



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.02.22

(21) Номер заявки
201790961

(22) Дата подачи заявки
2015.11.03

(51) Int. Cl. **C07K 16/46** (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

**(54) ПЕРЕНАЦЕЛИВАЮЩИЕ CD3/CD38 Т-КЛЕТКИ ГЕТЕРОДИМЕРНЫЕ
ИММУНОГЛОБУЛИНЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ**

(31) РСТ/EP2014/073738; 15167034.6

(32) 2014.11.04; 2015.05.08

(33) EP

(43) 2017.10.31

(86) РСТ/EP2015/075628

(87) WO 2016/071355 2016.05.12

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИКНОС САЙЕНСИЗ С.А. (CH)

(72) Изобретатель:
**Оллиер Ромейн, Хоу Самюэль,
Лиссилаа Рами, Скегро Дарко, Бэк
Джонатан (CH)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2011154453
ELLIS JONATHAN H. ET AL.: "Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 155, no. 2, 1 January 1995 (1995-01-01), pages 925-937, XP002146232, ISSN: 0022-1767, abstract, figure 3
WO-A1-2014068114

J. DECKERT ET AL.: "SAR650984, A Novel Humanized CD38-Targeting Antibody, Demonstrates Potent Antitumor Activity in Models of Multiple Myeloma and Other CD38+ Hematologic Malignancies", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, no. 17, 1 September 2014 (2014-09-01), pages 4574-4583, XP055239997, US ISSN: 1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-0695, abstract, page 4578, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 2
WO-A2-2008047242

M. DE WEERS ET AL.: "Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors", THE JOURNAL OF

IMMUNOLOGY, vol. 186, no. 3, 27 December 2010 (2010-12-27), pages 1840-1848, XP55210884, ISSN: 0022-1767, DOI:10.4049/jimmunol.1003032, abstract

WO-A1-2012092612

WO-A1-2015063339

EP-A1-2522724

WO-A2-2012131555

ROBEN P. W. ET AL.: "VH3 family antibodies bind domain D of staphylococcal protein A", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 154, no. 12, 15 June 1995 (1995-06-15), pages 6437-6445, XP002508063, ISSN: 0022-1767, abstract

POTTER K. N. ET AL.: "Staphylococcal protein A binding to VH3 encoded immunoglobulins", INTERNATIONAL REVIEWS OF IMMUNOLOGY, HARWOOD ACADEMIC PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 14, no. 4, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 291-308, XP008116757, ISSN: 0883-0185, abstract

GRAILLE M ET AL.: "Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 97, no. 10, 9 May 2000 (2000-05-09), pages 5399-5404, XP002284947, ISSN: 0027-8424, DOI:10.1073/PNAS.97.10.5399 abstract figure 1; table 1

ALMAGRO JUAN C. ET AL.: "Humanization of antibodies", FRONTIERS IN BIOSCIENCE, FRONTIERS IN BIOSCIENCE, ALBERTSON, NY, US, vol. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1619-1633, XP009126790, ISSN: 1093-9946 p. 1624 right-hand col. 3rd paragraph - p. 1625 right-hand col. 2nd paragraph

WO-A1-2010151792

WO-A1-2014049003

LUM L. G. ET AL.: "Development and prospects for bispecific antibody-based therapeutics in cancer and other applications", EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY 200809 GB, vol. 3, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 1081-1097, XP002752851, ISSN: 1746-0441, page 1088, left-hand column, paragraph 2

(57) Изобретение относится к гетеродимерным иммуноглобулинам, которые нацелены как на компонент антигена CD3 человека, так и на компонент антигена CD38 человека, и к способам их получения. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые связываются с антигеном CD38 человека, их производным для применения в качестве терапевтических или диагностических реагентов и к способам их получения.

Область техники

Настоящее изобретение относится к гетеродимерным иммуноглобулинам, которые нацелены как на компонент антигена CD3 человека, так и на компонент антигена CD38 человека, и к способам их получения. Настоящее изобретение также относится к антителам, которые связываются с антигеном CD38 человека, и их производным для применения в качестве терапевтических или диагностических реагентов и к способам их получения.

Уровень техники

Применение моноклональных антител (МАТ) *in vivo* становится одним из основных направлений рутинной клинической практики лечения различных заболеваний человека, и направленная иммунотерапия с применением МАТ становится критичной для успешного лечения многих форм рака. Примером этого может служить ритуксимаб - химерное антитело к CD20, которое в корне изменило лечение нескольких В-клеточных злокачественных новообразований, таких как фолликулярная лимфома. Тем не менее, В-клетки утрачивают экспрессию CD20 после конечной дифференцировки в плазматические клетки, и, соответственно, ритуксимаб приносит очень ограниченную пользу для лечения множественной миеломы, среди других видов рака.

Молекула CD38 является привлекательной мишенью благодаря своему паттерну экспрессии и двойной роли в качестве рецептора и эктофермента. В частности, было предложено использовать нацеливание на CD38 в качестве средства лечения множественной миеломы и хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL, ХЛЛ).

Перенаправленное уничтожение Т-клетками является желательным механизмом действия во многих терапевтических областях. Было показано, что различные форматы биспецифических антител опосредуют перенацеливание Т-клеток как в доклинических, так и в клинических исследованиях (May C и др., (2012) *Biochem Pharmacol*, 84(9): 1105-12; Frankel SR & Baeuerle PA, (2013) *Curr Opin Chem Biol*, 17(3): 385-92). Все перенацеливающие Т-клетки биспецифические антитела или их фрагменты сконструированы таким образом, чтобы они содержали по меньшей мере два сайта связывания антигена, при этом один сайт связывает антиген на поверхности клетки-мишени, а другой сайт связывает антиген на поверхности Т-клетки. Среди антигенов на поверхности Т-клеток наиболее часто для перенаправления уничтожения Т-клетками использовали субъединицу эпсилон CD3 человека из белкового комплекса TCR.

Для перенацеливания уничтожения Т-клетками применяли многие форматы биспецифических антител, которые включали, в основном тандем фрагментов scFv и форматы на основе диател, при этом было описано лишь несколько примеров форматов биспецифических антител на основе Fc (Moore PA и др., (2011) *Blood*, 117(17): 4542-51; May C и др., (2012), выше; Frankel SR & Baeuerle PA, (2013), выше). У биспецифических форматов, которые будут включать Fc-область из человека, будет более длительный период полувыведения из кровотока, что, возможно, приведет к повышению эффективности и/или к меньшей частоте приема. Среди возможных биспецифических форматов на основе Fc, один предпочтительный формат для перенацеливания уничтожения Т-клетками представляет собой так называемый формат гетеродимера тяжелых цепей. Данный формат представляет особый интерес, так как он не допускает агрегацию множества копий молекул CD3 человека на поверхности Т-клеток, тем самым полностью предотвращая инактивацию Т-клеток (Klein C и др., (2012) *MAbs*, 4(6): 653-63).

Первый описанный способ конструирования гетеродимеров тяжелых цепей представляет собой способ, известный как способ "выступ-во-впадину" (публикация PCT № WO199627011; Merchant AM и др., (1998) *Nat Biotechnol*, 16(7): 677-81). Недавно был описан химический способ, известный как способ обмена Fab-фрагментов, в котором два антитела объединяют в одно биспецифическое антитело путем восстановления и перетасовки *in vitro* половин иммуноглобулинов (публикации PCT № WO2008119353 (Schuurman J и др.) и WO2013060867 (Gramer M и др.); Labrijn AF и др., (2013) *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(13): 5145-50).

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложено антитело или его фрагмент, которые связываются с CD38 человека, содержащие гипервариабельный участок 1 (CDR1) тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 208, и/или CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 209, и/или CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 210; и/или содержащие CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 211, или SEQ ID NO: 214, и/или CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 212, и/или CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 213; или при этом связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD38, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 32, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 33, и CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 34, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 35, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность ами-

нокислот SEQ ID NO: 36.

В соответствии с данным аспектом настоящего изобретения указанное антитело к CD38 или его фрагмент представляют собой антитело мыши, химерное антитело, гуманизированное антитело или полностью человеческое антитело.

В частности, антитело или его фрагмент содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, и/или указанное антитело или его фрагмент содержит последовательность вариабельной области легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариабельной области легкой цепи.

В частности, антитело или его фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот, состоящую из SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, и/или указанное антитело или его фрагмент содержит последовательность легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариабельной области легкой цепи.

В частности, указанное антитело или его фрагмент содержит константные области тяжелой и/или легкой цепей человека, и при этом константная область тяжелой цепи человека выбрана из группы иммуноглобулинов человека, состоящей из IGHG1, нефукозилированного IGHG1 и IGHG4.

Согласно настоящему изобретению также предложены новые биспецифические антитела к CD3/CD38 человека.

В соответствии с настоящим изобретением связывающая мишень часть плеча антитела, связывающего CD3 человека, предпочтительно содержит одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) SP34 или ОКТ3. В частности, если плечо антитела, связывающее CD3 человека, представляет собой SP34, то у него будет лучший профиль экспрессии по сравнению с scFv-Fc, содержащим вариабельные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2, при этом сохраняются его свойства связывания CD3.

В частности, при его экспрессии в виде scFv-Fc наблюдают по меньшей мере двукратное повышение экспрессии по сравнению с химерой SP34 в формате scFv-Fc, содержащей вариабельные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2. Предпочтительно у улучшенного SP34 scFv наблюдают по меньшей мере шестикратное повышение экспрессии по сравнению с химерой SP34 в формате scFv, содержащей вариабельные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2, и наиболее предпочтительно двенадцатикратное повышение экспрессии по сравнению с химерой SP34 в формате scFv, содержащей вариабельные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения, при его экспрессии в виде scFv в биспецифическом антителе, содержащем FАВ-фрагмент, в формате BEAT, наблюдают по меньшей мере двукратное повышение экспрессии по сравнению с химерой SP34 в формате scFv, содержащей вариабельные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2. Предпочтительно у улучшенного SP34 scFv в виде компонента биспецифического антитела BEAT наблюдают по меньшей мере пятикратное повышение экспрессии по сравнению с химерой SP34 в формате scFv, содержащей вариабельные области тяжелой и легкой цепей, кодируемые последовательностями SEQ ID NO: 1 и 2, в виде компонента биспецифического антитела BEAT.

В соответствии с настоящим изобретением каждое из двух связывающих плечей биспецифического антитела к CD3 человека содержит константную область иммуноглобулина, и при этом указанное первое плечо или полипептид связывается с белком А и указанное второе плечо или полипептид не связывается с белком А.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения связывающая эпитоп область полипептида, который связывает белковый комплекс CD3, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 4, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9, и CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи, включающий перечисленные последовательности аминокислот: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; или где связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 163, и CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 164, и CDR3

тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 165; и содержит CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 166, и CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 167, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 168.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения связывающая эпитоп область полипептида, которая связывает белок CD38, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 14, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 15, и CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 18; или где связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD38, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 19, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 20, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 21, и CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 22, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 23, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 24; или связывающая эпитоп область полипептида, которая связывает белок CD38, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 25, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 27, и CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 28, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 29, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 30; или где связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD38, содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 32, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 33, и CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 34, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 35, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 36.

Применение данных новых биспецифических антител к CD3/CD38 человека не ограничено, но включает лечение различных видов рака, аутоиммунных и воспалительных заболеваний у человека. Специфическое разрушение раковых клеток в большей степени, чем здоровых клеток и тканей, представляет собой первоочередную задачу в онкологии. Лекарство, которое сможет безопасно перенаправлять Т-клетки на уничтожение клеток, содержащих ассоциированные с опухолью поверхностные антигены, сможет обеспечить повышенную клиническую эффективность. Известные области с клинически нереализованными потребностями в лечении в онкологии включают, но не ограничены перечисленными заболеваниями: рак молочной железы, метастатический рак молочной железы, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак легких, лимфомы и множественную миелому.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения константная область указанного второго полипептида гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента включает область CH3 IgG3.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения константная область указанного второго полипептида гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента включает область CH3, отличную от таковой из IgG, и указанная не относящаяся к IgG3 область CH3 содержит по меньшей мере одну замену для уменьшения/нарушения связывания с белком А.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения указанная связывающая эпитоп область второго полипептида гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента включает область VH3, содержащую по меньшей мере одну модификацию, которая уменьшает связывание с белком А.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения биспецифических гетеродимеров тяжелых цепей, направленных против CD3/CD38 человека, содержащих по меньшей мере один сайт связывания антигена на основе VH3 из рекомбинантной линии клеток млекопитающего-хозяина, при этом полученное биспецифическое антитело легко выделить после одного этапа хроматографии с белком А с высокой степенью чистоты.

В частности, модифицированная область VH3 содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 57, 65, 81, 82a и комбинации 19/57/59 (нумерация по Kabat), и еще более предпочтительно указанная модифицированная область VH3 содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из 57A, 57E, 65S, 81E, 82aS и комбинации 19G/57A/59A (нумерация по Kabat).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент может содержать дополнительные замены, при этом каркасный участок вариативной области тяжелой цепи содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из: I34M, V48I, A49G, R58N/Y, I69L, A71T и T73K (нумерация по Kabat), и каркасный участок вариативной области легкой цепи содержит замену аминокислоты, выбранную из группы, состоящей из: M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, T51A, R66G, F71Y и P96F (нумерация по Kabat); или при этом каркасный участок вариативной

бельной области тяжелой цепи содержит замены аминокислот I34M, A49G и A71T (нумерация по Kabat) и каркасный участок вариательной области легкой цепи содержит замены аминокислот M4L, L46R, L47W и F71Y (нумерация по Kabat).

В дополнительном варианте реализации связывающая эпитоп область, которая связывается с белковым комплексом CD3, содержит каркасный участок вариательной области тяжелой цепи, который является продуктом или получен из подкласса VH3 человека. Предпочтительно указанный каркасный участок вариательной области тяжелой цепи является продуктом или получен из IGHV3-23 человека. Более предпочтительно каркасный участок вариательной области тяжелой цепи является продуктом или получен из IGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 37). Каркасный участок вариательной области тяжелой цепи содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты из соответствующего каркасного участка вариательной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 1.

В предпочтительном варианте реализации связывающая эпитоп область первого полипептида, который связывается с белковым комплексом CD3, содержит каркасный участок вариательной области легкой цепи, который является продуктом или получен из подкласса VK1 человека или подкласса VK3 человека. Предпочтительно указанный каркасный участок вариательной области легкой цепи является продуктом или получен из VK1-39 или VK3-20 человека. Более предпочтительно указанный каркасный участок вариательной области легкой цепи является продуктом или получен из IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 39) или IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 40) человека. Каркасный участок вариательной области легкой цепи содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты из соответствующего каркасного участка вариательной области легкой цепи соответствующего антитела мыши, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 41 или SEQ ID NO: 2.

В предпочтительном варианте реализации связывающая эпитоп область, которая связывается с белковым комплексом CD3, включает гуманизированный вариательный домен тяжелой цепи, содержащий обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из: I34M, V48I, A49G, R58N/Y, I69L, A71T и T73K (нумерация по Kabat), и гуманизированный вариательный домен легкой цепи, содержащий обратные мутации, выбранные из группы, состоящей из: M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y и P96F (нумерация по Kabat). Более предпочтительно связывающая эпитоп область, которая связывается с белковым комплексом CD3, включает гуманизированный вариательный домен тяжелой цепи, содержащий обратные мутации I34M, A49G и A71T (нумерация по Kabat), и гуманизированный вариательный домен легкой цепи, содержащий обратные мутации M4L, L46R, L47W и F71Y (нумерация по Kabat).

