность при 100	-1.869	0.49	0.0014
Разность при 300	-1.753	0.49	0.0034

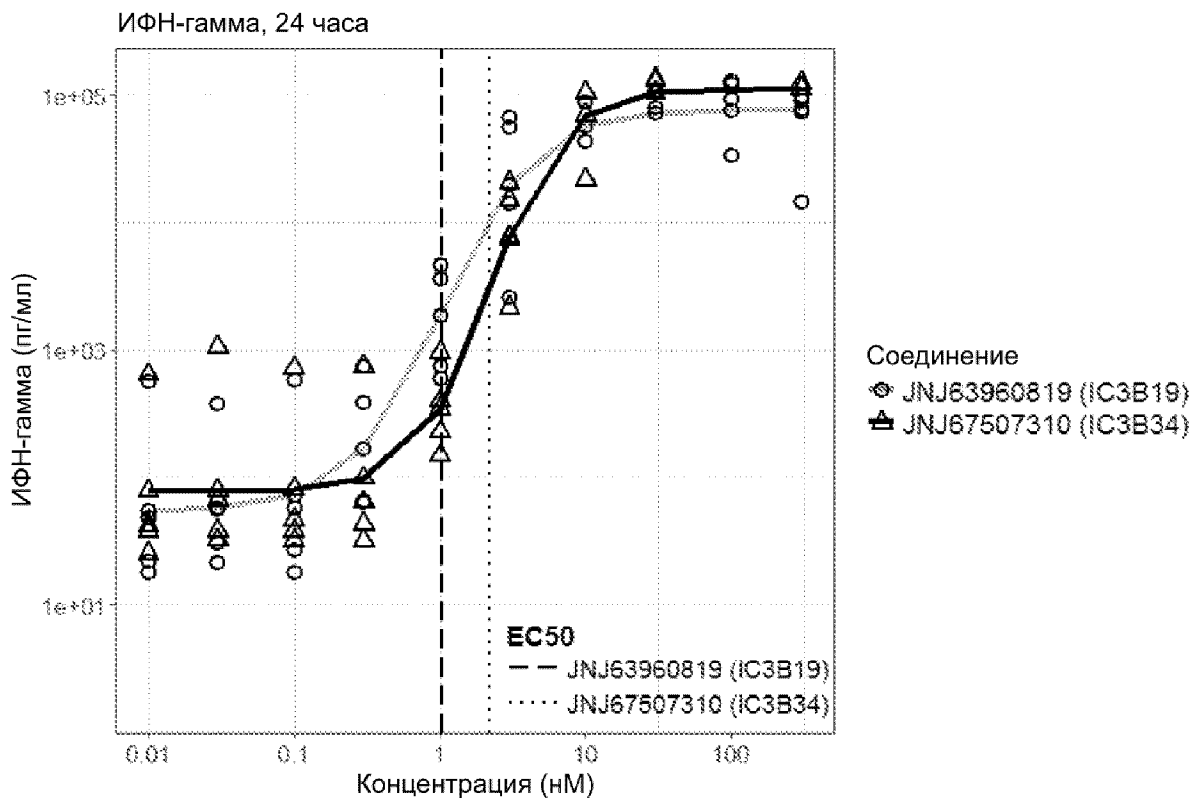
Фиг. 52В

ИЛ-13, 48 часов



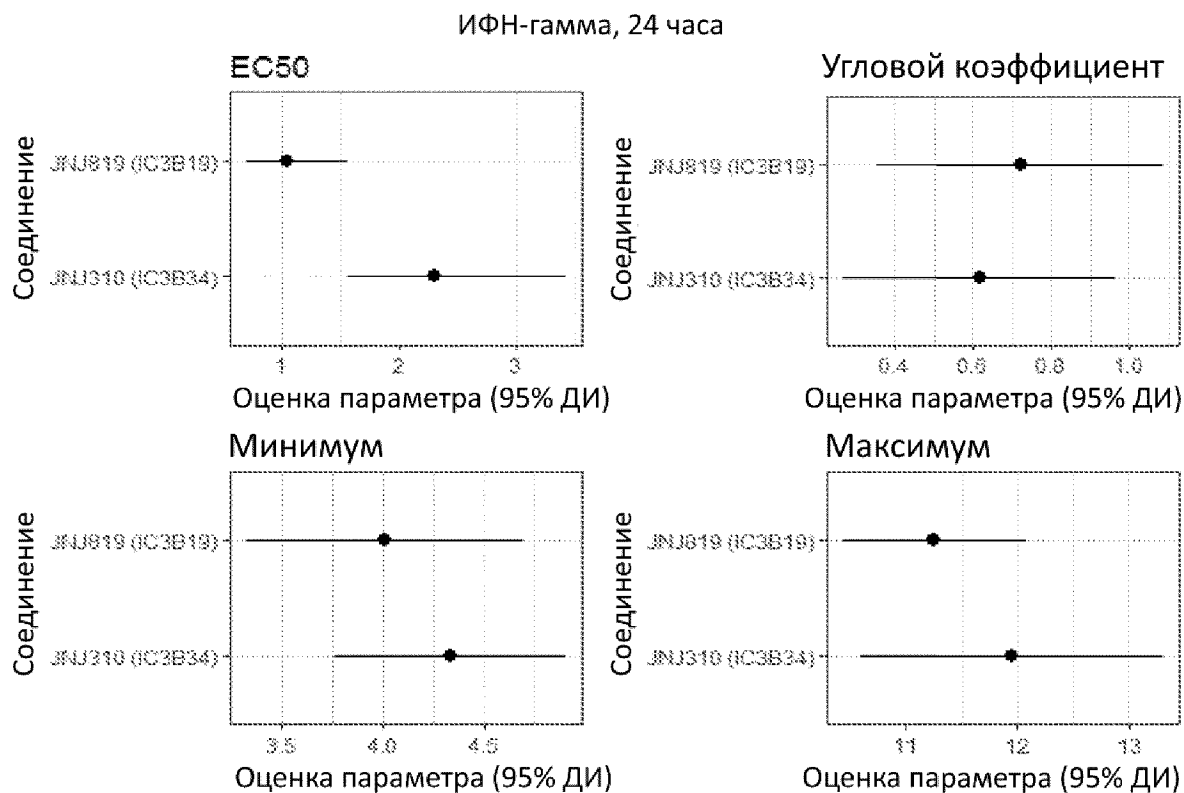
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение
EC50	0.731 (0.467, 1.143)	1.564 (1.111, 2.202)	0.0106
Углов. коэфф.	0.651 (0.270, 1.033)	0.599 (0.300, 0.899)	0.8268
Минимум	2.729 (2.341, 3.118)	0.162 (-0.165, 0.490)	<0.0001
Максимум	6.077 (5.523, 6.630)	4.155 (3.590, 4.721)	<0.0001

Фиг. 53А



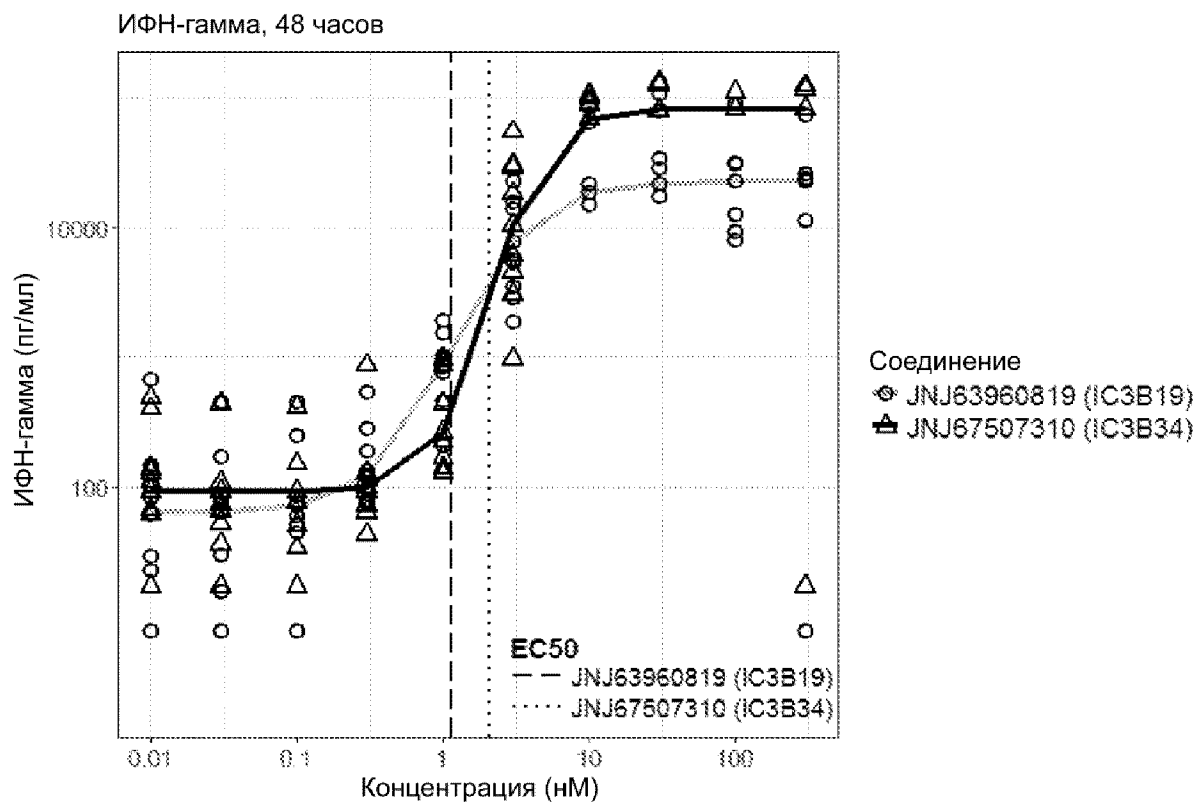
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.220	0.927	1.0000
Разность при 0,03	0.448	0.927	0.9991
Разность при 0,1	0.225	0.927	1.0000
Разность при 0,3	-0.735	0.927	0.9718
Разность при 1	-1.596	0.927	0.4007
Разность при 3	-0.836	0.927	0.9413
Разность при 10	-0.060	1.123	1.0000
Разность при 30	0.538	1.123	0.9992
Разность при 300	1.510	1.206	0.7439

Фиг. 53В



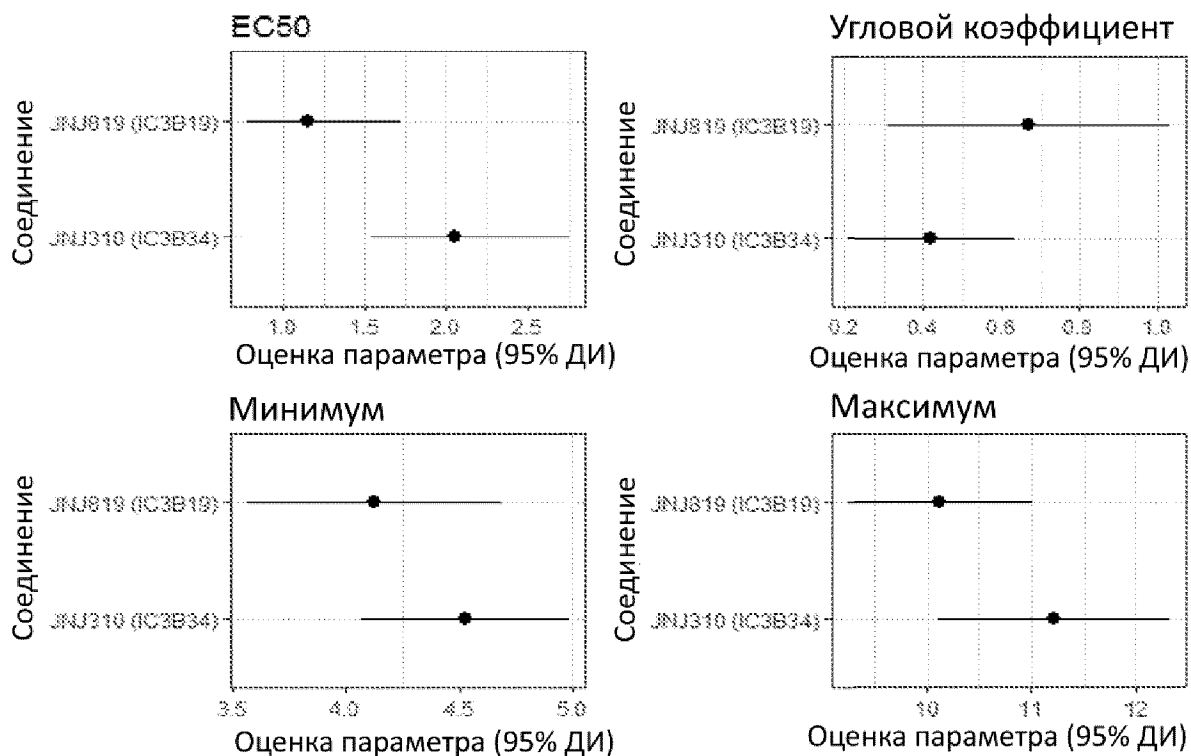
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение
EC50	1.037 (0.693, 1.553)	2.304 (1.552, 3.420)	0.0065
Углов. коэфф.	0.722 (0.358, 1.087)	0.617 (0.268, 0.966)	0.6920
Минимум	4.007 (3.317, 4.697)	4.335 (3.760, 4.909)	0.4644
Максимум	11.258 (10.434, 12.083)	11.952 (10.597, 13.307)	0.3179

Фиг. 54А



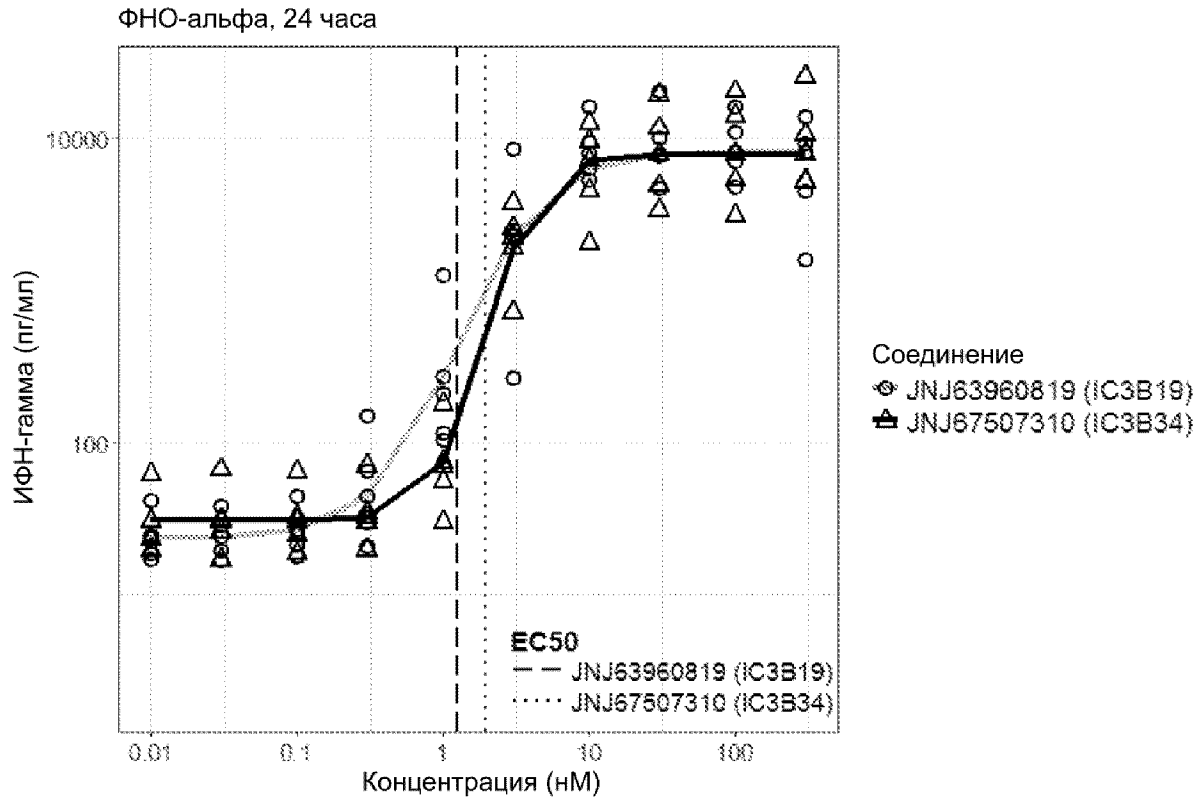
Фиг. 54В

ИФН-гамма, 48 часов



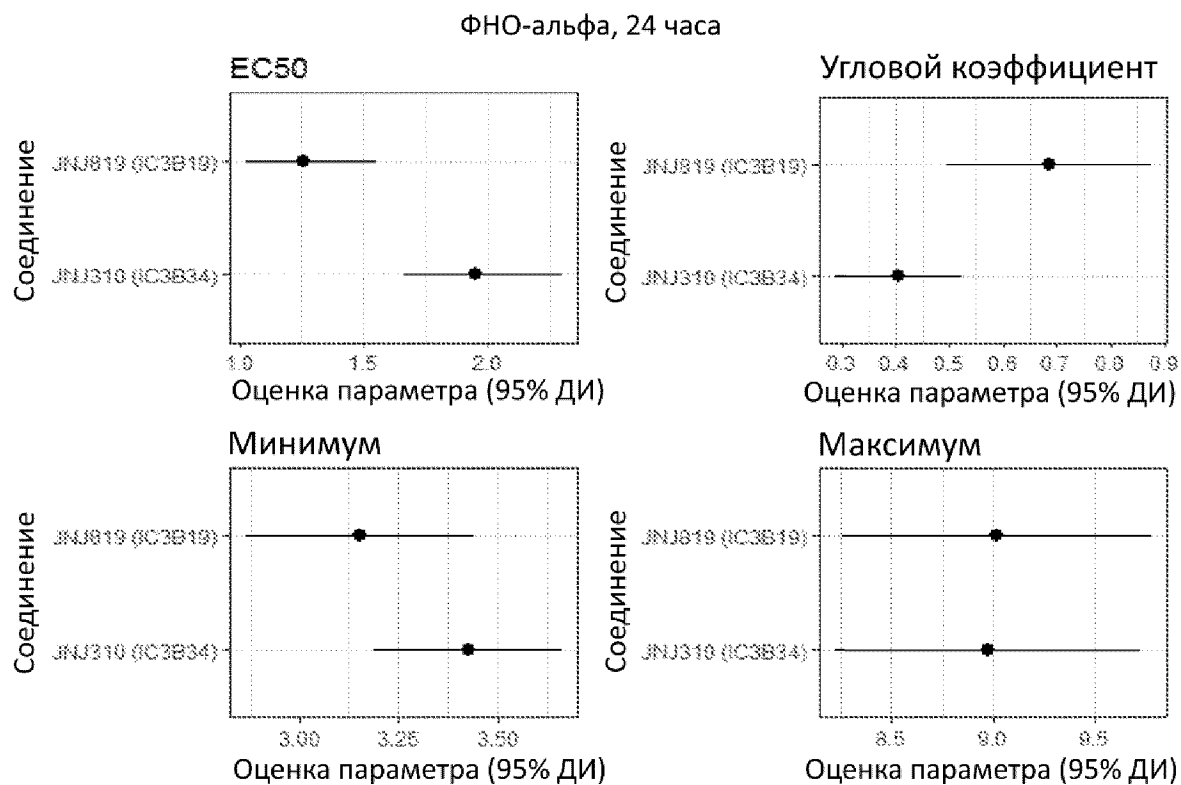
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	р-значение
EC50	1.159 (0.779, 1.726)	2.056 (1.535, 2.753)	0.0266
Углов. коэфф.	0.671 (0.310, 1.031)	0.420 (0.208, 0.633)	0.1678
Минимум	4.123 (3.559, 4.687)	4.527 (4.067, 4.988)	0.2695
Максимум	10.118 (9.235, 11.001)	11.218 (10.102, 12.335)	0.0319