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения предложена связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента,

при этом связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариательную область тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 42, и вариательную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 46; или

при этом связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариательную область тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 44, и вариательную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 47; или

при этом связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариательную область тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 45, и вариательную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 47; или

при этом связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариательную область тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 45, и вариательную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 48; или

при этом связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит вариательную область тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 45, и вариательную область легкой цепи, включающую последовательность аминокислот SEQ ID NO: 49.

Белковый комплекс CD3 содержит множество субъединиц, например, дельта, эпислон и гамма. В предпочтительном варианте реализации связывающая эпитоп область, которая связывается с белковым комплексом CD3, связывается с субъединицей эпислон CD3.

Связывающая эпитоп область, описанная в данном тексте, включает комбинацию одного или более вариательных доменов тяжелой цепи и одного или более комплементарных вариательных доменов легкой цепи, которые вместе образуют сайт связывания, который позволяет специфическое связывание гетеродимерного иммуноглобулина или его фрагмента с одним или более эпитопами. В некотором варианте реализации настоящего изобретения связывающая эпитоп область указанного первого полипептида включает FAB и связывающая эпитоп область указанного второго полипептида включает scFv. В качестве альтернативы, связывающая эпитоп область первого полипептида включает scFv и связывающая эпитоп область второго полипептида включает FAB.

Связывающая эпитоп область, которая связывается с CD38, включает каркасный участок вариательной области тяжелой цепи, который является продуктом или получен из подкласса VH3 человека,

предпочтительно VN3-23 человека, более предпочтительно IGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 37). Каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты из соответствующего каркасного участка вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 50, или 51, или 52. Связывающая эпитоп область дополнительно включает каркасный участок вариабельной области легкой цепи, который является продуктом или получен из подкласса VK1 человека, предпочтительно VK1-39 человека, более предпочтительно IGKV1-39*01 человека (SEQ ID NO: 39). Каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты из соответствующего каркасного участка вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 53 или 54 или 55.

В частности, полипептид, связывающий CD38, содержит пару вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи, кодируемую последовательностями SEQ ID NO: 56/57, 58/59, 60/61 и 62/63.

Было обнаружено, что антитела к CD3 запускают токсическое действие по прямому и непрямому механизмам. Непрямые механизмы опосредованы Fc-областью антитела к CD3, которая взаимодействует с экспрессирующими Fc-рецептор иммунными клетками и приводит к временной активации Т-клеток и высвобождению цитокинов. Следовательно, для того, чтобы улучшить безопасность указанных гетеродимерных иммуноглобулинов или их фрагментов, описанных в данном тексте, константная область иммуноглобулина первого и/или второго полипептида в меньшей степени связывается или не связывается с эффекторными иммунными клетками и/или комплементом C1q. Предпочтительно константная область иммуноглобулина сконструирована таким образом, чтобы нарушить связывание с Fc-рецептором в нижней шарнирной области. Более предпочтительно константная область иммуноглобулина первого и/или второго полипептида содержит замену(ы) L234A и/или L235A (нумерация EU). В наиболее предпочтительном случае константная область иммуноглобулина первого и/или второго полипептида содержит замены L234A и L235A (нумерация EU).

В другом аспекте описания настоящего изобретения также предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, в котором связывающая эпитоп область связывается с субъединицей эпислон CD3 белкового комплекса CD3 и содержит FAB, термическую устойчивость которого выше, чем термическую устойчивость FAB химеры SP34, содержащей вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 1, и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 2, что измеряли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), как описано в табл. 1. Такая повышенная термическая устойчивость будет означать, что у данных улучшенных плечей антител, связывающих SP34, будет повышенная стабильность *in vivo* и *in vitro*, что означает лучшее функционирование в качестве терапевтического средства, а также с точки зрения его стабильности/хранения/срока хранения.

В предпочтительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, связывающиеся с:

i) белковым комплексом CD3 и CD38, при этом последовательность аминокислот указанного первого полипептида представлена в SEQ ID NO: 65, и он соединяется с родственной легкой цепью с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 66, и связывает CD38, и при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида представлена в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, и он связывает CD3 эпислон;

ii) белковым комплексом CD3 и CD38, при этом последовательность аминокислот указанного первого полипептида представлена в SEQ ID NO: 71, и он соединяется с родственной легкой цепью с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 72, и связывает CD38, и при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида представлена в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, и он связывает CD3 эпислон;

iii) белковым комплексом CD3 и CD38, при этом последовательность аминокислот указанного первого полипептида представлена в SEQ ID NO: 73, и он соединяется с родственной легкой цепью с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 74, и связывает CD38, и при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида представлена в SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, и он связывает CD3 эпислон;

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, связывающиеся с белковым комплексом CD3 и CD38, при этом последовательность аминокислот указанного первого полипептида представлена в SEQ ID NO: 75 или 76 и собирается с легкой цепью с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 77, и связывает CD38, и при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида выбрана из группы, включающей последовательности SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, и он связывает CD3 эпислон; белковым комплексом CD3 и CD38, при этом последовательность аминокислот указанного первого полипептида представлена в SEQ ID NO: 78, и он собирается с легкой цепью с последовательностью аминокислот, представленной в SEQ ID NO: 66, и связывает CD38, и при этом последовательность аминокислот указанного второго полипептида выбрана из группы,

включающей последовательности SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69 и SEQ ID NO: 70, и он связывает CD3 эпсилон.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, включающие

(а) первый полипептид, содержащий константную область иммуноглобулина с доменом СН2 и первым сконструированным доменом СН3;

(б) второй полипептид, содержащий константную область иммуноглобулина с доменом СН2 и вторым сконструированным доменом СН3, при этом два указанных полипептида гетеродимеризуются посредством сконструированных доменов СН3; и при этом первый полипептид не связывается с белком А или белком G, а второй полипептид связывается только с белком А и/или с белком G посредством константной области иммуноглобулина; при этом первый сконструированный домен СН3 содержит замены в одном или более из следующих остатков 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90 и второй сконструированный домен СН3 содержит замены по меньшей мере в одном остатке, выбранном из группы 3, 5, 20, 22, 26, 27, 81, 84, 85.1, 86, 88, и при этом указанная вторая цепь также содержит замену в остатке 84.4 согласно нумерации IMGT.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения замена в положении 84.4 выбрана из группы 84.4Q, 84.4V, 84.4A, 84.4S, 84.4T, 84.4N, 84.4G, 84.4L, 84.4L, 84.4Y, 84.4F, 84.4M.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения первый сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 22, 86, 88, и второй сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 7, 84.4, 85.1, 86 согласно нумерации IMGT.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения первый сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 20, 22, 79, 86, 88, и второй сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 7, 26, 84, 84.4, 85.1, 86 согласно нумерации IMGT.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения первый сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90, и второй сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 3, 5, 7, 20, 22, 26, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88, 90.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения первый сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 3, 20, 22, 26, 79, 85.1, 86, 88, 90, и второй сконструированный домен СН3 содержит замены, по меньшей мере, в следующих остатках 3, 5, 7, 20, 22, 26, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88, 90.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения предложен гетеродимерный иммуноглобулин, который содержит первую цепь, содержащую Fc-область изотипа IgG3, которая будет содержать домен СН3 ВТА и не являющийся VH3 вариабельный домен или вариабельный домен на основе VH3, который был лишен способности связываться с белком А (например, с использованием замен G65S или N82aS), или не будет содержать вариабельный домен и, следовательно, не сможет связываться с белком А, и вторую цепь, которая связывает белок А, содержащую домен СН3 ВТВ D401Q (например, происходящий из изотипа IgG1 человека) и либо не являющийся VH3 вариабельный домен, либо вариабельный домен VH3, который был лишен способности связываться с белком А (например, с использованием замен G65S или N82aS), либо не содержащую вариабельный домен.

Краткое описание фигур

Фиг. 1A-F: Все данные фигуры относятся к гуманизации ОКТ3 на стабильных каркасах из человека.

Фиг. 1A-C: Краткое описание гуманизированных кандидатных антител в формате антител IgG1 человека. Окрашивание НРВ-ALL по сравнению с химерным антителом ОКТ3: (-) указывает на отсутствие связывания, (+) более слабое связывание, (++) среднее связывание и (+++) сходное связывание.

Фиг. 1D: Профили ДСК выбранных из кандидатных антител.

Фиг. 1E: Краткое описание гуманизированных кандидатных антител в формате слитых scFv-Fc. Окрашивание НРВ-ALL по сравнению с химерным антителом ОКТ3: (-) указывает на отсутствие связывания, (+) более слабое связывание, (++) среднее связывание и (+++) сходное связывание.

Фиг. 1F: Профили ДСК выбранных кандидатных scFv-Fc.

Фиг. 2A-B: Все данные фигуры относятся к гуманизации SP34 на стабильных каркасах из человека.

Фиг. 2A: Краткое описание гуманизированных кандидатных антител в формате антител IgG1 человека.

Фиг. 2B: Краткое описание гуманизированных кандидатных антител в формате слитых белков scFv-Fc (Fc из изотипа IgG1 человека). Результаты поверхностного плазмонного резонанса (НПР) по сравнению с химерным антителом SP34 к слитым белкам CD3-эпсилон 1-26_Fc человека и яванского макака: (-) указывает на отсутствие связывания, (+) более слабое связывание, (++) среднее связывание, сильное, но не сходное связывание (+++), и (++++) сходное связывание.

На фиг. 3 показаны относительные уровни экспрессии после изменения формата с IgG1 на scFv-Fc для химеры SP34, а также для SP34 H1L21, при котором наблюдали резкое снижение экспрессии.

На фиг. 4 показано влияние на уровень экспрессии SP34 H1L21 ScFv-Fc аланинового сканирования в положениях: T27, G27a, V27c, T28, T29, S30, N31, Y32, N52, K53, R54, P56, L90, Y92, S93, N94 и L95.

На фиг. 5A показано влияние на уровень экспрессии случайной мутации в положении 29 в SP34 H3L23 ScFv-Fc; на фиг. 5B показано влияние на уровень экспрессии случайной мутации в положении 30 в SP34 H3L23 ScFv-Fc; на фиг. 5C показано влияние на уровень экспрессии случайной мутации в положении 95 в SP34 H5L23 ScFv-Fc.

На фиг. 6 показан нормированный уровень экспрессии для нескольких гуманизированных SP34.

Фиг. 7A: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью ППР, между химерным анти-телом HB-7 и антигеном CD38 человека. С сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали белок G и захватывали 200 единиц ответа (RU) химерного антитела HB-7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) впрыскивали при концентрации 125, 31, 7,8, 3,9, 1,9, 1 и 0,5 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P.

Фиг. 7B: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью ППР, между гуманизированным наиболее подходящим антителом HB-7 и антигеном CD38 человека. С сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали белок G и захватывали 200 RU гуманизированного наиболее подходящего антитела HB-7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) впрыскивали при концентрации 50, 25, 12,5, 6,25 и 0,39 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P.

Фиг. 7C: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью ППР, между гуманизированным наиболее подходящим антителом 9G7 и антигеном CD38 человека. С сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали белок G и захватывали 200 RU гуманизированного наиболее подходящего антитела 9G7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) впрыскивали при концентрации 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, и 0,1 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P.

Фиг. 7D: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью ППР, между гуманизированным антителом с наилучшим каркасом 9G7 и антигеном CD38 человека. С сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали белок G и захватывали 200 RU гуманизированного антитела с наилучшим каркасом 9G7. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) впрыскивали при концентрации 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78, 0,39, 0,19, и 0,1 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P.

Фиг. 7E: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью ППР, между антителом 767 человека и антигеном CD38 человека. С сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали белок G и захватывали 200 RU антитела 767 человека. Белок CD38 человека (внеклеточный домен CD38 человека с полигистидиновой меткой) впрыскивали при концентрации 500, 250, 125, 62,5, 31,25, и 15,6 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Аффинность получали из графика равновесного ответа (Req) в зависимости от концентрации аналита (C) в соответствии со следующим уравнением: $Req = K_A \times C \times R_{jmax} / (K_A \times C + 1)$, концентрация при 50% насыщении представляла собой KD. Все результаты ГШР выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Фиг. 7F: Профили ДСК наиболее подходящих химерного HB-7 и гуманизированного HB-7 антител.

Фиг. 7G: Профили ДСК наиболее подходящих химерного 9G7 и гуманизированного 9G7 антител.

Фиг. 7H: Профили ДСК гуманизированного антитела с наилучшим каркасом 9G7.

Фиг. 7I: Профили ДСК клона 767 антитела человека.

Фиг. 7J: Сводная таблица для гуманизированных антител 9G7.

Фиг. 8: Схематическое изображение наиболее подходящего BEAT CD38-HB7/CD3 15 (формат A) и BEAT CD3 8-767/CD3 (формат B) антител. [(A+)] означает функциональный сайт связывания белка A. [(A-)] означает нефункциональный сайт связывания белка A.

Фиг. 9A: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью НИР, между наиболее подходящим BEAT CD38-HB7/CD3 антителом и антигеном CD38 человека. С 20 сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали белок G и захватывали 200 RU наиболее подходящего BEAT CD38-HB7/CD3 антитела. Белок CD38 человека (меченый полигистидином белок) впрыскивали при концентрации 50, 25, 12,5, 6,25 и 0,39 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Результаты выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Фиг. 9B: Профиль 25 ДСК наиболее подходящего BEAT CD38-HB7/CD3 антитела.

Фиг. 10: Пример перенацеливания наиболее подходящим BEAT CD38-HB7/CD3 антителом уничтожения Т-клетками.

Считывание данных: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: очищенные Т-клетки 30 человека. Отношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 10:1. Среднее значение по двум донорам после 48 ч инкубации. Клетки-мишени: RPMI 8226. Концентрация антитела показана в нМ.

Фиг. 11: Пример перенацеливания антителом BEAT CD38-767/CD3(SP34) уничтожения Т-клетками. Считывание данных: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека. Отношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 10:1. Среднее значение по трем донорам после 24 ч инкубации. Клетки-мишени: Daudi. Концентрация антитела показана в нМ.

Фиг. 12: Схематическое изображение наиболее подходящего BEAT CD38-HB7/CD3(SP34) (формат А) и наиболее подходящего BEAT CD38-9G7/CD3(SP34-каппа2) (формат В) антител. [(А+)] означает функциональный сайт связывания белка А.

Фиг. 13: Пример перенацеливания наиболее подходящим BEAT CD38-HB7/CD3(SP34) антителом уничтожения Т-клетками. Считывание данных: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: МКПК человека. Отношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 10:1. Среднее значение по трем донорам после 24 ч инкубации. Клетки-мишени: клетки Daudi. Концентрация антитела показана в нМ.