Фиг. 55А



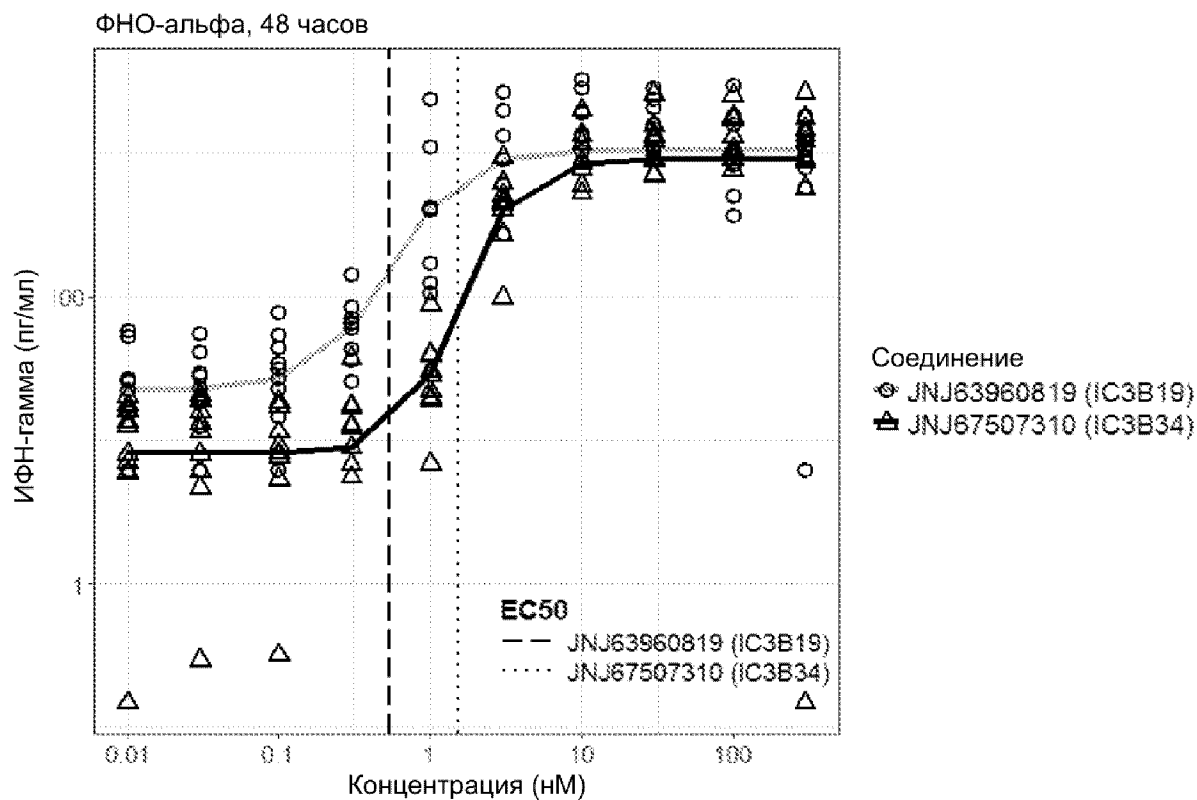
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	0.242	0.53	0.9997
Разность при 0,03	0.233	0.53	0.9998
Разность при 0,1	0.203	0.53	0.9999
Разность при 0,3	-0.362	0.53	0.9918
Разность при 1	-1.258	0.53	0.1120
Разность при 3	0.035	0.53	1.0000
Разность при 10	-0.446	0.53	0.9660
Разность при 30	-0.175	0.53	1.0000
Разность при 100	-0.058	0.53	1.0000
Разность при 300	0.521	0.53	0.9172

Фиг. 55В



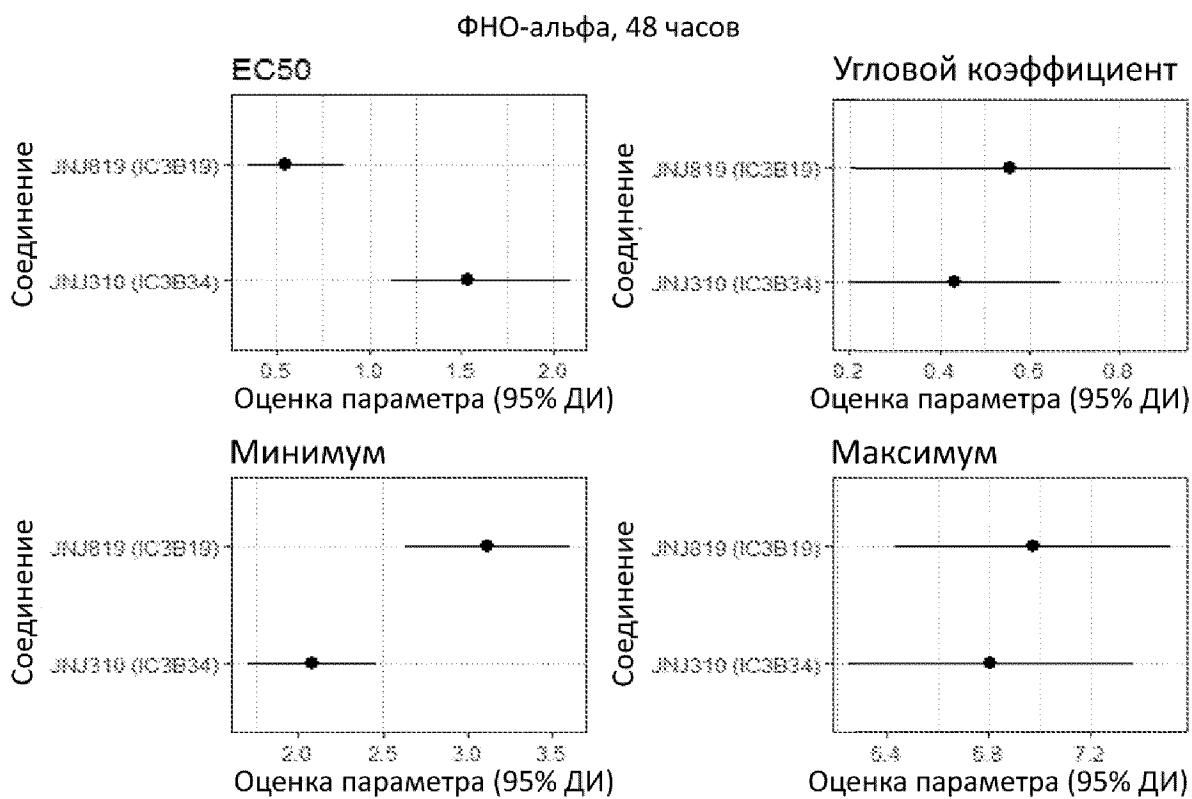
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	1.260 (1.022, 1.555)	1.952 (1.658, 2.298)	0.0016
Углов. коэфф.	0.686 (0.495, 0.876)	0.405 (0.287, 0.523)	0.0128
Минимум	3.151 (2.860, 3.441)	3.425 (3.187, 3.663)	0.1443
Максимум	9.019 (8.263, 9.775)	8.973 (8.226, 9.720)	0.7895

Фиг. 56А



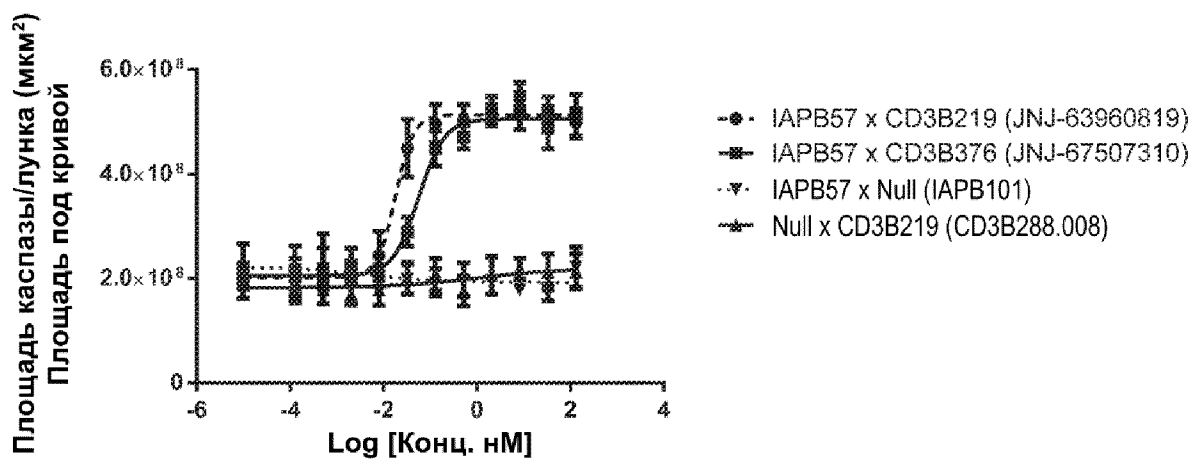
	Разность	Сигма	p-значение
Разность при 0,01	-1.21	0.579	0.2840
Разность при 0,03	-1.099	0.579	0.4088
Разность при 0,1	-1.365	0.579	0.1560
Разность при 0,3	-1.471	0.579	0.0982
Разность при 1	-2.66	0.579	<0.0001
Разность при 3	-0.718	0.579	0.8826
Разность при 10	-0.497	0.579	0.9889
Разность при 30	-0.245	0.579	1.0000
Разность при 100	0.243	0.579	1.0000
Разность при 300	-0.33	0.579	0.9996

Фиг. 56В



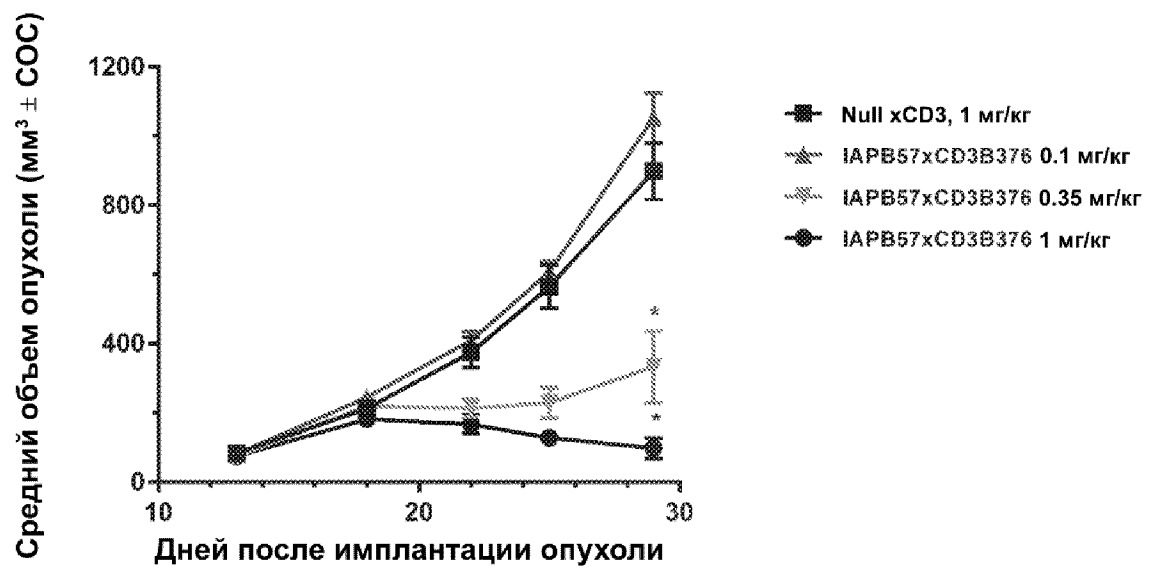
	JNJ819 (IC3B19)	JNJ310 (IC3B34)	p-значение
EC50	0.546 (0.344, 0.866)	1.530 (1.122, 2.087)	0.0004
Углов. коэфф.	0.558 (0.202, 0.915)	0.433 (0.197, 0.668)	0.5553
Минимум	3.116 (2.628, 3.604)	2.083 (1.699, 2.467)	0.0043
Максимум	6.973 (6.431, 7.515)	6.807 (6.248, 7.365)	0.5216

Фиг. 57

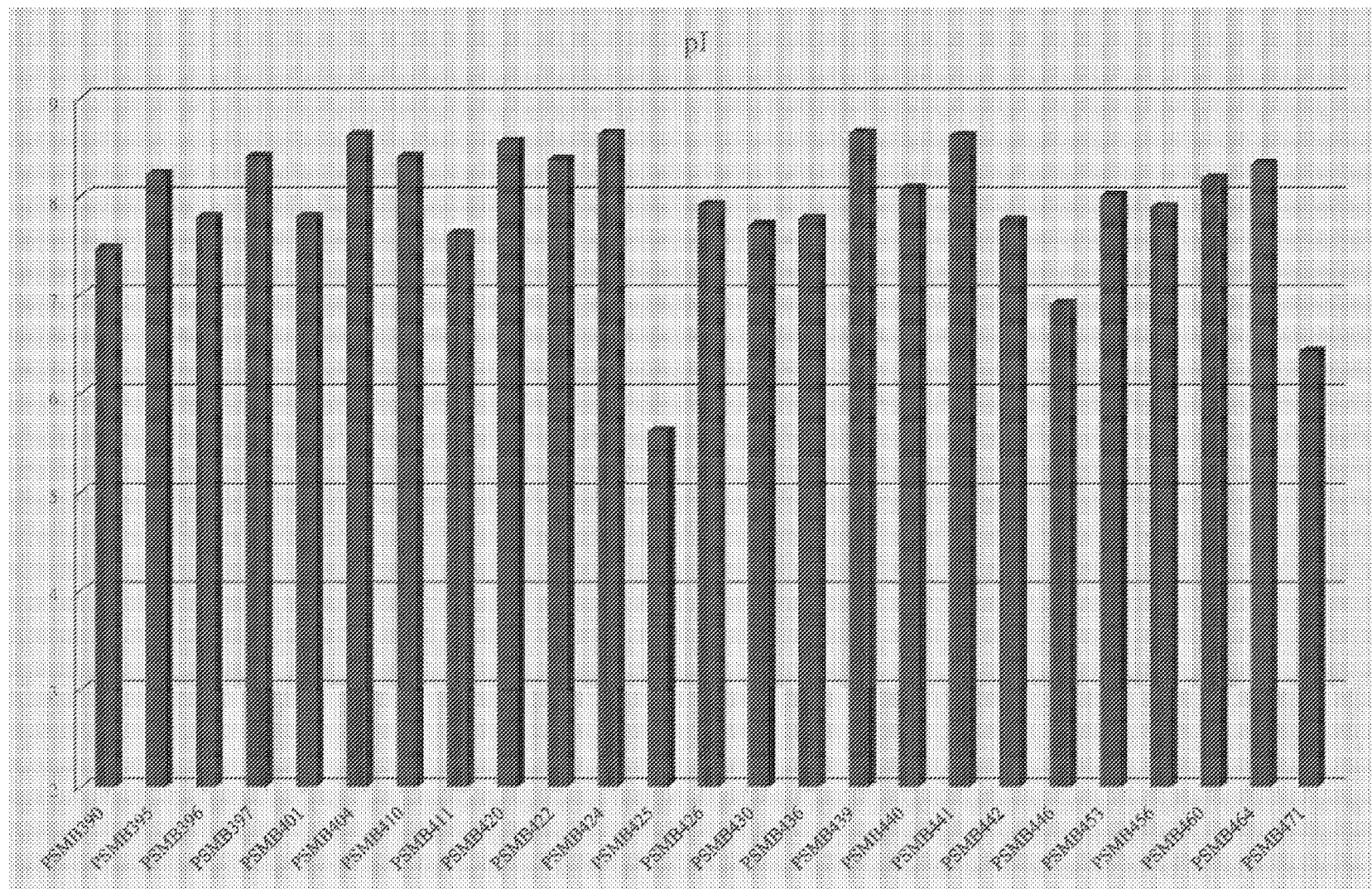


	Аффинность IL1RAP (нМ)	EC ₅₀ цитотокс. (нМ)
JNJ-63960819	0.04	0.018
JNJ-67507310	0.02	0.057