Фиг. 14: Взаимодействие антитело-антиген, измеренное с помощью НИР, между наиболее подходящим антителом BEAT CD38-9G7/CD3(SP34-каппа2) и слитым белком CD3 эпсилон 1-26 человека_Fc. С сенсорным чипом CM5 ковалентно связывали 500 RU слитого белка CD3 эпсилон 1-26 человека_Fc. Наиболее подходящее антитело BEAT CD38-9G7/CD3(SP34-каппа2) впрыскивали при концентрации 50, 25, 12,5, 6,2, 3,1, 0,8 и 0,4 нМ при скорости потока 30 мкл/мин в HBS-P. Результаты выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Фиг. 15: Пример перенацеливания уничтожения Т-клетками антителом BEAT CD38/CD3(SP34-каппа2). Считывание данных: метод RDL-FACS. Эффекторные клетки: МКПК человека. Отношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 10:1.

Среднее значение по трем донорам после 24 ч инкубации. Клетки-мишени: клетки Daudi. Концентрация антитела показана в нМ.

На фиг. 16 показана эффективность в анализе RDL нескольких биспецифических антител CD38/CD3, в которых связывающее плечо CD3 антитела содержит исходный SP34 мыши в формате, измененном на scFv (SEQ ID NO: 137), или модифицированные гуманизированные scFv SP34, содержащие указанные комбинации тяжелых/легких цепей: H1/L21 (SEQ ID NO: 67), H5/L32 (SEQ ID NO: 68), H5/L65 (SEQ ID NO: 69) и H5/L67 (SEQ ID NO: 70).

Фиг. 17: Анализ ПААГ/ДСН в невозстанавливающих условиях гомодимеров ВТВ с молекулой scFv, связывающейся с белком А (группа дорожек 1), и без нее (группа дорожек 2). Очистка с применением аффинной хроматографии: элюированные и нейтрализованные фракции анализировали после хроматографии с белком А (А) или хроматографии с белком G (G). Для группы 2 собирали проточные или не связавшиеся фракции и показали отсутствие связывания с белком А или G (сокращенно A ft и G ft, соответственно). Элюирование проводили при pH 3,0. [(А+)] означает сайт связывания с белком А. Указаны маркеры молекулярной массы (кДа).

Фиг. 18А: Анализ ПААГ/ДСН в невозстанавливающих условиях гетеродимера BEAT, содержащего только один сайт связывания с белком А в цепи ВТВ, несущей замену D401Q. Очистка с применением аффинной хроматографии: элюированные и нейтрализованные фракции анализировали после хроматографии с белком А (А) или хроматографии с белком G (G). Элюирование проводили при pH 3,0. [(А+)] означает сайт связывания с белком А. Указаны маркеры молекулярной массы (кДа); 18В: ПААГ/ДСН анализ гетеродимера BEAT, содержащего только один сайт связывания с белком А в цепи ВТВ, в которой нет замены D401Q. Очистка с применением аффинной хроматографии: элюированные и нейтрализованные фракции анализировали после хроматографии с белком А (А) или хроматографии с белком G (G). Элюирование проводили при pH 3,0. [(А+)] означает сайт связывания с белком А. Указаны маркеры молекулярной массы (кДа).

Фиг. 19: На диаграммах показано количество на мкл крови клеток из популяции CD4+ (непрерывная линия) и популяции CD8+ (пунктирная линия) для обоих животных, которым вводили путем инъекции CD3/CD38 BEAT. На верхних диаграммах показаны количества для животных, которым вводили дозу 1 мкг/кг. На нижних диаграммах показаны количества для животных, которым вводили дозу 10 мкг/кг. Количества в нулевые моменты времени соответствуют образцам, собранным в день 1 перед введением дозы.

Фиг. 20: На диаграммах показано количество на мкл крови клеток из популяции моноцитов CD14+CD38+ для обоих животных, которым вводили путем инъекции CD3/CD38 BEAT. На верхних диаграммах показаны количества для животных, которым вводили дозу 1 мкг/кг. На нижних диаграммах показаны количества для животных, которым вводили дозу 10 мкг/кг. Количества в нулевые моменты времени соответствуют образцам, собранным в день 1 перед введением дозы.

Фиг. 21: На диаграммах показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) красителя флюо-4 как функция времени в секундах. На каждой диаграмме показано условие с контролем изотипа. После сбора фоновых данных в течение 40 с указанные антитела добавляли в образцы и сбор данных возобновляли. Контроль изотипа представлял собой антитело IgG1 человека. Повышение MFI свидетельствует о мобилизации кальция в цитоплазму клеток.

Фиг. 22: Картирование эпитопов гуманизированного антитела 9G7 с помощью ППП с применением слитых белков пептид-Fc, полученных из внеклеточного домена CD38 человека. Результаты выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Фиг. 23: Трехмерная визуализация внеклеточного домена CD38 человека. Последовательность пептида F6 закрашена серым цветом, положения M110 и T148 закрашены черным цветом.

Фиг. 24: Картирование эпитопов гуманизированных антител 9G7 и SAR650984 с помощью ППП с

применением внеклеточных доменов CD38 человека и яванского макака. Результаты выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Фиг. 25: Картирование эпитопов антитела 767 человека с помощью ППР с применением слитых белков пептид-Fc, полученных из внеклеточного домена CD38 человека. Результаты выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Фиг. 26: Трехмерная визуализация внеклеточного домена CD38 человека. Последовательность пептида F3 закрашена серым цветом, положения E76 и H79 закрашены черным цветом.

Фиг. 27: Картирование эпитопов гуманизированного антитела SAR650984 с помощью ППР с применением слитых белков пептид-Fc, полученных из внеклеточного домена CD38 человека. Результаты выражены в виде количества единиц ответа (сокращенно RU; ось y) в зависимости от времени (ось x).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение в общем смысле относится к новым гетеродимерным иммуноглобулинам, которые связываются с белковым комплексом CD3 и с антигеном CD38.

Более того, у данных гетеродимерных иммуноглобулинов снижено или предотвращено связывание с белком А и, следовательно, их можно очистить до очень высокой степени чистоты, применяя аффинную хроматографию.

С целью объяснения настоящей заявки будут использоваться следующие определения, и всякий раз, когда это применимо, термины, использованные в единственном числе, также будут включать множественное число, и наоборот. Должно быть очевидно, что терминология, используемая в данном тексте, предназначена исключительно для описания конкретных вариантов реализации и не предназначена для ограничения.

Термины "полипептид" и "белок" относятся к полимеру из аминокислотных остатков, в котором аминокислоты объединены посредством пептидных связей с образованием цепи аминокислот, которые были связаны друг с другом путем синтеза дегидрированием. Полипептиды и белки можно синтезировать путем химического синтеза или рекомбинантной экспрессии, и они не ограничены минимальной длиной в аминокислотах.

В соответствии с настоящим изобретением группа полипептидов включает "белки" при условии, что данные белки состоят из одной полипептидной цепи. Полипептиды могут дополнительно образовывать мультимеры, такие как димеры, тримеры и олигомеры более высокого порядка, т.е. состоящие из более чем одной полипептидной молекулы. Полипептидные молекулы, образующие такие димеры, тримеры и т.д., могут быть идентичными или неидентичными. Соответствующие структуры таких мультимеров более высокого порядка, следовательно, называют гомо- или гетеродимерами, гомо- или гетеротримерами и т.д. Примером гетеромультимера является молекула антитела, которая, в своей встречающейся в природе форме, состоит из двух идентичных легких полипептидных цепей и двух идентичных тяжелых полипептидных цепей. Термины "полипептид" и "белок" также относятся к естественным образом модифицированным полипептидам/белкам, в которых модификация осуществляется, например, посредством посттрансляционных модификаций, таких как гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование и тому подобные модификации. Такие модификации хорошо известны в данной области. Более того, для целей настоящего изобретения "полипептид" относится к белку, который содержит модификации, такие как делеции, вставки и замены (которые могут быть консервативными по своей природе), в нативной последовательности. Данные модификации могут быть преднамеренными, например, введенными посредством сайт-направленного мутагенеза, или могут быть случайными, например, возникшими в результате мутаций у хозяев, которые продуцируют указанные белки, или ошибок при амплификации путем полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Термин "комплекс CD3" в данном тексте относится к белковому комплексу, известному как корецептор Т-клеток CD3 (кластер дифференцировки 3) (Wucherpfennig KW и др., (2010) Cold Spring Harb Perspect Biol, 2(4): a005140). Белковый комплекс CD3 состоит из четырех различных цепей. У млекопитающих данный комплекс включает цепь CD3 γ , цепь CD3 δ и две цепи CD3 ϵ . Данные цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и с ζ -цепью, что приводит к генерированию активирующего сигнала в Т-лимфоцитах (van der Merwe PA & Dushek O (2011) Nat Rev Immunol, 11(1): 47-55). TCR, ζ -цепь и молекулы CD3 вместе составляют комплекс TCR. Цепи CD3 γ , CD3 δ и CD3 ϵ представляют собой высокородственные белки клеточной поверхности суперсемейства иммуноглобулинов, содержащие один внеклеточный домен иммуноглобулина. Внутриклеточные хвосты молекул CD3 содержат один консервативный мотив, известный как иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив, или короче ITAM, который необходим для способности TCR передавать сигнал. Поскольку CD3 необходим для активации Т-клеток, то лекарственные средства (часто моноклональные антитела), которые нацелены на CD3, исследовали и сейчас исследуют как иммуносупрессорные лекарственные средства.

Термин "иммуноглобулин", упоминаемый в данном тексте, можно применять взаимозаменяемо с термином "антитело". Иммуноглобулин включает полноразмерные антитела и любой связывающий антиген фрагмент антитела или отдельные цепи антитела. Иммуноглобулины могут быть гомодимерными

или гетеродимерными. Иммуноглобулины и, в частности, встречающиеся в природе антитела, представляют собой гликопротеины, которые существуют в виде одной или более копий единиц в форме Y, состоящих из четырех полипептидных цепей. Каждая единица в форме "Y" содержит две идентичные копии тяжелой (H) цепи и две идентичные копии легкой (L) цепи, названных так в соответствии с их относительными молекулярными массами. Каждая легкая цепь образует пару с тяжелой цепью и каждая тяжелая цепь образует пару с другой тяжелой цепью. Ковалентные дисульфидные связи между цепями и нековалентные взаимодействия связывают указанные цепи друг с другом. Иммуноглобулины и, в частности, встречающиеся в природе антитела содержат вариабельные области, которые представляют собой две копии сайта связывания антигена. Папаин, протеолитический фермент, расщепляет единицу в форме "Y" на три отдельные молекулы: два так называемых фрагмента "Fab" или "FAB" (Fab = фрагмент, связывающий антиген) и один так называемый фрагмент "Fc" или "Fc-область" (Fc = кристаллизуемый фрагмент). Фрагмент Fab состоит из целой легкой цепи и части тяжелой цепи. Тяжелая цепь содержит одну вариабельную область (VH) и либо три, либо четыре константные области (CH1, CH2, CH3 и CH4, в зависимости от класса или изотипа антитела). Область между областями CH1 и CH2 называют шарнирной областью, и она обеспечивает гибкость между двумя фрагментами FAB молекулы антитела в форме Y, позволяя им открываться и закрываться, чтобы дать пространство для связывания с двумя антигенными детерминантами, разделенными фиксированным расстоянием. "Шарнирная область", упоминаемая в данном тексте, представляет собой участок последовательности длиной 6-62 аминокислоты, присутствующий только в IgA, IgD и IgG, который включает остатки цистеина, которые соединяют мостиком две тяжелые цепи. Каждая из тяжелых цепей IgA, IgD и IgG содержит четыре области, т.е., одну вариабельную область (VH) и три константные области (CH1-3). IgE и IgM содержат одну вариабельную и четыре константные области (CH1-4) на тяжелой цепи. Константные области иммуноглобулинов могут опосредовать связывание с тканями или факторами хозяев, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классического пути системы комплемента. Каждая легкая цепь обычно связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью. Каждая легкая цепь содержит одну вариабельную область (VL) и одну константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи представляет собой константную область легкой цепи каппа, обозначенную в данном тексте IGKC, или представляет собой константную область легкой цепи лямбда, обозначенную в данном тексте IGLC. IGKC используют в данном тексте эквивалентно Ск или СК, и данный термин имеет такое же значение. IGLC используют в данном тексте эквивалентно Сλ или CL, и данный термин имеет такое же значение. Термин "область IGLC" в данном тексте относится ко всем константным областям легкой цепи лямбда, например ко всем константным областям легкой цепи лямбда, выбранным из группы, состоящей из IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7. Области VH и VL можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), которые чередуются с участками, которые более консервативны, названными каркасными участками (FR или FW). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающую эпитоп область, которая взаимодействует с антигеном. Сконструированные иммуноглобулины могут включать различные форматы связывающих эпитоп областей, такие как фрагменты scFv, FAB или dAb. Данные фрагменты обычно соединяют с получением подобной антителу структуры путем генетического присоединения к Fc-области IgG. Сконструированные иммуноглобулины можно конструировать в виде гомо- или гетеродимеров, с применением или без методик улучшения гетеродимеризации, и они могут обладать свойствами моно- или биспецифического связывания.

Термин "полноразмерное антитело" в данном тексте включает структуру, которая представляет собой естественную биологическую форму антитела, содержащую вариабельные и константные области. Например, у большинства млекопитающих, включая людей и мышей, полноразмерное антитело класса IgG представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар двух цепей иммуноглобулина, при этом каждая пара содержит одну легкую и одну тяжелую цепь, каждая легкая цепь содержит области иммуноглобулина VL и константную область легкой цепи и каждая тяжелая цепь содержит области иммуноглобулина VH, CH1 (Cγ1), CH2 (Cγ2), CH3 (Cγ3) и CH4 (Cγ4), в зависимости от класса или изотипа антитела). У некоторых млекопитающих, например, у верблюдов и лам, антитела IgG могут состоять только из двух тяжелых цепей, при этом каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область, присоединенную к Fc-области.

Антитела группируют в классы, также называемые изотипами, которые определяют генетически по константной области. Константные области легких цепей человека классифицируют как легкие цепи каппа (СК) и лямбда (Сλ). Тяжелые цепи классифицируют как мю (μ), дельта (δ), гамма (γ), альфа (α) или эпсилон (ε) и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. Таким образом, "изотип" в данном тексте означает любой из классов и/или подклассов иммуноглобулинов, который определили по химическим и антигенным свойствам константных областей. Известные изотипы иммуноглобулинов человека представляют собойIGHG1 (IgG1), IGHG2 (IgG2), IGHG3 (IgG3), IGHG4 (IgG4),

IGHA1 (IgA1), IGHA2 (IgA2), IGHM (IgM), IGHD (IgD) и IGHE (IgE). Так называемый псевдоген гамма IGHGP иммуноглобулина человека представляет собой дополнительный ген константной области тяжелой цепи иммуноглобулина человека, который был секвенирован, но который не кодирует белок вследствие измененной области переключения (Bensmana M и др., (1988) *Nucleic Acids Res*, 16(7): 3108). Несмотря на измененную область переключения, псевдоген гамма IGHGP иммуноглобулина человека содержит открытые рамки считывания для всех константных областей тяжелой цепи (CH1 - CH3) и шарнира. Все открытые рамки считывания для его константных областей тяжелой цепи кодируют участки белка, которые хорошо выравниваются со всеми константными областями иммуноглобулина человека с предсказанными структурными особенностями. Данный дополнительный псевдо-гамма изотип в данном тексте называют IgGP или IGHGP. Были описаны другие псевдогены иммуноглобулинов, такие как псевдогены P1 и P2 константной области эpsilon тяжелой цепи иммуноглобулина человека (IGHPE1 и IGHPE2). Класс IgG наиболее часто используют для терапевтических целей. У людей данный класс включает подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей данный класс включает подклассы IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c и IgG3.