Фиг. 58



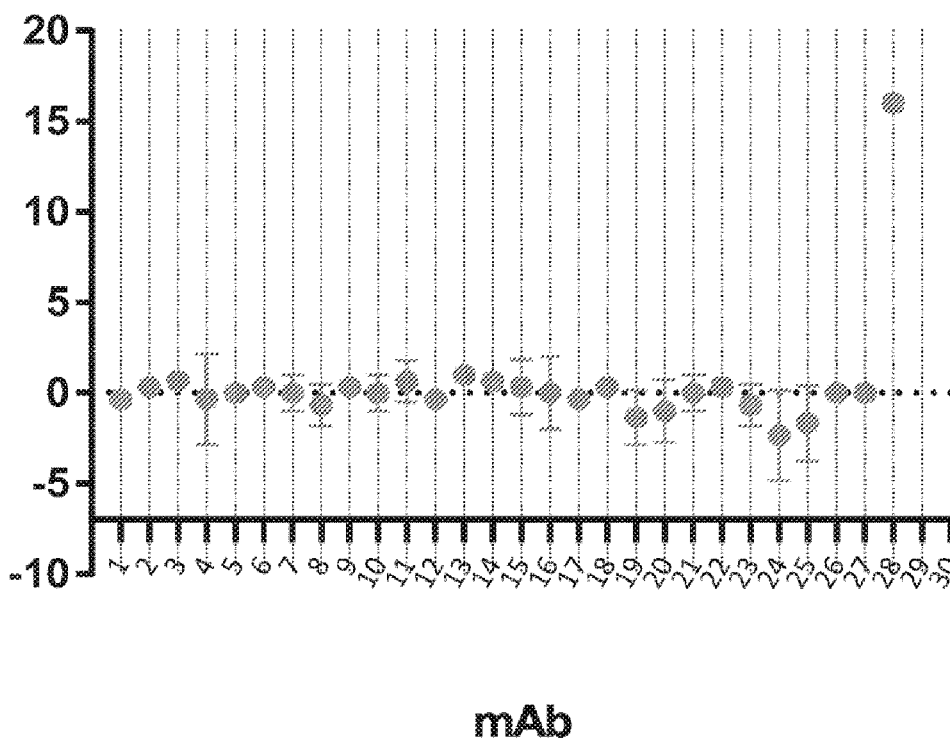
Фиг. 59



Фиг. 60

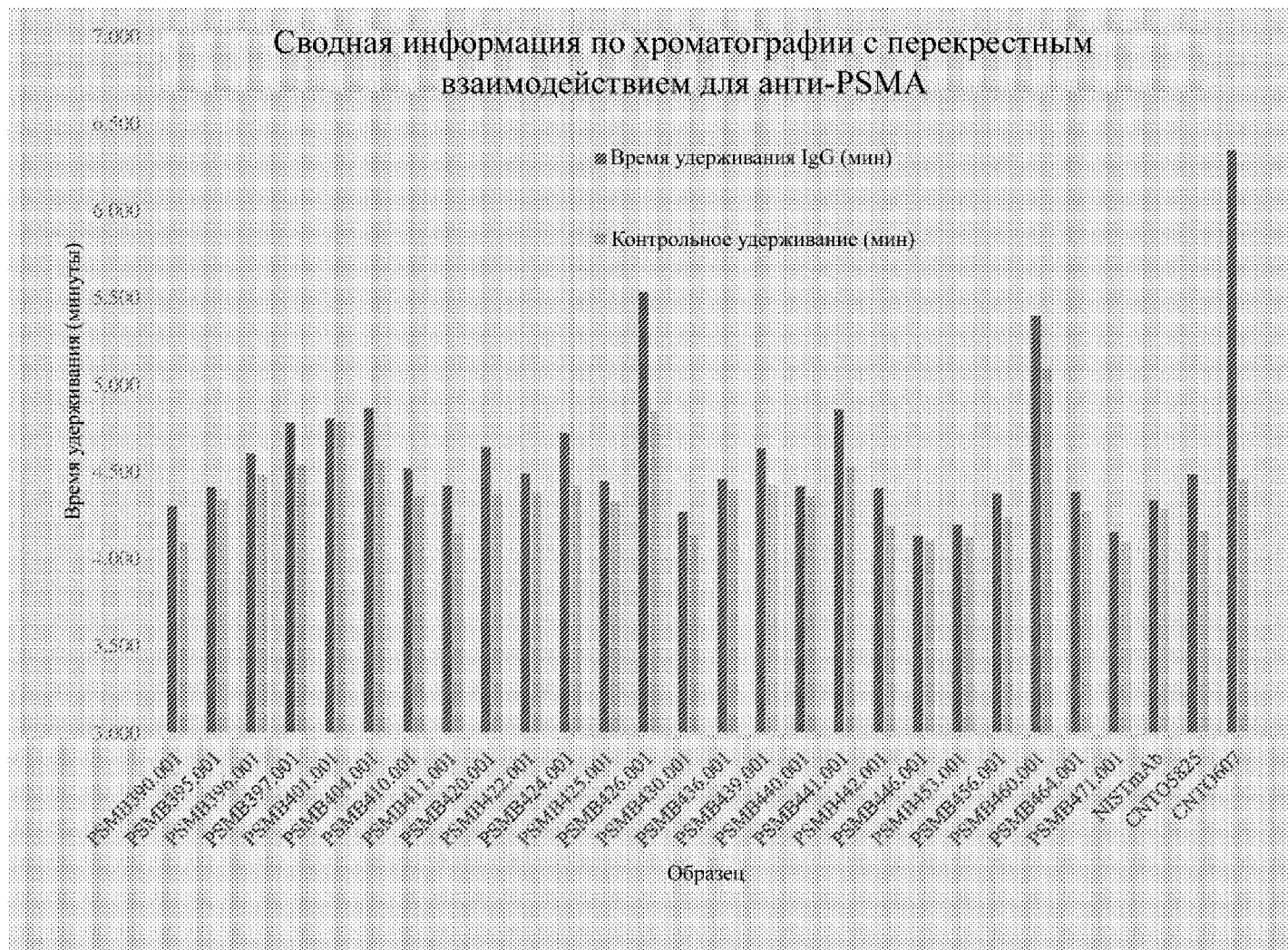
Склонность мкАт к PSMA к самоассоциации (против CNTO5825)

λmax мкАт-λmax CNTO5825

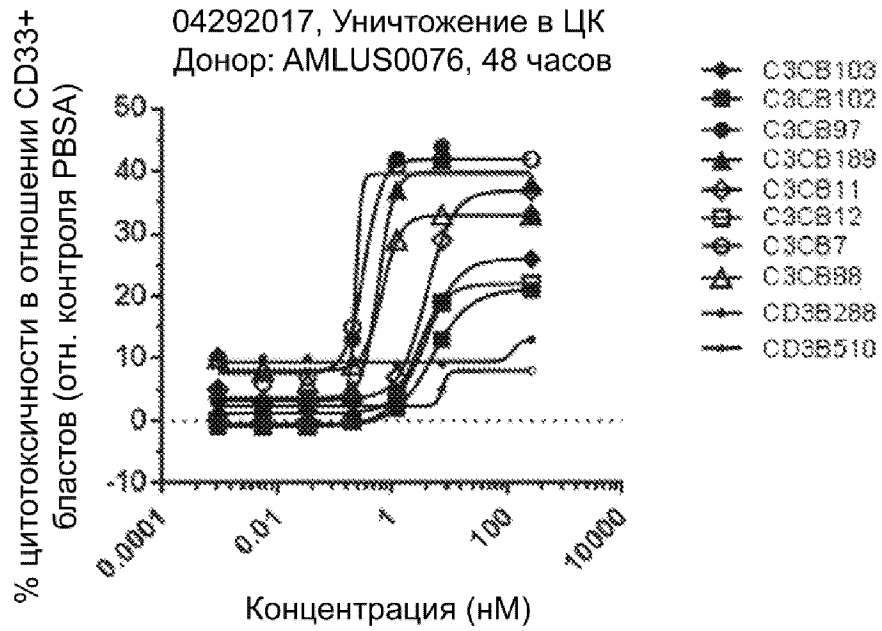


	mAb
1	PSMB390.001
2	PSMB395.001
3	PSMB396.001
4	PSMB397.001
5	PSMB401.001
6	PSMB404.001
7	PSMB410.001
8	PSMB411.001
9	PSMB420.001
10	PSMB422.001
11	PSMB424.001
12	PSMB425.001
13	PSMB426.001
14	PSMB430.001
15	PSMB436.001
16	PSMB439.001
17	PSMB440.001
18	PSMB441.001
19	PSMB442.001
20	PSMB446.001
21	PSMB453.001
22	PSMB456.001
23	PSMB460.001
24	PSMB464.001
25	PSMB471.001
26	NISTmAb
27	CNTO5825
28	CNTO607

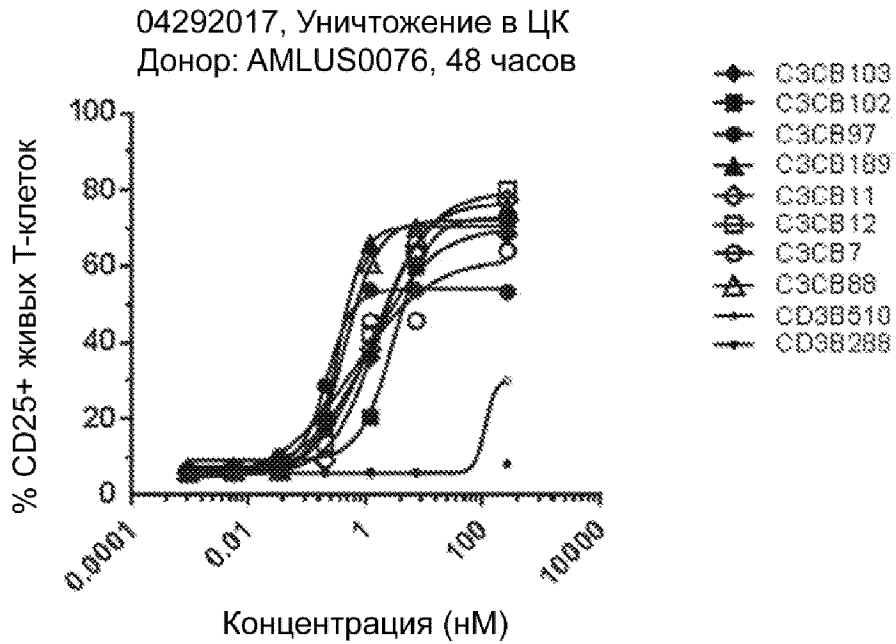
Фиг. 61



Фиг. 62

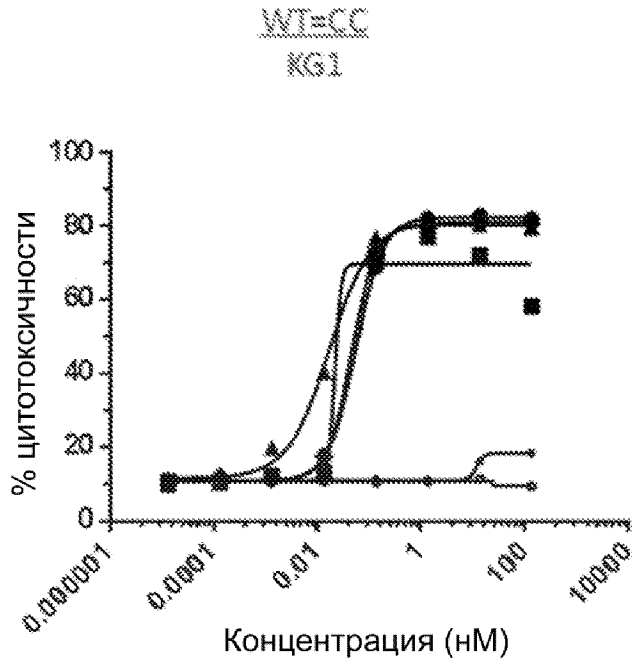


Фиг. 62А

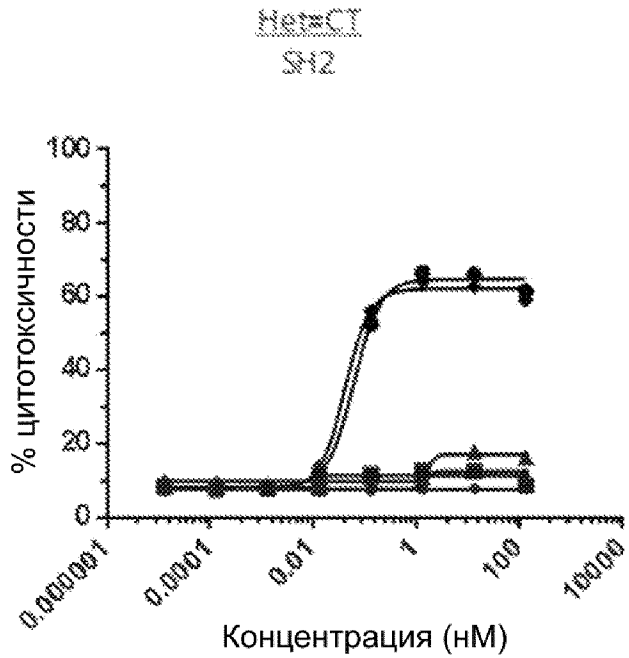


Фиг. 62В

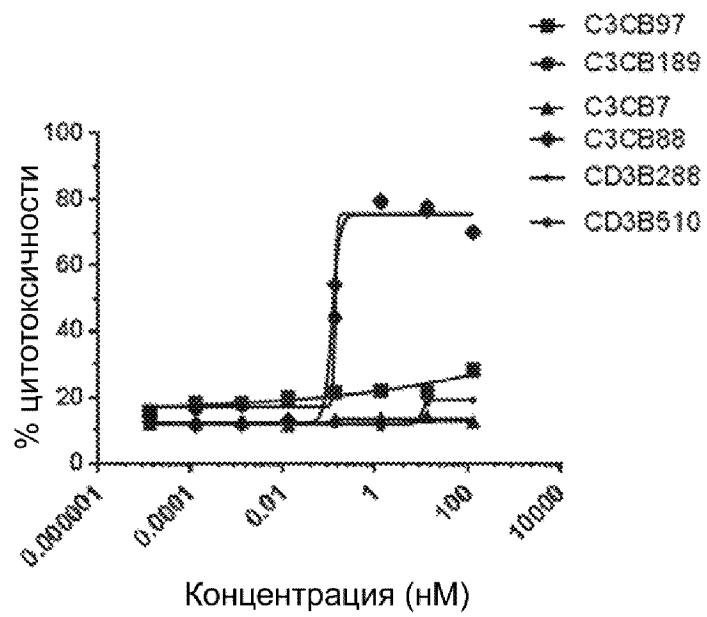
Фиг. 63



Фиг. 63А

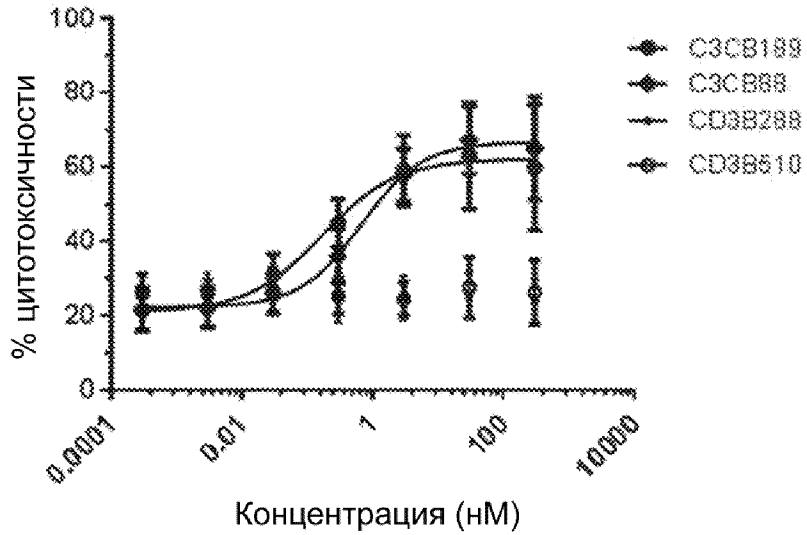


Фиг. 63В



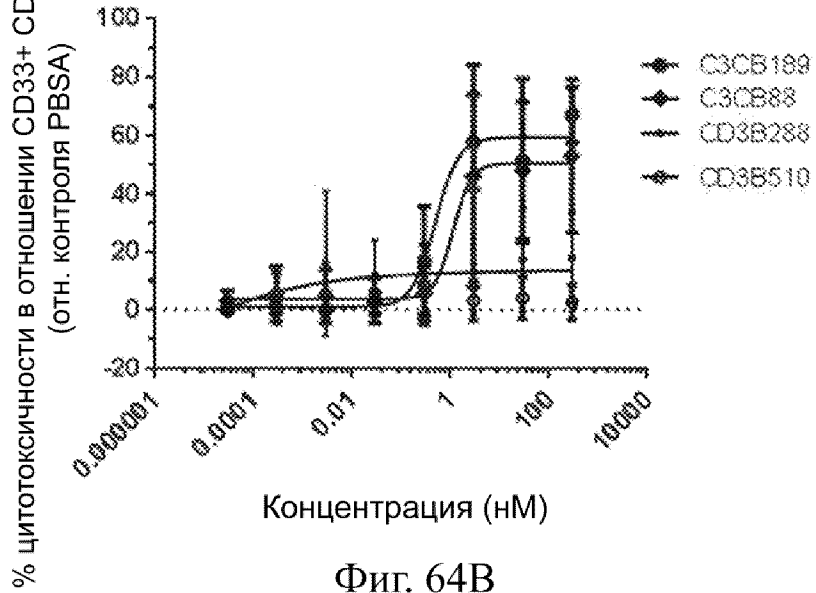
Фиг. 63С

08012017, MOLM13 в нормальной человеческой крови
48 часов, E:T 1:5



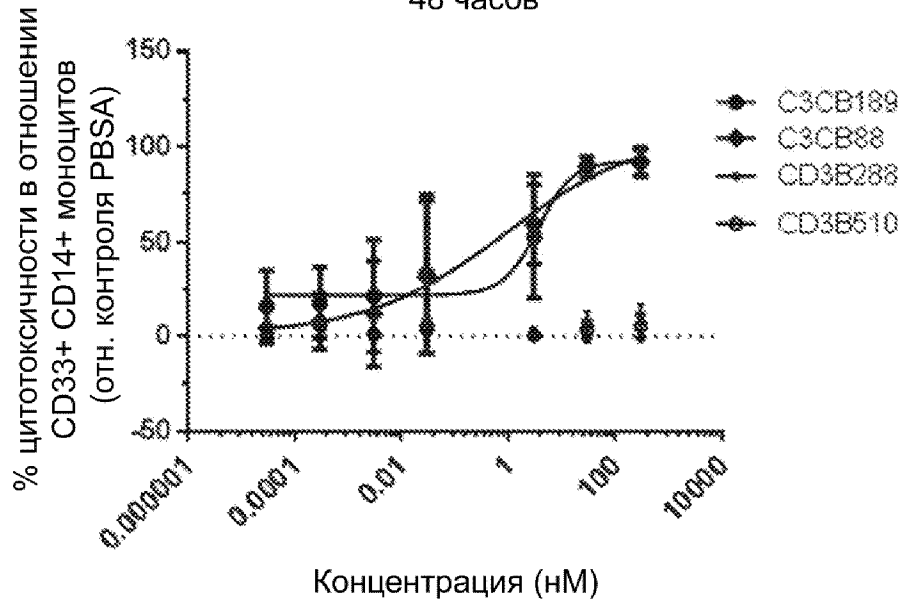
Фиг. 64А

08012017, Цельная кровь человека, n=6
48 часов



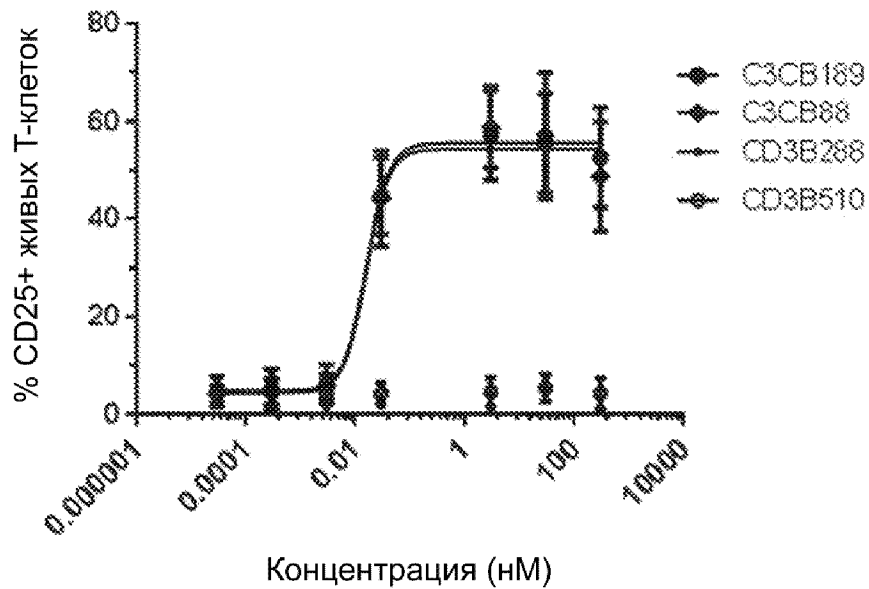