Термин "фрагменты иммуноглобулина" в данном тексте включает, но не ограничен: (i) областью, включая, например, область CH1, CH2 или CH3, (ii) фрагментом Fab, состоящим из областей VL, VH, CL или CK и CH1, включая Fab' и Fab'-SH, (iii) фрагментом Fd, состоящим из областей VH и CH1, (iv) фрагментом dAb (Ward ES и др., (1989) *Nature*, 341(6242): 544-6), который состоит из одной вариационной области, (v) фрагментами F(ab')₂, бивалентными фрагментами, содержащими два связанных фрагмента Fab, (vi) одноцепочечными фрагментами Fv (scFv), в которых область VH и область VL связаны пептидным линкером, который позволяет данным двум областям соединяться с образованием сайта связывания антигена (Bird RE и др., (1988) *Science*, 242(4877): 423-6; Huston JS и др., (1988) *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(16): 5879-83), (vii) "диателами" или "триателами", поливалентными или мультиспецифическими фрагментами, сконструированными путем слияния генов (Holliger P и др., (1993) *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(14): 6444-8; Tomlinson I & Holliger P, (2000) *Methods Enzymol*, 326: 461-79), (viii) scFv, диателом или областью антитела, слитыми с Fc-областью, и (ix) scFv, слитым с таким же или отличным антителом.

Термин "вариационная область" относится к областям или доменам, которые опосредуют связывание антигена и определяют специфичность конкретного антитела к конкретному антигену. Во встречающихся в природе антителах сайт связывания антигена состоит из двух вариационных областей, которые определяют специфичность: одну, расположенную в тяжелой цепи, в данном тексте называют вариационной областью тяжелой цепи (VH), а другую, расположенную в легкой цепи, в данном тексте называют вариационной областью легкой цепи (VL). У людей вариационную область тяжелой цепи (VH) можно подразделить на семь подгрупп или подклассов: VH1, VH2, VH3, VH4, VH5, VH6 и VH7. В некоторых случаях, специфичность может быть свойственна исключительно только одной из двух указанных областей, как в однодоменных антителах из тяжелых цепей антител, найденных у верблюдовых. Длина V-областей обычно составляет приблизительно 110 аминокислот, и они состоят из относительно неизменных участков последовательности аминокислот, называемых каркасными областями (FR или "негипервариационными областями"), из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими чрезвычайно вариационными участками, называемыми "гипервариационными участками", длина которых составляет 7-17 аминокислот. Вариационные домены нативных тяжелых и легких цепей содержат четыре FR, которые большей частью принимают конфигурацию бета-слоев, соединенные тремя гипервариационными участками, которые образуют петли. Гипервариационные участки в каждой цепи удерживаются в непосредственной близости благодаря FR и, вместе с гипервариационными участками из другой цепи, способствуют образованию сайта связывания антигена антитела (см. Kabat EA и др., выше.). Термин "гипервариационный участок" в данном тексте относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариационный участок, как правило, содержит аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность", или "CDR", которая обладает наиболее высокой вариационностью последовательности и/или участвует в распознавании антигена. Для всех вариационных областей используют нумерацию согласно Kabat (Kabat EA и др., выше).

Используется множество определений CDR, и все они входят в объем данной заявки. Определение по Kabat основано на вариационности последовательности, и его используют наиболее часто (Kabat EA и др., выше). Определение по Chothia вместо этого относится к расположению структурных петель (Chothia & Lesk J. (1987) *Mol Biol*, 196: 901-917). Определение AbM является компромиссом между определениями Kabat и Chothia, и его используют в программном обеспечении для моделирования антитела AbM Oxford Molecular (Martin ACR и др., (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9268-9272; Martin ACR и др., (1991) *Methods Enzymol*, 203: 121-153; Pedersen JT и др., (1992) *Immunomethods*, 1: 126-136; Rees AR и др., (1996) In Sternberg M.J.E. (ред.), *Protein Structure Prediction*. Oxford University Press, Oxford, 141-172). Недавно ввели определение на основе контактов (MacCallum RM и др., (1996) *J Mol Biol.*, 262: 732-745), и оно основано на анализе сложных структур, доступных в банке данных белков (Protein Databank). Определение CDR по IMGT® (International Immunogenetics Information System®, (<http://www.imgt.org>)) основано на нумерации IMGT V-областей из всех иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов из всех

видов (IMGT®, International Immunogenetics Information System®, Lefranc MP и др., (1999) Nucleic Acids Res, 27(1): 209-12; Ruiz M и др., (2000) Nucleic Acids Res, 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) Nucleic Acids Res, 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) Nucleic Acids Res, 31(1): 307-10; Lefranc MP и др., (2005) Dev Comp Immunol, 29(3): 185-203; Kaas Q и др., (2007) Briefings in Functional Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64). Все определяющие комплементарность участки (CDR), упоминаемые в настоящем изобретении, предпочтительно определяют как описано далее (нумерация согласно Kabat EA и др., выше): LCDR1: 24-34, LCDR2: 50-56, LCDR3: 89-98, HCDR1: 26-35, HCDR2: 50-65, HCDR3: 95-102.

"Не относящиеся к CDR области" варибельного домена известны как каркасные области (FR). "Не относящиеся к CDR области" области VL в данном тексте включают последовательности аминокислот: 1-23 (FR1), 35-49 (FR2), 57-88 (FR3) и 99-107 (FR4). "Не относящиеся к CDR области" области VH в данном тексте включают последовательности аминокислот: 1-25 (FR1), 36-49 (FR2), 66-94 (FR3) и 103-113 (FR4).

CDR согласно настоящему изобретению могут включать "расширенные CDR", которые основаны на упомянутых выше определениях и содержат остатки варибельного домена, как описано далее: LCDR1: 24-36, LCDR2: 46-56, LCDR3: 89-97, HCDR1: 26-35, HCDR2: 47-65, HCDR3: 93-102. Данные расширенные CDR также пронумерованы согласно Kabat и др., выше. "Не расширенный участок CDR" области VL в данном тексте включает последовательности аминокислот: 1-23 (FR1), 37-45 (FR2), 57-88 (FR3) и 98 - приблизительно 107 (FR4). "Не расширенный участок CDR" области VH в данном тексте включает последовательности аминокислот: 1-25 (FR1), 37-46 (FR2), 66-92 (FR3) и 103 - приблизительно 113 (FR4).

Термин "Fab", или "FAB", или "область Fab", или "область FAB" в данном тексте включает полипептиды, которые содержат VH, CH1, VL и константные области легкой цепи иммуноглобулина. Fab может относиться к данной области как к изолированной, или к данной области в контексте полноразмерного антитела или фрагмента антитела.

Термин "Fc" или "Fc-область" в данном тексте включает полипептид, содержащий константную область тяжелой цепи антитела за исключением первой константной области иммуноглобулина. Таким образом, Fc относится к последним двум константным областям иммуноглобулина IgA, IgD и IgG или к последним трем константным областям иммуноглобулина IgE и IgM, и к гибкому шарниру, находящемуся с N-стороны от данных областей. Для IgA и IgM Fc может включать цепь J. Для IgG Fc включает области иммуноглобулина C-гамма-2 и C-гамма-3 (C_γ2 и C_γ3) и шарнир между C-гамма-1 (C_γ1) и C-гамма-2 (C_γ2). Хотя границы Fc-области могут изменяться, обычно считают, что Fc-область тяжелой цепи IgG человека включает остатки C226 или P230 с карбоксильного конца, при использовании нумерации согласно EU-индексу. Fc может относиться к данной области как к изолированной, или к данной области в контексте полипептида Fc, например антитела.

Термин "константная область иммуноглобулина" в данном тексте относится к константным областям тяжелой цепи иммуноглобулина или антитела из человека или видов животных, и в объем данного термина входят все изотипы. Предпочтительно константные области иммуноглобулина получены из человека и выбраны из группы, состоящей из перечисленных константных областей, но не ограничены ими

IGHG1 CH1, IGHG2 CH1, IGHG3 CH1, IGHG4 CH1, IGHA1 CH1, IGHA2 CH1, IGHE CH1, IGHEP1 CH1, IGHM CH1, IGHD CH1, IGHGP CH1, IGHG1 CH2, IGHG2 CH2, IGHG3 CH2, IGHG4 CH2, IGHA1 CH2, IGHA2 CH2, IGHE CH2, IGHEP1 CH2, IGHM CH2, IGHD CH2, IGHGP CH2, IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHEP1 CH3, IGHM CH3, IGHD CH3, IGHGP CH3, IGHE CH4 и IGHM CH4.

Предпочтительные "константные области иммуноглобулина" выбраны из группы, состоящей из IGHE CH2, IGHM CH2, IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3,

IGHA1 CH3, IGHA2 CH3, IGHE CH3, IGHM CH3, IGHD CH3 и IGHGP CH3

человека.

Более предпочтительные "константные области иммуноглобулина" выбраны из группы, состоящей из

IGHG1 CH3, IGHG2 CH3, IGHG3 CH3, IGHG4 CH3, IGHA1 CH3, IGHA2

CH3, IGHE CH3, IGHM CH3, IGHD CH3 и IGHGP CH3

человека.

Термин "связывающая эпитоп область" включает полипептид или его фрагмент, обладающие минимальной последовательностью аминокислот, которая позволяет специфическое связывание молекулы иммуноглобулина с одним или более эпитопами. Встречающиеся в природе антитела содержат две связывающие эпитоп области, которые также известны как связывающие антиген или комбинирующие сайты, или паратопы. Связывающие эпитоп области во встречающихся в природе антителах находятся внутри участков CDR доменов VH и/или VL, в которых находятся аминокислоты, опосредующие связывание

эпитопа. Дополнительно к встречающимся в природе антителам можно сконструировать искусственные домены VH или домены VL, или их фрагменты и комбинации, чтобы получить связывающие эпитоп области (Holt LJ и др., (2003) *Trends Biotechnol*, 21(11): 484-490; Polonelli L и др., (2008) *PLoS ONE*, 3(6): e2371). Примеры полученных не из иммуноглобулинов связывающих эпитоп областей можно найти в искусственных белковых доменах, используемых в качестве "каркаса" для конструирования связывающих эпитоп областей (Binz HK и др., (2005) *Nat Biotechnol*, 23(10): 1257-1268), или пептидомиметиках (Murali R & Greene MI (2012) *Pharmaceuticals*, 5(2): 209-235). Предпочтительно термин "связывающая эпитоп область" включает комбинацию одного или более вариабельных доменов тяжелой цепи и одного или более комплементарных вариабельных доменов легкой цепи, которые вместе образуют сайт связывания, который позволяет специфическое связывание молекулы иммуноглобулина с одним или более эпитопами. Примеры связывающей эпитоп области, приведенные в настоящем изобретении, включают scFv и FAB.

В данном тексте термин "эпитоп" включает фрагмент полипептида, или белка, или небелковой молекулы, обладающей антигенной или иммуногенной активностью у животного, предпочтительно у млекопитающего, и наиболее предпочтительно у человека. Эпитоп, обладающий иммуногенной активностью, представляет собой фрагмент полипептида или белка, который вызывает гуморальный иммунный ответ у животного. Эпитоп, обладающий антигенной активностью, представляет собой фрагмент полипептида или белка, с которым антитело или полипептид специфично связывается, что определяют с помощью любого способа, хорошо известного специалисту в данной области, например, путем иммунологических анализов. Антигенные эпитопы не обязательно должны быть иммуногенными. Предпочтительно термин "эпитоп" в данном тексте относится к полипептидной последовательности, состоящей из по меньшей мере приблизительно от 3 до 5, предпочтительно приблизительно от 5 до 10 или до 15, но не более чем приблизительно из 1000 аминокислот (или любого целого числа аминокислот между указанными значениями), которая определяет последовательность, которая сама по себе или как часть более длинной последовательности связывается с антителом, которое выработалось в ответ на такую последовательность. Не существует критического верхнего предела длины указанного фрагмента, который может содержать чуть ли не полноразмерную белковую последовательность, или даже слитый белок, содержащий один или более эпитопов. Эпитоп для применения в настоящем изобретении не ограничен полипептидом, содержащим точную последовательность части исходного белка, из которого он был получен. Таким образом, в объем термина "эпитоп" входят последовательности, идентичные нативной последовательности, а также модифицированные нативные последовательности, например, путем делеции, вставки и замены (как правило, консервативной по своей природе). Эпитопы белковых антигенов подразделяются на две категории: конформационные эпитопы и линейные эпитопы, на основании их структуры и взаимодействия с сайтом связывания эпитопа (Goldsby R и др., (2003) "Antigens" (глава 3) *Immunology* (Пятое издание, ред.), Нью-Йорк: W. H. Freeman и Company, стр. 57-75, ISBN 0-7167-4947-5). Конформационный эпитоп состоит из прерывающихся участков последовательности аминокислот антигена. Взаимодействие данных эпитопов с паратопом основано на трехмерных элементах поверхности и форме или третичной структуре антигена. Большинство эпитопов конформационные. Напротив, взаимодействие линейных эпитопов с паратопом основано на их первичной структуре. Линейный эпитоп образован непрерывной последовательностью аминокислот из антигена.

Термин "гетеродимерный иммуноглобулин", или "гетеродимерный фрагмент", или "гетеродимер", или "гетеродимер тяжелых цепей" в данном тексте включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую, по меньшей мере, первый и второй полипептид, подобно первому и второму участкам, при этом второй полипептид отличается по последовательности аминокислот от первого полипептида.

Предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, при этом первая цепь содержит по меньшей мере один участок, неидентичный таковому во второй цепи, и при этом обе цепи соединяются, т.е. взаимодействуют, посредством неидентичных участков. Более предпочтительно гетеродимерный иммуноглобулин может специфично связываться по меньшей мере с двумя различными лигандами, антигенами или сайтами связывания, т.е. он биспецифический. Гетеродимерный иммуноглобулин в данном тексте включает, но не ограничен полноразмерными биспецифическими антителами, биспецифическим Fab, биспецифическим F(ab')₂, биспецифическим scFv, слитым с Fc-областью, диателом, слитым с Fc-областью, и доменом антитела, слитым с Fc-областью.

Термин "гомодимерный иммуноглобулин", или "гомодимерный фрагмент", или "гомодимер", или "гомодимер тяжелых цепей" в данном тексте включает молекулу иммуноглобулина или ее часть, содержащую по меньшей мере первый и второй полипептид, подобно первому и второму участкам, при этом второй полипептид идентичен по последовательности аминокислот первому полипептиду. Предпочтительно гомодимерный иммуноглобулин содержит две полипептидные цепи, при этом первая цепь содержит по меньшей мере один участок, идентичный таковому во второй цепи, и при этом обе цепи соединяются, т.е. взаимодействуют, посредством идентичных участков. Предпочтительно гомодимерный фрагмент иммуноглобулина содержит по меньшей мере два участка, при этом первый участок идентичен второму участку, и при этом оба участка соединяются, т.е. взаимодействуют через поверхность контакта белок-белок.