Фиг. 64В

08162017, Цельная кровь яванского макака , N=6
48 часов



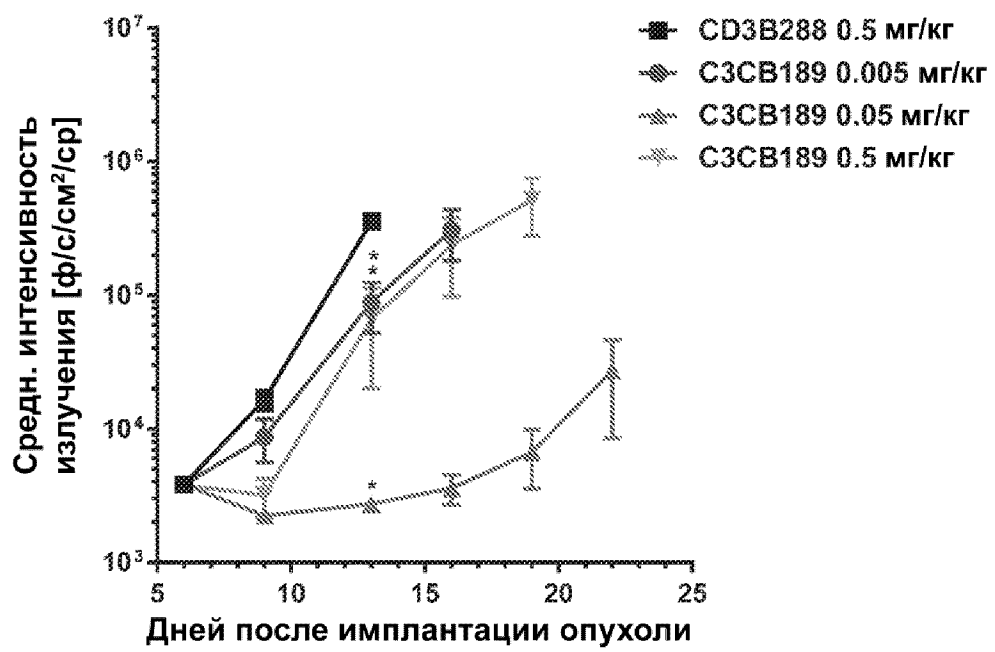
Фиг. 65А

08162017, Цельная кровь яванского макака , N=6
48 часов

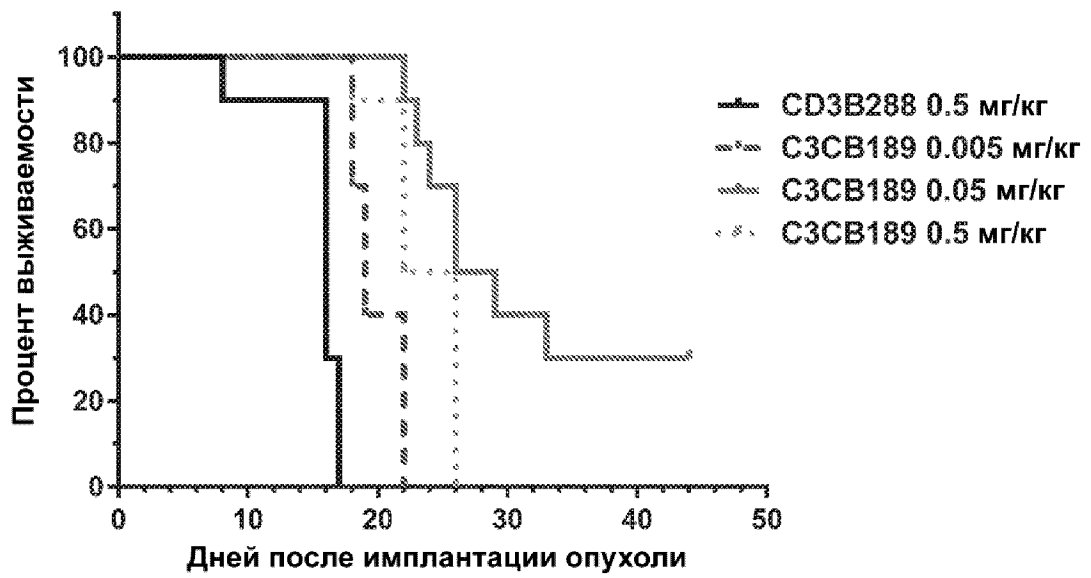


Фиг. 65В

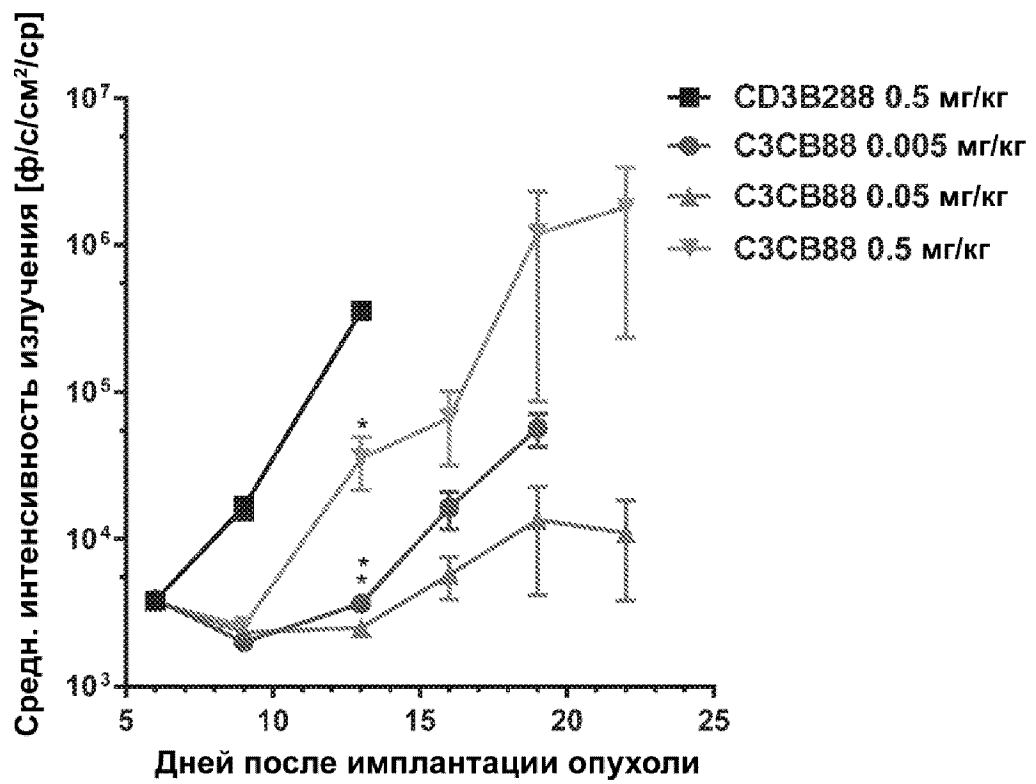
Фиг. 66



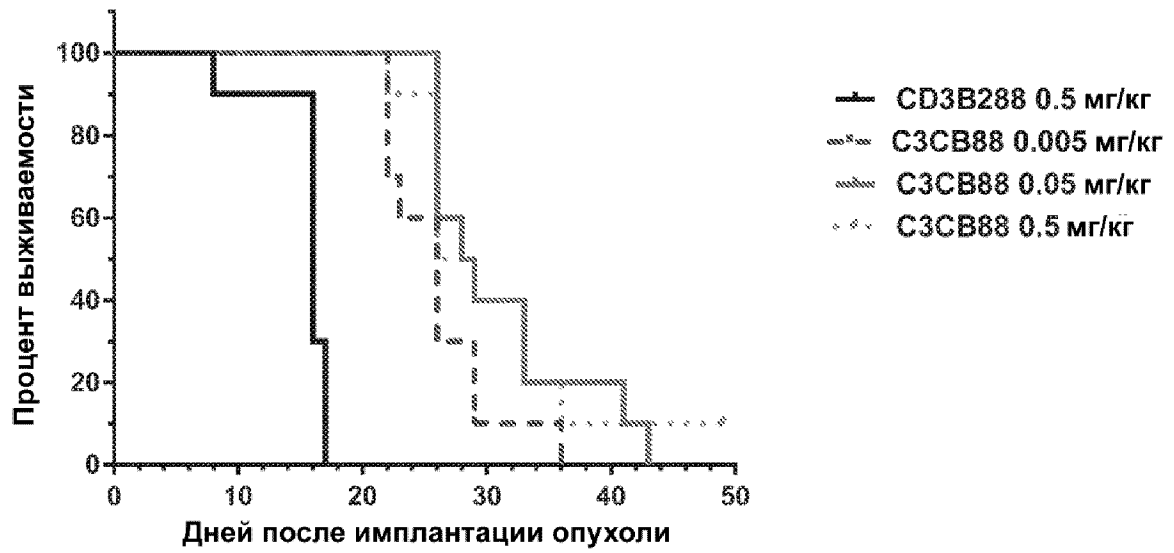
Фиг. 67



Фиг. 68



Фиг. 69



Фиг. 70

25 EVQLLESGGGLVQR-GGSLRPSCAASGFTFS
 27 EVQLLESGGGLVQPPGGSLRLSCAASGFTFS
 87 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS
 89 EVQLLESGGGLVQP-GGSLRLSCAASGFTFS

25 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGFTDY
 27 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGGGSFTSY
 87 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGFTDY
 89 SYSMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGFTDY
 *****,*.*.*

25 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
 27 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAED
 87 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAED
 89 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLHMNSLRAED
 *****:*****:*.*****

25 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
 27 TAVYYCARMPLNSPHDCWGQGLVTVSS
 87 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
 89 TAVYYCARMPLNSPHDYWGQGLVTVSS
 .****

Фиг. 71

```

28      AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
30      AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
88      DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
90      AIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGIR
          *****

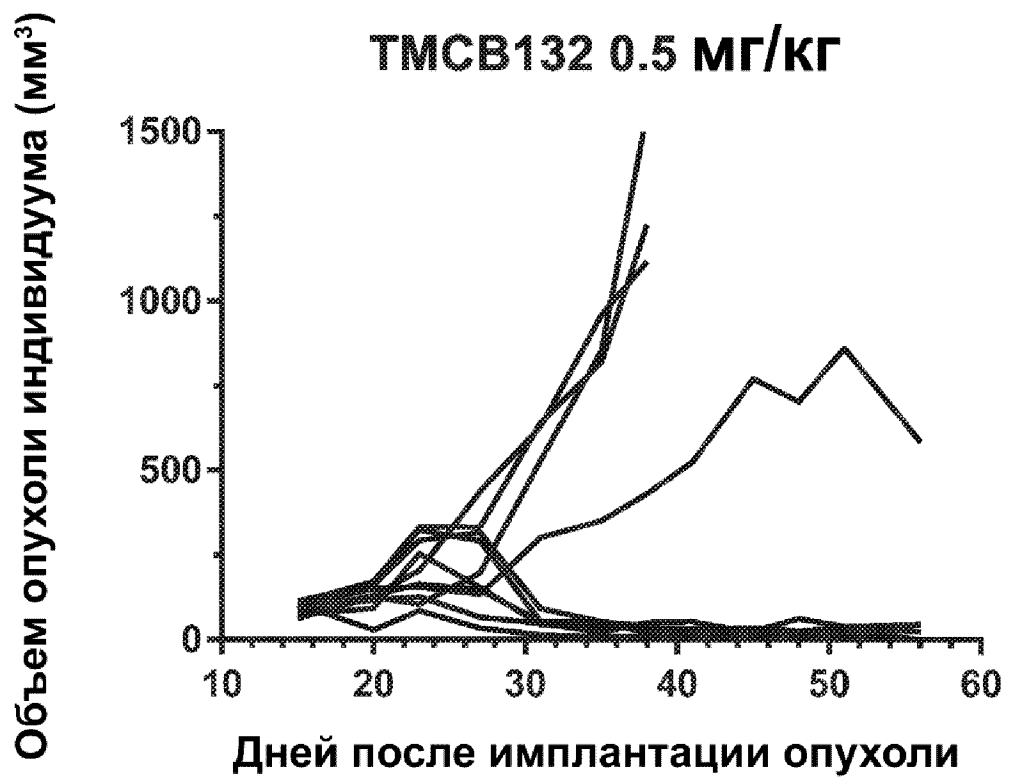
28      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
30      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
88      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
90      NDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
          *****

28      RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ
30      RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ
88      RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ
90      RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQ
          *****

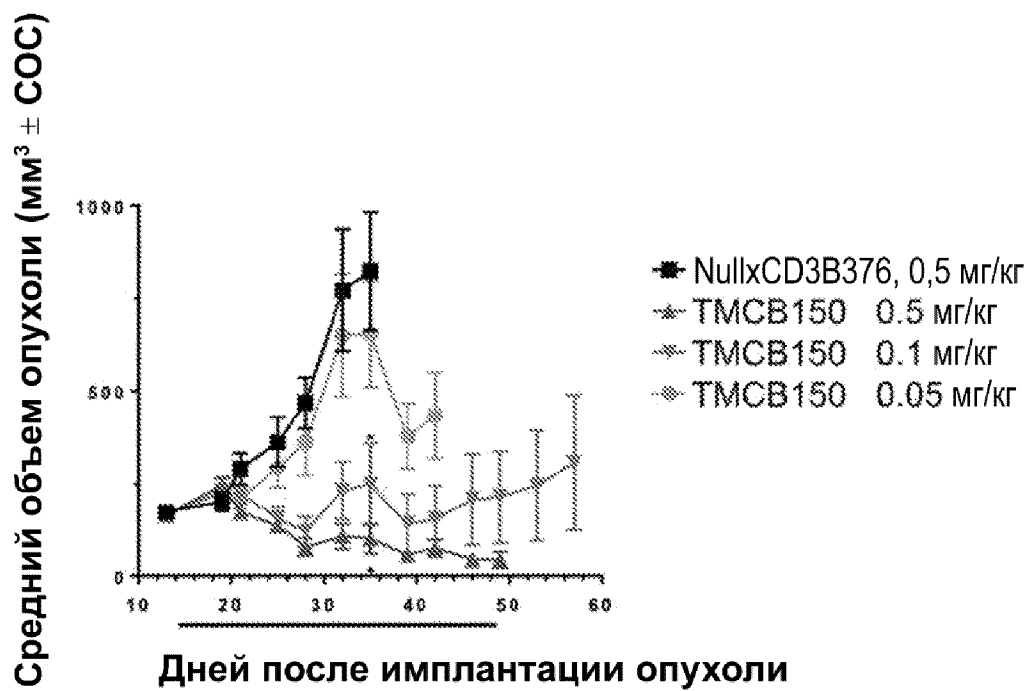
28      DYNALTFGGGTKVEIK
30      DYNYSLTFGGGTKVEIR
88      DYNYPLTFGGGTKVEIK
90      DYNYPLTFGGGTKVEIK
          ****.*****;

```

Фиг. 72

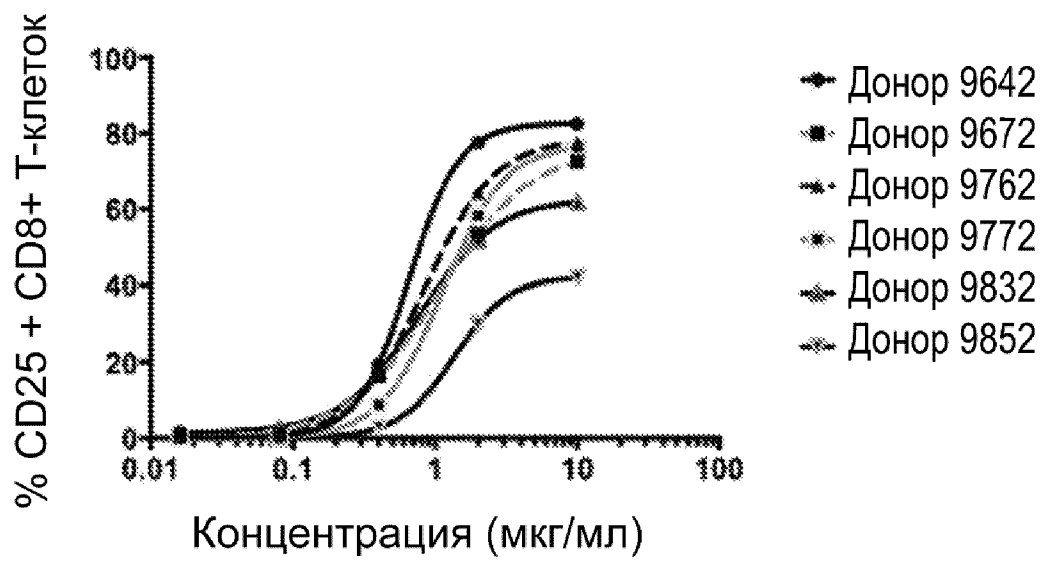


Фиг. 73

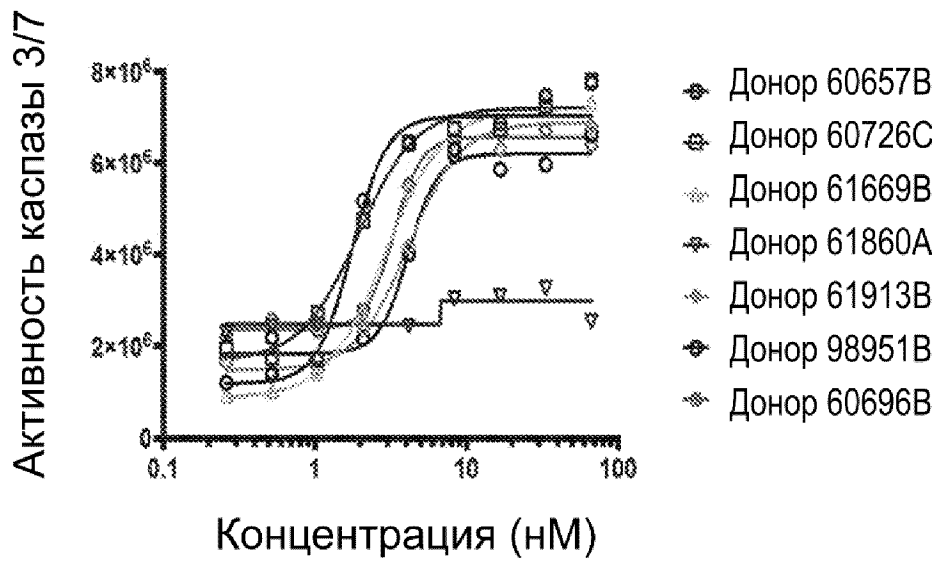


* $P < 0,0001$ для контроля относительно лечения, рассчитанного с помощью линейного анализа смешанных эффектов с последующими парными сравнениями. Столбец под осью X представляет период введения доз

Фиг. 74



Фиг. 75



Фиг. 76