Для всех константных областей иммуноглобулина, входящих в объем настоящего изобретения, нумерация может осуществляться согласно IMGT® (IMGT®; выше).

Для всех константных областей тяжелой цепи CH1, CH2, CH3 иммуноглобулина человека, выбранных из группы, состоящей из IGHG1, IGHG2, IGHG3 и IGHG4, нумерация может осуществляться согласно "системе нумерации EU" (Edelman GM и др., (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63(1): 78-85). Полное соответствие для константных областей человека CH1, шарнира, CH2 и CH3 из IGHG1 можно найти в базе данных IMGT (IMGT®; выше).

Для константной области легкой цепи каппа иммуноглобулина человека (IGKC) нумерация может осуществляться согласно "системе нумерации EU" (Edelman GM и др., выше). Полное соответствие для области СК человека можно найти в базе данных IMGT (IMGT®; выше).

Для константных областей легкой цепи лямбда иммуноглобулина человека (IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7) нумерация может осуществляться согласно "системе нумерации Kabat" (Kabat EA и др., выше). Полное соответствие для областей IGLC человека можно найти в базе данных IMGT (IMGT®; выше).

Константные области тяжелой цепи IGHG1 иммуноглобулина человека, упоминаемые в данном тексте, имеют следующие границы: область CH1 (нумерация EU: 118 - 215), шарнирная область γ 1 (нумерация EU: 216-230), область CH2 (нумерация EU: 231 - 340) и область CH3 (нумерация EU: 341-447). Область СК из человека, упоминаемая в данном тексте, охватывает остатки с 108 по 214 (нумерация EU). Области IGLC1, IGLC2, IGLC3, IGLC6 и IGLC7 из человека, упоминаемые в данном тексте, охватывают остатки 108-215 (нумерация по Kabat).

Термины "аминокислота" или "аминокислотный остаток" в данном тексте включают как природные аминокислоты, так и неприродные аминокислоты. Предпочтительно включены природные аминокислоты.

Термин "модификация" или "модификация аминокислоты" в данном тексте включает замену, вставку и/или делецию аминокислоты в полипептидной последовательности. Термины "замена", или "замена аминокислоты", или "замена аминокислотного остатка" в данном тексте относятся к замене первого аминокислотного остатка в последовательности аминокислот на второй аминокислотный остаток, при этом первый аминокислотный остаток отличен от второго аминокислотного остатка, т.е., замещающий аминокислотный остаток отличается от аминокислоты, которая была замещена. Например, полипептид с заменой R94K относится к варианту полипептида, в котором аргинин в положении 94 замещен на лизин. Например, 94K указывает на замену в положении 94 на лизин. Для целей настоящего изобретения несколько замен обычно разделяют косой чертой или запятой. Например, "R94K/L78V" или "R94K, L78V" относится к двойному варианту, содержащему замены R94K и L78V. Под "вставкой аминокислоты" или "вставкой" в данном тексте подразумевают добавление аминокислоты в конкретное положение в исходной полипептидной последовательности. Например, вставка -94 обозначает вставку в положении 94. Под "делецией аминокислоты" или "делецией" в данном тексте подразумевают удаление аминокислоты в конкретном положении в исходной полипептидной последовательности. Например, R94- обозначает делецию аргинина в положении 94.

В некоторых вариантах реализации термины "уменьшать", "снижать" или "снижение" связывания с белком А относятся к общему уменьшению связывания по меньшей мере на 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 или 99% вплоть до 100% (элиминированию) модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с белком А, которое обнаруживают с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как описанные в данном тексте, по сравнению с исходным, т.е., немодифицированным, иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа. В некоторых вариантах реализации данные термины, в качестве альтернативы, могут относиться к общему уменьшению в 10 раз (т.е., на 1 log), в 100 раз (2 log), в 1000 раз (или 3 log), в 10000 раз (или 4 log) или в 100000 раз (или 5 log).

Термины "элиминировать", "нарушить", "элиминирование" или "нарушение" связывания с белком А относятся к общему уменьшению на 100% связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с белком А, т.е., к полной утрате связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с белком А, которое обнаруживают с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как описанные в данном тексте, по сравнению с исходным, т.е., немодифицированным, иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа.

Аналогично термины "уменьшать", "снижать" или "снижение" связывания с аффинным реагентом относятся к общему уменьшению по меньшей мере на 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 или 99 вплоть до 100% (элиминированию) связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с аффинным реагентом, которое обнаруживают с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как описанные в данном тексте, по сравнению с исходным, т.е., немодифицированным, иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа. В некоторых вариантах реализации данные термины, в качестве альтернативы, могут относиться к общему уменьшению в 10 раз (т.е., на 1 log), в 100 раз (2 log), в 1000 раз (или 3 log), в 10000 раз (или 4

log), или в 100000 раз (или 5 log).

Термины "элиминировать", "нарушить", "элиминирование" или "нарушение" связывания с аффинным реагентом относятся к общему уменьшению на 100% связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с аффинным реагентом, т.е., к полной утрате связывания модифицированного иммуноглобулина или его фрагмента с аффинным реагентом, которое обнаруживают с помощью стандартных способов, известных в данной области, таких как описанные в данном тексте, по сравнению с исходным, т.е., немодифицированным, иммуноглобулином, или IgG дикого типа, или IgG, содержащим Fc-область IgG человека дикого типа.

"Биспецифические антитела" представляют собой моноклональные антитела, которые способны специфично связываться с по меньшей мере двумя различными антигенами. В некоторых вариантах реализации биспецифические антитела представляют собой биспецифические антитела с одной или более модификациями аминокислот в области VH по сравнению с исходным антителом. В некоторых вариантах реализации биспецифические антитела могут представлять собой человеческие или гуманизированные антитела. Биспецифические антитела также можно применять для доставки цитотоксических агентов в клетки, которые экспрессируют антиген-мишень. Данные антитела содержат плечо, которое связывает антиген-мишень, и плечо, которое связывает цитотоксический агент, такой как, например, сапорин, антитело к интерферону-альфа, алкалоид барвинка, А-цепь рицина, метотрексат или меченный радиоактивным изотопом гаптен. Биспецифические антитела можно получить в виде полноразмерных антител или фрагментов антител. Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Обычно, рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелых цепей и легких цепей иммуноглобулина, при этом специфичности у двух тяжелых цепей различны (Milstein и Cuello, (1983) Nature, 305: 537-40). Вследствие случайного распределения тяжелых и легких цепей иммуноглобулина данные гибридомы (квадромы) образуют потенциальную смесь различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы, которую обычно осуществляют с помощью этапов аффинной хроматографии, довольно трудоемкая, и выходы продукта низкие. Аналогичные процедуры описаны в WO 1993/08829 и у Trautnecker и др., (1991) EMBO J, 10: 3655-9. Согласно отличному подходу, вариабельные области антитела с желательными специфичностями связывания (сайтами связывания антитела и антигена) соединяют с последовательностями константной области иммуноглобулина. Слияние, например, осуществляют с константной областью тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащей по меньшей мере часть шарнира и областей CH2 и CH3. В некоторых вариантах реализации первая константная область тяжелой цепи (CH1), содержащая сайт, необходимый для связывания легкой цепи, присутствует в по меньшей мере одном из слитых белков. ДНК, кодирующие слитые белки тяжелой цепи иммуноглобулина и, при желании, легкую цепь иммуноглобулина, встраивают в отдельные векторы экспрессии и осуществляют совместную трансфекцию ими организма подходящего хозяина. Это обеспечивает гибкость регулировки взаимных соотношений трех указанных полипептидных фрагментов в вариантах реализации, в которых для конструирования используют неравные соотношения трех полипептидных цепей, обеспечивая оптимальные выходы. Тем не менее, можно вставить кодирующие последовательности двух или всех трех указанных полипептидных цепей в один вектор экспрессии, если экспрессия по меньшей мере двух полипептидных цепей в равных соотношениях приводит к высоким выходам или если соотношения не имеют особого значения.

Биспецифические антитела включают перекрестно сшитые или "гетероконъюгированные" антитела. Например, одно из антител в гетероконъюгате может быть соединено с авидином, а другое - с биотином. Такие антитела, например, были предложены для нацеливания клеток иммунной системы на нежелательные клетки (US 4676980) и для лечения ВИЧ-инфекции (WO 1991/00360, WO 1992/00373 и EP 03089). Гетероконъюгированные антитела можно получить, применяя любой удобный способ создания перекрестных связей. Подходящие для создания перекрестных связей агенты хорошо известны в данной области (см. US 4676980), наряду с множеством методик создания перекрестных связей. Также предложены антитела с более чем двумя валентностями. Например, можно получить триспецифические антитела (см. Tutt A и др. (1991) J. Immunol. 147: 60-9).

Белок А: Белок А представляет собой компонент клеточной стенки, продуцируемый несколькими штаммами *Staphylococcus aureus*, который состоит из одной полипептидной цепи. Продукт гена белка А состоит из пяти гомологичных повторов, присоединенных в виде тандема к клеточной стенке патогена. Длина пяти указанных доменов приблизительно составляет 58 аминокислот, и домены обозначают ED-ABC, каждый из них проявляет активность связывания с иммуноглобулином (Tashiro M & Montelione GT (1995) Curr. Opin. Struct. Biol., 5(4): 471-481). Пять гомологичных связывающих иммуноглобулин доменов образуют трехспиральный пучок. Каждый домен способен связываться с белками из многих видов млекопитающих, наиболее значительно с IgG (Hober S и др., (2007) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 848(1): 40-47). Белок А связывается с тяжелой цепью большинства иммуноглобулинов внутри Fc-области, но также и внутри области FAB в случае семейств VH3 человека (Jansson B и др., (1998) FEMS Immunol. Med. Microbiol., 20(1): 69-78). Белок А связывается с IgG из различных видов, включая человека, мышь, кролика и морскую свинку, но не связывается с IgG3 человека (Hober S и др., (2007)

выше). Неспособность IgG3 человека связывать блок А можно объяснить заменами H435R и Y436F в Fc-области IgG3 человека (нумерация EU, Jendeborg и др., (1997) *J. Immunol. Methods*, 201(1): 25-34). Кроме IgG белок А также взаимодействует с IgM и IgA.

Среди подклассов VH человека VH3 является единственным подклассом, который связывается с белком А (Graille M и др., (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(10): 5399-5404), и известно, что все пять доменов белка А связываются с данным подклассом переменных доменов (Jansson B и др., (1998) *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 20(1): 69-78). Иммуноглобулины на основе VH3 или их фрагменты имеют важное значение в биотехнологической промышленности. Молекулы на основе VH3 конструируют в широких масштабах, поскольку их способность связываться с белком А облегчает функциональный предварительный скрининг, и по этой причине многие синтетические или полученные на основе доноров библиотеки фагового дисплея или методики создания трансгенных животных, используемые для открытия антител, основаны на подклассе VH3. Дополнительно молекулы на основе VH3 часто выбирают благодаря их хорошей экспрессии и стабильности по сравнению с другими известными подклассами переменных доменов тяжелой цепи.

Способность белка А связываться с антителами с такой высокой аффинностью является главной мотивацией для его применения в промышленном масштабе в биофармацевтике. Белок А, применяемый для получения антител в биофармацевтике, обычно получают рекомбинантно в *E. coli*, и он обладает по существу такими же функциями, как и нативный белок А (Liu HF и др., (2010) *MAbs*, 2(5): 480-499).

Как правило, рекомбинантный белок А связывают со стационарной фазой - смолой для хроматографии - для очистки антител. Оптимальное связывание происходит при pH 8,2, хотя связывание также хорошее при нейтральных или физиологических условиях (pH 7,0-7,6). Элюирования обычно добиваются путем сдвига в сторону более кислого pH (глицин-HCl, pH 2,5-3,0). Это приводит к эффективной диссоциации большинства взаимодействий белок-белок и антитело-антиген, без необратимого воздействия на структуру белков. Тем не менее, некоторые антитела и белки повреждаются низким pH, и будет лучше нейтрализовать их незамедлительно после получения путем добавления 1/10 объема щелочного буфера, такого как 1 М Трис-HCl, pH 8,0, чтобы минимизировать продолжительность нахождения в условиях низкого pH.

Существуют различные доступные для приобретения смолы для хроматографии с белком А. Основные различия между данными средами состоят в типе поддерживающей матрицы, модификации лигандами белка А, размере пор и размере частиц. Различия в данных факторах приводят к различиям в сжимаемости, химической и физической устойчивости, сопротивлению диффузии и емкости связывания указанных адсорбентов (Hober S и др., (2007), выше). Примеры смол для хроматографии с белком А включают, но не ограничены перечисленными: смолу с белком А MabSelect SuRe™ и смолу с белком А MabSelect™ от GE Healthcare, которые используются в примерах.

Термин "хроматография" относится к жидкостной хроматографии белков и включает жидкостную экспресс-хроматографию белков (FPLC), которая представляет собой форму жидкостной хроматографии, которую часто применяют для анализа или очистки смесей белков. Как и при других форматах хроматографии разделение возможно благодаря тому, что различные компоненты смеси обладают различными аффинностями к двум материалам: движущейся жидкости (подвижной фазе), которая проходит через пористое твердое вещество (стационарную фазу). При FPLC подвижная фаза представляет собой водный раствор или "буфер". Скоростью потока буфера можно управлять, позволяя жидкости протекать под действием силы тяжести или контролировать поток с помощью поршневого насоса прямого вытеснения, который обычно поддерживают при постоянной скорости, при этом состав буфера можно изменять путем подачи жидкостей в различных соотношениях из двух или более внешних емкостей. Стационарная фаза представляет собой смолу, состоящую из гранул, обычно из перекрестно-сшитой агарозы, которой набита цилиндрическая стеклянная или пластиковая колонка. Смолы для FPLC доступны в широком диапазоне размеров гранул и поверхностных лигандов в зависимости от применения.

Процесс "аффинной хроматографии" включает применение аффинного реагента в качестве лигандов, которые связаны перекрестными связями со стационарной фазой и которые обладают аффинностью связывания со специфическими молекулами или классом молекул. Лиганды могут представлять собой биомолекулы, такие как белковые лиганды, или могут представлять собой синтетические молекулы. У обоих типов лигандов обычно наблюдается хорошая специфичность. Наиболее часто применяемый в производстве белковый лиганд представляет собой аффинный реагент белок А. При аффинной хроматографии, когда раствор (например, неочищенный клеточный супернатант, содержащий интересующий белок) загружают на колонку, целевой белок обычно адсорбируется, позволяя примесям (другим белкам, липидам, углеводам, ДНК, красителям и т.д.) протекать через колонку. Адсорбентом обычно набивают хроматографическую колонку; тем не менее, стадию адсорбции можно осуществить, используя адсорбент в виде перемешиваемой взвеси в режиме порционного связывания. Следующей после адсорбции стадией является стадия промывки, в которой адсорбент промывают, чтобы удалить остаточные примеси. Связанный белок затем элюируют в полноразмерном или чистом виде. Элюирование обычно осуществляют, изменяя состав буфера или соли так, чтобы белок больше не мог взаимодействовать с иммобилизо-

ванным лигандом и высвобождался. В некоторых случаях интересующий белок может не связываться с аффинной смолой, и аффинная хроматография направлена на связывание нежелательных примесей, и, следовательно, собирают несвязавшуюся фракцию, чтобы выделить интересующий белок. Аффинную хроматографию можно осуществить в неподвижном слое или в псевдооживленном слое.

Термин "хроматография в градиентном режиме" относится к способу хроматографии, при котором процент "элюирующего" буфера (буфера В) повышают от 0 до 100% постепенным или ступенчатым образом.

Термины "хроматография в режиме захват-элюирование", или "очистка в режиме захват-элюирование", или "очистка путем захвата-элюирования" относится к способу хроматографии, в котором долю "элюирующего" буфера (буфера В) не повышают от 0 до 100% постепенным или ступенчатым образом, а вместо этого непосредственно используют в 100% концентрации после захвата и возможно этапа промывки подвижным буфером (буфером А).

Разработка гетеродимерных иммуноглобулинов, нацеленных на CD3 и CD38

Согласно настоящему изобретению предложена связывающая эпитоп область, которая связывает белковый комплекс CD3, содержащая CDR тяжелой и легкой цепей, как описано выше, и дополнительно содержащая каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи, который является продуктом или получен из гена IGHV3-23*04 человека (SEQ ID NO: 37). Каркасный участок вариабельной области тяжелой цепи содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты из соответствующего каркасного участка вариабельной области тяжелой цепи соответствующего антитела мыши ОКТ3, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 38. Предпочтительно указанная модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты. Обычно в каркасную область вносят модификации не более семи, предпочтительно не более шести, предпочтительно не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной аминокислоты. В некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложена связывающая эпитоп область, которая связывается с белковым комплексом CD3, при этом модификация аминокислоты в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 34, 48, 49, 58, 69, 71 и 73, и при этом положение аминокислоты каждого представителя группы указано согласно нумерации по Kabat. Предпочтительно замены аминокислот в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из: 134M, V48I, A49G, R58N, R58Y, I69L, A71T и T73K. Предпочтительная замена аминокислоты в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи находится в положениях аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 34, 49 и 71. Более предпочтительные замены аминокислот в каркасных участках вариабельной области тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из 134M, A49G и A71T.

В дополнительном аспекте связывающая эпитоп область первого полипептида, которая связывает белковый комплекс CD3, содержит каркасный участок вариабельной области легкой цепи, который является продуктом или получен из гена человека, выбранного из группы, состоящей из: IGKV1-39*01 (SEQ ID NO: 39) и IGKV3-20*01 (SEQ ID NO: 40). Каркасный участок вариабельной области легкой цепи содержит модификацию по меньшей мере одной аминокислоты из соответствующего каркасного участка вариабельной области легкой цепи соответствующего антитела мыши ОКТ3, включающего последовательность аминокислот SEQ ID NO: 41. Предпочтительно указанная модификация аминокислоты представляет собой замену аминокислоты. Обычно в каркасную область вносят модификации не более восьми, предпочтительно не более семи, предпочтительно не более шести, предпочтительно не более пяти, предпочтительно не более четырех, более предпочтительно не более трех, еще более предпочтительно не более двух, наиболее предпочтительно не более одной аминокислоты. В некоторых вариантах реализации в настоящем описании предложена связывающая эпитоп область, которая связывается с белковым комплексом CD3, при этом модификация аминокислоты в каркасных участках последовательности вариабельной области легкой цепи включает замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 4, 33, 34, 46, 47, 66, 71 и 96. Предпочтительно замены аминокислот в каркасных участках вариабельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из: M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y и P96F. Предпочтительная замена аминокислоты в каркасных участках вариабельной области легкой цепи находится в положениях аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 4, 46 и 47. Более предпочтительные замены аминокислот в каркасных участках вариабельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из M4L, L46R, L47W и F71Y. В некоторых вариантах реализации связывающая эпитоп область первого полипептида, который связывается с белковым комплексом CD3, может включать модификации аминокислот в каркасных участках последовательности вариабельной области тяжелой цепи, описанные выше, и модификации аминокислот в каркасных участках последовательности вариабельной области легкой цепи, описанные выше.

В настоящем описании также предложено антитело или его фрагмент, которые связываются с белковым комплексом CD3, которые включают последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: с 79 по 90, 91-95 и 64, предпочтительно состоящей из SEQ ID NO: 64. В настоящем описании также предложено антитело или его фрагмент, которые связыва-

ются с белковым комплексом CD3, которые включают последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: с 96 по 104, с 105 по 126, 127, 128 и 129, предпочтительно состоящей из SEQ ID NO: 127.

В связи с тем, что каждая из данных последовательностей вариабельной области тяжелой и легкой цепей может связываться с белковым комплексом CD3, последовательности вариабельной области тяжелой и легкой цепей можно "смешать и подобрать" для получения связывающих CD3 молекул согласно настоящему изобретению. Связывание CD3 с такими "смешанными и подобранными" антителами можно исследовать, применяя анализы на связывание, описанные, например, в примерах.

Конструирование константной области иммуноглобулина для стимулирования образования гетеродимера, а не гомодимера

Способы получения гетеродимерных иммуноглобулинов известны в данной области, и один из наиболее простых способов основан на экспрессировании двух различных цепей иммуноглобулина в одной клетке (WO95/33844, Lindhofer H & Thierfelder S). Без такого конструирования данный прямой способ ограничен тем, что происходит образование гомодимерных видов, а не интересующих гетеродимерных (Kufer P и др., (2004) Trends Biotechnol., 22(5): 238-244). При применении дополнительных методов, которые повышают гетеродимеризацию тяжелых цепей (Merchant AM и др., (1998) Nat. Biotechnol., 16(7): 677-681), можно добиться большей продукции гетеродимеров, но все еще будет образовываться значительное количество нежелательных гомодимеров (Jackman J и др., (2010) J Biol Chem., 285(27):20850-9, Klein C и др., (2012) MAbs, 4(6):653-63). В настоящем изобретении, следовательно, применяют описанный способ методики BEAT® (публикация РСТ № WO 2012/131555), который основан на уникальной концепции биомимикрии, которая обеспечивает лучшую гетеродимеризацию, чем способы известного уровня техники. Методика BEAT основана на обмене поверхностными участками между встречающимися в природе парами гомо-или гетеродимерных доменов иммуноглобулина с получением новых гетеродимеров, которые можно применять в качестве структурных единиц для создания биспецифических антител на основе Fc.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, содержащие первый и второй полипептиды, включающие сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом CH3, содержащим поверхность контакта белок-белок, при этом поверхность контакта белок-белок первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®), и при этом поверхность контакта белок-белок второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 84.4 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 (нумерация IMGT®).

В дополнительном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, в котором первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом CH3, содержащим поверхность контакта белок-белок, при этом поверхность контакта белок-белок первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении 88 и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86 и 90 (нумерация IMGT®), и при этом поверхность контакта белок-белок второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 85.1 и/или 86 и в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 88 и 90 (нумерация IMGT®), при этом аминокислотный остаток, замещенный в положении 88 в первой сконструированной константной области иммуноглобулина, взаимодействует с аминокислотным остатком, замещенным в положении 85.1 и/или 86 во второй сконструированной константной области иммуноглобулина, где положение аминокислоты каждого представителя группы указано согласно нумерации IMGT®.

Предпочтительно аминокислотный остаток, который замещен в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88 представляет собой 88W и консервативные замены аминокислот в данном положении, при этом положение аминокислоты указано согласно нумерации IMGT®. Более предпочтительно аминокислотный остаток, который замещен в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88W, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 3A, 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20E, 20S, 20K, 20W, 22A, 22G, 22T, 22L, 22I, 22V, 26R, 26Q, 26T, 26K, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.1T, 85.1M, 85.1A, 85.1S, 85.1R, 85.1H, 85.1K, 85.1F, 85.1C, 85.1N, 85.1W, 86S, 86I, 86T, 86H, 86Q, 86V, 86W, 86Y, 86F и 90N, при этом положение аминокислоты указано согласно нумерации IMGT®.

Предпочтительно аминокислотный остаток, который замещен в положении 85 и 86 в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 85.1A, 85.1S, 85.1C и 86S и консервативных замен аминокислот в данном положении (нумерация IMGT®). Более предпочтительно аминокислотный остаток, который замещен в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран

из группы, состоящей из 85.1A, 85.1S, 85.1C и 86S, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 81D, 84L, 84.2E, 88R и 90R и консервативных замен аминокислот в данном положении (нумерация IMGT®).

В предпочтительном варианте реализации аминокислотный остаток, который замещен в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 88, представляет собой 88W, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой 3A, 20K, 22V, 26T, 79Y, 85.1S, 86V и 90N и, при этом аминокислотные остатки, которые замещены в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина в положениях 85.1 и 86, представляют собой 85.1A, 85.1S или 85.1A и 86S, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 26T, 81D, 84L, 84.2E, 84.4Q, 88R и 90R (нумерация IMGT®).

В альтернативном варианте реализации согласно настоящему изобретению предложен гетеродимерный иммуноглобулин или его фрагмент, в котором первый и второй полипептиды содержат сконструированную константную область иммуноглобулина с модифицированным доменом CH3, содержащим поверхность контакта белок-белок, при этом поверхность контакта белок-белок первого полипептида содержит замену аминокислоты в положении 20, и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 5, 7, 22, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 85.1, 86, 88 и 90 и, при этом поверхность контакта белок-белок второго полипептида содержит замену аминокислоты в положении 26 и в положении, выбранном из группы, состоящей из: 3, 22, 27, 79, 81, 84, 85.1, 86, и 88, при этом аминокислотный остаток, замещенный в положении 20 в первой сконструированной константной области иммуноглобулина, взаимодействует с аминокислотным остатком, замещенным в положении 26 во второй сконструированной константной области иммуноглобулина, где положение аминокислоты каждого представителя группы указано согласно нумерации IMGT®.

Предпочтительно аминокислотные остатки, которые замещены в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной цепи иммуноглобулина, включают аминокислотные остатки в положениях 20 и 22, и возможно дополнительный аминокислотный остаток в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90, и при этом аминокислотные остатки, которые замещены в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной цепи иммуноглобулина, включают аминокислотные остатки в положениях 26 и в дополнительном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90, где положение аминокислоты каждого представителя группы указано согласно нумерации IMGT®. Предпочтительно аминокислотные остатки, которые замещены в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной цепи иммуноглобулина, включают аминокислотные остатки в положениях 20 и 22 и возможно дополнительный аминокислотный остаток в положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 26, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 86, 88 и 90, и при этом аминокислотные остатки, которые замещены в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной цепи иммуноглобулина, включают аминокислотные остатки в положениях 26 и 86 и возможно в дополнительном положении, выбранном из группы, состоящей из 3, 5, 7, 20, 22, 27, 79, 81, 84, 84.2, 84.4, 85.1, 88 и 90, где положение аминокислоты каждого представителя группы указано согласно нумерации IMGT®.

Более предпочтительно аминокислотный остаток, который замещен в положении 20 в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 20V, 20T, 20A, 20N, 20Q, 20K, 20S, 20W и 20E, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 3A, 22A, 22G, 22L, 22I, 22V, 22T, 26K, 26R, 26Q, 26T, 26V, 26S, 26N, 26E, 79Y, 85.1W, 85.1F, 85.1T, 85.1M, 85.1A, 85.1S, 85.1R, 85.1H, 85.1K, 85.1C, 85.1N, 86W, 86Y, 86S, 86I, 86H, 86Q, 86V, 86T, 86F, 88Q, 88L, 88V, 88R, 88E, 88T, 88I, 88Y, 88K, 88W и 90N, и при этом аминокислотный остаток, который замещен в положении 26 в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина, выбран из группы, состоящей из 26T и 26E и консервативных замен аминокислот в данном положении, при этом положение аминокислоты указано согласно нумерации IMGT®.

В наиболее предпочтительном варианте реализации аминокислотный остаток, который замещен в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 20, представляет собой 20K, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок первой сконструированной константной области иммуноглобулина, представляет собой 3A, 22V, 26T, 79Y, 85.1S, 86V, 88W и 90N, и при этом аминокислотный остаток, который замещен в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной константной области иммуноглобулина в положении 26, представляет собой 26T, и при этом дополнительный аминокислотный остаток, замещенный в поверхности контакта белок-белок второй сконструированной кон-

стантной области иммуноглобулина, представляет собой 3E, 5A, 7F, 20T, 22V, 81D, 84L, 84.2E, 84.4Q, 85.1C/S/A, 86S, 88R и 90R (нумерация IMGT®).

Примеры

Пример 1. Материалы и методы

Конструирование векторов экспрессии для временной экспрессии в клетках млекопитающего кДНК, кодирующие различные указанные полипептидные цепи, сначала частично или полностью синтезировали в GENEART AG (Регенсбург, Германия) и модифицировали, применяя стандартные методики молекулярной биологии. Продукты ПЦР расщепляли подходящими ферментами рестрикции ДНК, очищали и лигировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1 (Invitrogen AG, Цуг, Швейцария), несущую промотор CMV и сайт полиаденилирования (поли(A)) из бычьего гормона, заранее расщепленную такими же ферментами рестрикции ДНК. Все полипептидные цепи независимо лигировали в данный вектор экспрессии, при этом к секреции приводил лидерный пептид VJ2C мыши.

Экспрессия рекомбинантных белков

Антитела, слитые белки scFv-Fc, антитела и антигены BEAT экспрессировали, как описано ниже, если не указано иначе. Для временной экспрессии равными количествами каждого вектора со сконструированными цепями совместно трансфицировали адаптированные для культивирования в суспензии клетки HEK293-EBNA (ATCC-LGL Standards, Теддингтон, Великобритания; номер в каталоге: CRL-10852), применяя полиэтиленмин (PEI; Sigma, Букс, Швейцария). Как правило, 100 мл клеток в суспензии при плотности 0,8-1,2 млн клеток на мл трансфицировали смесью ДНК-PEL. Когда рекомбинантные векторы экспрессии, кодирующие каждый ген сконструированных цепей, внедряли в клетки-хозяева, конструкцию иммуноглобулина получали после дополнительного культивирования клеток в течение периода времени от 4 до 5 дней, чтобы позволить их секрецию в культуральную среду (EX-CELL 293, бессывороточная среда для HEK293 (Sigma), дополненная 0,1% плюроновой кислотой, 4 мМ глутамином и 0,25 мкг/мл генетина). Бесклеточные культуральные супернатанты, содержащие секретированные иммуноглобулины, получали путем центрифугирования с последующей стерильной фильтрацией и использовали для дальнейшего анализа.

Дифференциальная аффинная хроматография с белком A

После получения бесклеточных супернатантов их загружали на колонку с белком A HiTrap™ Mab-Select SuRe™ объемом 1 мл, заранее уравновешенную 0,2 М цитратно-фосфатным буфером, pH 6,0, и очищали на системе для хроматографии AKTApurifier™ (обе приобретены в GE Healthcare Europe GmbH; номер колонки в каталоге: 11-0034-93) при скорости потока 1 мл/мин. Подвижный буфер представлял собой 0,2 М цитратно-фосфатный буфер, pH 6. Элюирование интересующего гетеродимера осуществляли, применяя 20 мМ буфер на основе цитрата натрия, pH 4, тогда как гомодимерные виды элюировали 0,1 М глицином, pH 3,0.

После элюирования определяли оптическую плотность (OD) на 280 нм; фракции, содержащие интересующий гетеродимер, объединяли и нейтрализовали 0,1 объема 1 М Трис, pH 8,0 (Sigma).

Супернатант, проточную и элюированную фракции анализировали при невозстанавливающих условиях с помощью ПААГ/ДСН (Бис-Трис 4-12% акриламидные гели NuPAGE, Invitrogen AG, Базель, Швейцария).

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Термическую устойчивость антител сравнивали, используя калориметрические измерения. Калориметрические измерения осуществляли на дифференциальном сканирующем микрокалориметре VP-DSC (MicroCal-GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрунг, Швейцария). Объем клеток составлял 0,128 мл, скорость нагревания составляла 1°C/мин и избыточное давление поддерживали на уровне 64 фунта/кв.дюйм. Все фрагменты белков использовали при концентрации 1-0,5 мг/мл ФБР (pH 7,4). Молярную теплоемкость каждого белка оценивали путем сравнения с дублированными образцами, содержащими идентичный буфер, из которых был удален белок.

Парциальную молярную теплоемкость и кривые плавления анализировали, применяя стандартные процедуры. Для термограмм делали поправку на фон и нормировали концентрацию перед проведением дальнейшего анализа с применением модели "non-two-state" в программном обеспечении Origin версии 7.0.

Известны ожидаемые профили плавления для подклассов IgG человека (Garber E & Demarest SJ (2007) Biochem Biophys Res Commun, 355(3): 751-7), и было показано, что все профили включают три конформационных перехода с разворачиванием, соответствующих независимому разворачиванию доменов CH2, CH3 и FAB. Из четырех подклассов IgG человека IGHG1 содержит наиболее стабильный домен CH3 (~85°C); тогда как домены CH3 других подклассов менее стабильны, хотя, насколько известно, ни один не плавится при температуре ниже 70°C. Аналогично, известно, что у всех подклассов температура плавления домена CH2 составляет ~70°C.

Оценка чистоты с помощью капиллярного гель-электрофореза

Подготовка образцов в невозстанавливающих условиях 40 мкг обессоленного образца белка забуферили в буфере для образца с ДСН (Beckman Coulter International S.A., Ньон, Швейцария; IgG Purity kit,

номер в каталоге: A10663), содержащем 5 мМ йодацетамид (Sigma). В образцы добавляли внутренний стандарт 10 кДа. Смеси с образцами грели при 70°C в течение 10 мин.

Капиллярный гель-электрофорез

После подготовки образцы разгоняли на системе ProteomeLab PA 800 (Beckman Coulter International S.A., Ньон, Швейцария), оборудованной детектором с фотодиодной матрицей (DAD), установленным на 220 нм. Капилляры из плавленого кремния без покрытия с внутренним диаметром 50 мкм×30,2 см (эффективная длина до детектора 20,2 см) использовали в качестве средства разделения. Впрыскивание и разделение образцов осуществляли при постоянном напряжении 5 и 15 кВ, соответственно, с обратной полярностью в ДСН-(молекулярная масса) гелевом буфере. Результаты регистрировали с частотой 2 Гц, и ток был стабилен в процессе разделения. Капилляры и образцы термостатировали при 25°C.

Измерение аффинности с помощью ППР

Анализ ППР использовали для измерения констант скорости ассоциации и диссоциации для кинетики связывания различных антител (мышинных и гуманизированных антител). Кинетику связывания антител измеряли на устройстве BIAcore 2000 (BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбрунг, Швейцария) при комнатной температуре и анализировали с помощью программного обеспечения BiaEvaluation (версии 4.1, BIAcore-GE Healthcare Europe GmbH).

Измерения осуществляли на сенсорных чипах CM5 (GE Healthcare Europe GmbH, номер в каталоге: BR-1000-14), отдельно связанных с интересующим лигандом, применяя коммерчески доступный набор для сочетания аминов (GE Healthcare Europe GmbH, номер в каталоге: BR-1000-50). Лиганд белок G получали от Pierce (Thermo Fisher Scientific-Perbio Science S.A., Лозанна, Швейцария, номер в каталоге: 21193).

Результаты (сенсограмма: fc2-fc1) аппроксимировали моделью Лэнгмюра 1:1 с переносом массы или без него, как указано. В экспериментах по захвату, для учета экспериментальных вариаций в начале каждого измерения, значение $R_{\max}$ устанавливали на локальное для всех аппроксимаций. Время диссоциации составляло по меньшей мере 350 с. Измерения проводили в трех повторах и для сопоставления были включены образцы с нулевыми концентрациями. Как хи-квадрат (χ^2), так и остаточные значения использовали для оценки качества аппроксимации между экспериментальными результатами и отдельными моделями связывания.

Измерение аффинности на клетках HPB-ALL с помощью FACS

Клетки HPB-ALL (DSMZ, Брауншвейг, Германия, номер в каталоге: ACC483) использовали в качестве линии CD3-положительных клеток для окрашивания FACS. HPB-ALL поддерживали в среде RPMI 1640, дополненной 10% FCS и 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. 100 мкл серии разведений химерного антитела ОКТ3 и гуманизированных вариантов инкубировали с 4×10^5 клеток HPB-ALL в ФБР, дополненном 1% БСА и 0,1% азидом натрия (назван буфером для FACS), в течение 45 мин на льду. Посторонний IgG1 человека использовали в качестве контроля изотипа и химерное антитело ОКТ3 использовали в качестве положительного контроля. После промывки клетки инкубировали с разведением 1/200 антитела к Fc человека, меченого PE (EBioscience, Вена, Австрия), в течение 45 мин на льду. Клетки затем снова промывали и ресуспендировали в 200 мкл буфера для FACS. Относительную среднюю флуоресценцию в каждом образце измеряли на FACSCalibur (BD Biosciences, Аल्पвиль, Швейцария). Результаты резюмированы на фиг. 9 в виде относительного окрашивания HPB-ALL по сравнению с химерным антителом ОКТ3.

Линии клеток для анализов in vitro

Линии клеток человека, положительные по CD38

Клетки человека, экспрессирующие антиген CD38, были описаны в публикациях PCT № WO 2005103083, WO 2008047242, WO 2011154453 и WO 2012092612. Линии CD38-положительных клеток человека, используемые в данном тексте, были следующими: Стабильные рекомбинантные клетки CHO[CD38]

Ген, кодирующий CD38 человека, заказали в Source Biosciences (Берлин, Германия, номер в каталоге: IRAU37D11, 4309086). CD38 человека амплифицировали, применяя праймеры, добавляющие последовательность Козак, инициирующий кодон с идущим за ним сигнальным пептидом (V-лидер из мыши) к 5'-концу и сайт рестрикции NheI - к 3'-концу. Ампликон расщепляли, применяя NheI и HindIII, и клонировали в кассету экспрессии pT1 - вектор, полученный из pcDNA3.1 (Invitrogen AG), собственной разработки. Кассета экспрессии pT1 связывает экспрессию интересующего гена с экспрессией GFP и PAC (гена устойчивости к пурамицину), используя два участка внутренней посадки рибосомы (IRES) на полицистронной мРНК. Получали плазмиду с помощью набора Midiprep и наличие клонированной открытой рамки считывания CD38 подтверждали секвенированием ДНК. Суспензионные клетки CHO-S (Invitrogen AG) трансфицировали, применяя полиэтиленмин (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция), в формате биореактора объемом 50 мл (биореакторы TubeSpin 50, TPP, Тразадинген, Швейцария). Для данной цели клетки в экспоненциальной фазе роста высевали в среду OptiMEM (Invitrogen AG, номер в каталоге: 31985-047). К клеткам добавляли комплекс TetPET® ДНК После 5 ч инкубации клеток с комплексом JetPEI®: ДНК при 37°C при встряхивании (200 об/мин) для эндоцитоза в суспензию клеток

добавляли один объем культуральной среды PowerCHO2 (Lonza, дистрибьютор RUWAG Lifescience, Бетлах, Швейцария, номер в каталоге: BE12-771Q), дополненной 4 mM Gln. Клетки затем инкубировали на встряхивающей платформе при 37°C, 5% CO₂ и влажности 80%. Через день после трансфекции клетки высевали в 96-луночные планшеты при различных концентрациях в селективную среду, содержащую пуромицин (Sigma, номер в каталоге: P8833-25mg). После приблизительно 14 дней селекции в статическом режиме 46 популяций клеток, экспрессирующих GFP на высоком уровне, размножали в виде суспензионных культур, применяя биореакторы TubeSpin 50. После успешной адаптации клеток к суспензии, анализировали экспрессию CD38 в клетках с помощью FACS. Выбирали стабильные клоны CHO[CD38] с гомогенным профилем окрашивания на CD38 и использовали их далее.

Другие линии CB38-положительных клеток включали:

NCI-H929 (ATCC-LGL Standards; номер в каталоге: CRL-9068).

Namalwa (ATCC-LGL Standards; номер в каталоге: CRL-1432)

U266 (ATCC-LGL Standards; номер в каталоге: TIB-196)

RPMI 8226 (ATCC-LGL Standards; номер в каталоге: CCL-155)

Условия культивирования: среда RPMI 1640, дополненная 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (ФБС), 1% пенициллином-стрептомицином (Invitrogen AG) и 1% GlutaMAX-1 (Invitrogen AG).

Raji (ATCC-LGL Standards; номер в каталоге: CCL-86)

Daudi (ATCC-LGL Standards; номер в каталоге: CCL-213)

Рекомбинантные антигены-мишени

Слитый белок CD3-гамма-эпсилон-Fc человека

Сначала синтезировали в GENEART AG (Регенсбург, Германия) кДНК, кодирующую внеклеточную область CD3-гамма человека (номер доступа в UniProt: P09693, остатки 23-103 (SEQ ID NO: 184); UniProt Consortium (2013) Nucleic Acids Res., 41 (издание базы данных): D43-7; <http://www.uniprot.org/>), соединенную с внеклеточной областью CD3-эпсилон человека (номер доступа в UniProt: P07766, остатки 22-118 (SEQ ID NO: 185)) с помощью пептидного линкера длиной 26 аминокислотных остатков (последовательность: GSADDAKKDAKKDDAKKDDAKKDGSG; SEQ ID NO: 169).

Данный синтетический ген соединяли с Fc-областью IgG1 человека, применяя стандартные методики ПЦР с перекрывающимися праймерами, и матрицей кДНК Fc IgG1 человека, также полученной от Geneart AG. Полученную в результате этого кДНК клонировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1, упомянутую выше.

Для временной экспрессии белка CD3-гамма-эпсилон-Fc (SEQ ID NO: 170) рекомбинантным вектором трансфицировали адаптированные для культивирования в суспензии клетки НЕК-EBNA (ATCC-CRL-10852), применяя полиэтиленмин (PEI), как описано выше. Конструкцию CD3-гамма-эпсилон-Fc затем очищали из бесклеточного супернатанта, применяя среды Streamline для рекомбинантного белка А (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария), и использовали для дальнейшего анализа.

Слитые белки CD3-эпсилон-1-26 человека и яванского макака_Fc кДНК, кодирующую пептид 1-26 CD3-эпсилон человека (номер доступа в UniProt: P07766, аминокислоты 23-48, SEQ ID NO: 171), и кДНК, кодирующую пептид 1-26 CD3 эпсилон яванского макака (номер доступа в UniProt: Q95L15, аминокислоты 22-47, SEQ ID NO: 172) амплифицировали с помощью ПНР по синтетическим кДНК, полученным от GENEART A.G., для внеклеточных областей CD3-эпсилон человека и яванского макака, соответственно. Амплифицированные продукты затем соединяли с Fc-областью IgG1 человека, применяя стандартные методики ПНР с перекрывающимися праймерами. Матрицу кДНК Fc IgG1 человека получали от Geneart AG. Полученную в результате этого кДНК клонировали в модифицированную плазмиду pcDNA3.1, упомянутую выше.

Для временной экспрессии конструкций CD3 эпсилон человека и яванского макака (SEQ ID NO: 173 и 174, соответственно) рекомбинантными векторами трансфицировали адаптированные для культивирования в суспензии клетки НЕК-EBNA (ATCC-CRL-10852), применяя полиэтиленмин (PEI), как описано выше. Конструкции слитого CD3 эпсилон затем очищали из бесклеточного супернатанта, применяя среды Streamline для рекомбинантного белка А (GE Healthcare Europe GmbH, Глаттбругг, Швейцария), и использовали для дальнейшего анализа. Данные два слитых белка в данном тексте называют слитыми белками CD3-эпсилон-1-26 человека и яванского макака_Fc.

Внеклеточные области CD38 человека и яванского макака кДНК для CD38 человека получали от Source Biosciences (Erwin-Negelein-Haus, Германия, номер в каталоге: IRAU37D11, 4309086), его внеклеточную область (номер доступа в UniProt: P28907, остатки 43-300) амплифицировали с помощью ПНР и клонировали в вектор экспрессии собственного производства, полученный из pcDNA3.1 (Invitrogen AG). Данный вектор экспрессии содержал последовательность Козак и иницирующий кодон, за которым следовал лидерный пептид VJ2C мыши с 5'-конца и метка 6-His с 3'-конца от его участка множественного клонирования. Растворимую внеклеточную область CD38 человека, слитую с меткой 6-His (SEQ ID NO: 175), экспрессировали и очищали, как описано далее: один объем среды RPMI 1640 (PAA Laboratories, номер в каталоге: E15-039), содержащей клетки НЕК, 0,1% плюроновую кислоту (Invitrogen AG),

вектор экспрессии и полиэтиленимин (JetPEI®, Polyplus-transfection, Илькирш, Франция), инкубировали во встряхиваемом флаконе при 37°C, 5% CO₂ и влажности 80%. Через 4 ч к смеси добавляли один объем среды ExCell293, дополненной 6 мМ глутамином, и дальше продолжали инкубировать в течение всего 5 дней. После продукции получали бесклеточный супернатант путем центрифугирования и фильтровали, применяя фильтры с диаметром пор 0,2 мкм, pH подводили до 7,4 (4°C), применяя 1 М Трис, pH 8,7. В раствор добавляли гранулы Ni-сефарозы Excell (GE Healthcare, номер в каталоге: 17-3712-03) и инкубировали в течение ночи при 4°C при перемешивании. Раствор загружали на колонку Econo-Column (Bio-Rad Laboratories AG, Reinach, Швейцария, номер в каталоге: 737-4252) для очистки путем протекания под действием силы тяжести. Гранулы промывали в ФБР (2×), 20 мМ имидазол, и элюировали белок в ФБР, 500 мМ имидазол. Элюированные фракции объединяли и буфер заменяли на ФБР с помощью двух этапов диализа при 4°C. Очищенную бесклеточную область CD38 человека фильтровали, применяя шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Применяя описанные выше способы клонировали, экспрессировали и очищали растворимую бесклеточную область антигена CD38 яванского макака, слитую с меткой 6-His (SEQ ID NO: 176).

Анализ перенаправления уничтожения Т-клетками *in vitro*

Получение мононуклеарных клеток периферической крови

Для получения мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) фильтры крови, содержащие лейкоциты человека, получали из центра сбора крови (Blood Collection Centre) в La Chaux-de-Fonds, Швейцария (Centre de Transfusion Sanguine et Laboratoire de Sérologie, rue Sophie-Mairet 29, CH-2300). Клетки удаляли с фильтров путем обратной промывки 60 мл ФБР, содержащего 10 ед. ликвемина/мл (Drossapharm AG, Люцерн, Швейцария). МКПК затем очищали с помощью пробирок Blood-Sep-Filter емкостью 50 мл (Brunschwig, Базель, Швейцария), следуя инструкциям производителя. Центрифугировали пробирки в течение 20 мин при 800g при комнатной температуре (без использования тормоза) и собирали клетки из граничного слоя. Клетки промывали 3× средой Roswell Park Memorial Institute (RPMI, PAA Laboratories, Пашинг, Австрия) без добавления ФБС или фосфатно-солевым буферным раствором (ФБР). МКПК ресуспендировали до концентрации 10⁶ клеток/мл в среде RDL (RPMI, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (ФБС) и пенициллином/стрептомицином) и культивировали в течение ночи при 37°C в термостате при 5% CO₂ перед проведением анализа.

Препараты Т-клеток

Очистку Т-клеток осуществляли сразу после выделения МКПК, применяя набор для выделения всех Т-клеток Pan-T- cell isolation kit II (Myltenyi Biotec GmbH, Бергиш-Гладбах, Германия, номер в каталоге: 130-091-156), следуя инструкциям производителя. После очистки Т-клетки ресуспендировали до концентрации 10⁶ клеток/мл в среде RDL и культивировали в течение ночи при 37°C в термостате при 5% CO₂ перед проведением анализа.

Считывание результатов анализа

Для количественного определения перенацеливания уничтожения использовали два различных считывания данных, которые дали в высокой степени сопоставимые результаты.

Первым был способ проточной цитометрии, который в данном тексте называют методом RDL-FACS, основанный на флуоресцентной цитометрии, описанной у Schlereth B и др. ((2005) Cancer Res, 65: 2882-2889), Mooge PA и др. ((2011) Blood, 117(17): 4542-51) и Friedrich M и др. ((2012) Mol Cancer Ther, 11: 2664-2673). Клетки-мишени собирали, подсчитывали, однократно промывали и ресуспендировали до концентрации 5×10⁶ клеток/мл в ФБР + 1 мМ сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE, Sigma). Клетки инкубировали 15 мин при 37°C при аккуратном взбалтывании каждые 5 мин. Нагруженные CFSE клетки промывали 3× средой RDL и ресуспендировали до концентрации 2×10⁵ клеток/мл в среде RDL. МКПК собирали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации 2×10⁶ клеток/мл в среде RDL. Получали серийные разведения (3× растворы) антител в среде RDL. Клетки-мишени (50 мкл/лунку), Т-клетки (50 мкл/лунку) и 3× растворы антител (50 мкл/лунку) распределяли по 96-луночному планшету с плоским дном (TPP, Тразадинген, Швейцария). Соотношение эффектор:мишень составляло 10:1. Указанные планшеты инкубировали в течение 48 ч в термостате при 5% CO₂ при 37°C. После инкубации планшеты центрифугировали в течение 3 мин при 300 g, супернатанты отбрасывали путем стряхивания с планшетов. Планшеты однократно промывали 200 мкл ФБР, снова центрифугировали и сливали ФБР. Добавляли предварительно нагретый раствор аккутазы (Invitrogen AG) и инкубировали планшеты 10 мин при 37°C. Отсоединившиеся адгерентные клетки ресуспендировали путем пипетирования вверх/вниз после добавления 100 мкл среды RDL. Полученный раствор переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном (TPP). Планшеты с U-образным дном центрифугировали в течение 3 мин при 300 g, супернатанты отбрасывали и клетки ресуспендировали в 200 мкл холодного буфера для FACS (ФБР + 2% ФБС + 10% версена) с добавлением 7-AAD (Becton Dickinson AG, Аल्पвилль, Швейцария) при разведении 1/40. Указанные планшеты незамедлительно считывали на проточном цитометре Guava easyCyte™ (Millipore AG, Цуг, Швейцария). Для каждой лунки определяли абсолютное количество живых клеток-мишеней путем установки окна для отбора положительной по CFSE и отрицательной по 7ADD популяции, применяя программное обеспечение Flowjo® (Milttenyi Biotec GmbH, Бер-

гиш-Гладбах, Германия). Для каждого образца определяли процент специфической цитотоксичности, используя в качестве фонового уровня условие, при котором инкубировали только клетки-мишени. Значения EC_{50} определяли, используя метод нелинейной регрессии с переменным наклоном, с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad software, Ла-Хойя, Калифорния, США). Процент специфического перенаправленного лизиса (RDL) рассчитывали путем вычитания процента специфической цитотоксичности для условия без антитела из таковой для условий, когда добавляли исследуемое антитело.

Вторым был способ определения жизнеспособности клеток, который в данном тексте называют способом RDL-MTS, основанный на колориметрической оценке жизнеспособности клеток, описанной у Biihler P и др. ((2008) *Cancer Immunol Immunother*, 57: 43-52, Labrijn AF и др. ((2013) *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(13): 5145-50) и в публикации PCT № WO 2012143524. Клетки-мишени собирали, подсчитывали, однократно промывали и ресуспендировали до концентрации 2×10^5 клеток/мл в среде RDL. МКПК собирали, подсчитывали и ресуспендировали до концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде RDL. Получали серийные разведения антител (3× растворы) в среде RDL. Клетки-мишени (50 мкл/лунку), Т-клетки (50 мкл/лунку) и 3× растворы антител (50 мкл/лунку) распределяли по 96-луночному планшету с плоским дном (TPP). Соотношение эффектор:мишень составляло 10:1. Указанные планшеты инкубировали в течение 48 ч в термостате при 5% CO_2 при 37°C. После инкубации супернатанты отбрасывали и планшеты промывали трижды 200 мкл ФБР, чтобы удалить МКПК, а затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды RDL. Считывание данных осуществляли, применяя набор CellTiter 96® (Promega AG, Дюбендорф, Швейцария), следуя инструкциям производителя. Вкратце, в каждую лунку добавляли по 10-20 мкл реагента MTS и инкубировали планшеты 2-6 ч в термостате при 5% CO_2 при 37°C. Затем считывали поглощение на 490 нм на спектрофотометре для прочтения планшетов BioTek synergy (BioTek AG, Люцерн, Швейцария). Процент специфического уничтожения рассчитывали, используя следующую формулу: Специфическое уничтожение = $100 \times [(SD-Sp)/(SD-MD)]$. SD представляет собой поглощение, измеренное при условии самопроизвольной гибели, при котором клетки-мишени инкубировали отдельно. Sp представляет собой поглощение, измеренное при каждом тестируемом условии (клетки-мишени + МКПК + антитело). MD представляет собой поглощение, измеренное при условии максимальной гибели, при котором клетки-мишени лизировали с помощью 3 циклов замораживания и оттаивания. Процент специфического перенаправленного лизиса (RDL) рассчитывали путем вычитания процента специфической цитотоксичности для условия без антитела из таковой для условий, когда добавляли исследуемое антитело. Значения EC_{50} определяли, используя метод нелинейной регрессии с переменным наклоном, с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad software).

Пример 2. Сайты связывания антигена, которые нацелены на антиген CD3 и антиген CD38 человека.

2.1 Сайты связывания антигена CD3 человека.

Субъединицу CD3-эпсилон человека выбрали для запуска перенаправленного уничтожения Т-клетками посредством биспецифического захвата.

2.1А Гуманизированные варианты антитела ОКТ3 мыши.

Сайт связывания антигена CD3 эпсилон человека, используемый в данной заявке, получали из антитела ОКТ3 мыши (муромонаб-CD3, торговое название ортоклон ОКТ3, которое реализовала на рынке Janssen-Cilag и впоследствии сняла с производства; вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи мыши с последовательностями SEQ ID NO: 38 и 41 соответственно). Вариабельные домены ОКТ3 мыши гуманизировали и переводили в формат фрагментов scFv и Fab.

Гуманизацию осуществляли, следуя способу, описанному у Jung S и Plückthun A (1997, *Protein Eng*, 10(8): 959-66), с получением высокостабильного гуманизированного варианта, который будет подходить для перевода в оба формата FvB и scFv. В данном способе применяется высокостабильная пара доменов VH/VL, обнаруженная в антителе Герцептин® (rhMABHER2, huMAB4D5-8, трастузумаб или торговое название Герцептин®; номер публикации патента США 5821337; вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 20 и 21, соответственно), и в нем придерживаются последовательности процесса гуманизации на фиксированных каркасах (Almagro JC и Fransson J (2008), *Front Biosci*, 13: 1619-33). Поскольку антитело Герцептин исходно получают из высокостабильных семейств зародышевых каркасов VH3 и VK1 человека, то зародышевые каркасы из данных двух семейств можно в равной мере использовать в качестве источника фиксированных каркасов. В качестве альтернативы вместо VK1 можно применять семейства зародышевых каркасов легкой цепи VK3 человека, так как они также обладают свойством хорошей стабильности (Ewert S и др., (2003) *J Mol Biol*, 325: 531-553). Дополнительно к антителам мыши можно сконструировать антитела человека, применяя метод фиксированного каркаса для повышения стабильности. Предпочтительно применение зародышевого каркаса человекаIGHV3-23*04, IGKV1-39*01 и IGKV3-20*01 с последовательностью SEQ ID NO: 37, 39 и 40 соответственно (в соответствии с IMGT® (международная информационная система ImMunoGeneTics (Lefranc MP и др. (1999) *Nucleic Acids Res*, 27(1): 209-12; Ruiz M. и др. (2000) *Nucleic Acids Res*, 28(1): 219-21; Lefranc MP (2001) *Nucleic Acids Res*, 29(1): 207-9; Lefranc MP (2003) *Nucleic Acids Res*, 31(1): 307-10; Lefranc MP и др., (2005) *Dev Comp Immunol*, 29(3): 185-203; Kaas Q и др., (2007) *Briefings in Functional*

Genomics & Proteomics, 6(4): 253-64; <http://www.imgt.org>).

Для данной цели сконструировали первое гуманизированное антитело, в котором указанные CDR в переменных доменах антитела Герцептин® соответствующим образом замещали на CDR из антитела OKT3 мыши и сравнивали с химерой антитела OKT3 мыши (переменные области тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 130 и 131, в данном тексте его называют химерным антителом OKT3).

Для прототипа антитела (переменные области тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 79 и 96, сокращенно называемые VH/VL) выявили повышенные уровни продукции при анализах временной экспрессии и повышенную стабильность FAB, что измеряли с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии, но не выявили связывания с клетками HPB-ALL (оценивали по средней интенсивности флуоресценции в экспериментах FACS, см. раздел Материалы и методы), которые представляют собой положительную по CD3-эпсилон человека линию опухолевых Т-клеток (фиг. 1А).

На основании 3D-модели первого прототипа пары переменных доменов выбрали и исследовали подмножество обратных мутаций (из CDR-привитого прототипа Герцептина® в последовательность OKT3 мыши): I34M, V48I, A49G, R58N, R58Y, I69L, A71T и T73K в переменном домене тяжелой цепи и M4L, V33M, A34N, L46R, L47W, R66G, F71Y и P96F в переменном домене легкой цепи (нумерация по Kabat). Стоит отметить, что замена R58N соответствует мутации из CDR-привитого прототипа Герцептина® в OKT3 мыши, тогда как замена R58Y соответствует зародышевой замене из CDR-привитого прототипа Герцептина® в IGHV3-23*04 человека. Стратегия конструирования в отношении комбинации замен была основана на взаимодополнении различных замен с точки зрения их предполагаемого влияния на участки CDR, и/или укладки переменного домена, и/или иммуногенность.

В первом подходе все кандидатные антитела переводили в формат антител IgG1 человека. Наилучшие варианты выбирали в соответствии с уровнями экспрессии, термической устойчивостью фрагмента Fab и способностью связываться с клетками HPB-ALL, измеренной с помощью FACS. В наилучших гуманизированных вариантах сайт связывания с белком А, присутствующий в их домене VH, был нарушен путем введения замены G65S или N82aS. Данный этап конструирования был необходим для дальнейшего получения безопасных перенацеливающих Т-клетки антител BEAT, свободных от анти-CD3 гомодимеров.

Обратные мутации в VH: I34M, A49G и A71T, - наряду с обратными мутациями в VL: M4L, L46R, L47W и F71Y, - восстанавливали аффинность. Наилучшие комбинации переменных доменов представляли собой VH8/VL4, VH8/VL8, VH11/VL4 и VH11/VL8, так как они позволяли сохранить большую часть связывания с исходными клетками (фиг. 1А-С). Кроме того, для комбинаций VH8/VL8 (переменные домены с последовательностями SEQ ID NO: 131 и 132, соответственно) и VH11/VL8 (переменные домены с последовательностями SEQ ID NO: 133 и 132, соответственно) наблюдали повышенную стабильность FAB (+2,8°C и +1,6°C, соответственно, фиг. 1D).

Наконец, наилучшие гуманизированные варианты также перевели в формат слитых scFv-Fc и осуществили их временную экспрессию. Варианты располагали в порядке приоритетности с точки зрения их относительной аффинности, стабильности, уровней экспрессии при временной трансфекции в данном формате (фиг. 1Е). Наилучшие комбинации переменных доменов в формате слитых scFv-Fc были аналогичны комбинациям, обнаруженным в формате антитела: VH8-VL4 (фрагмент scFv с последовательностью SEQ ID NO: 135) и VH8-VL8 (фрагмент scFv с последовательностью SEQ ID NO: 136). У обоих фрагментов scFv была хорошая термическая устойчивость в формате слитых scFv-Fc (фиг. 1F).

2.1 В Гуманизированные варианты антитела SP34 мыши.

Антитело SP34 мыши было впервые описано в 1985 (Pessano S и др., (1985) EMBO J, 4(2):337-44). Его продуцировала гибридома, полученная из мышей, иммунизированных денатурированными белковыми экстрактами из клеток HPB-ALL, указанное антитело обладало специфичностью к антигенам человека и способностью вступать в перекрестные реакции с антигенами яванского макака.

Следуя способам и последовательности процесса, описанной в данном примере выше, сконструировали гуманизированные домены VH и VL для антитела SP34 мыши, содержащего домен VH с последовательностью SEQ ID NO: 1 и домен VL с последовательностью SEQ ID NO: 2, путем прививки CDR на зародышевые каркасы VH3-23 и VK3 соответственно. Полученные в результате этого переменные домены на основе VH3 можно затем лишить способности связываться с белком А, используя замены G65S или N82aS (нумерация по Kabat) в зависимости от их применения в формате антитела BEAT.

Для данной цели сконструировали первое гуманизированное антитело, в котором гиперпеременные участки в переменных доменах антитела человека, содержащего зародышевый домен VH3 тяжелой цепи и зародышевый домен VK3 легкой цепи, были соответственно заменены на гиперпеременные участки из антитела SP34 мыши. Полученное в результате этого гуманизированное антитело использовали в качестве исходного для дальнейшего улучшения аффинности и сравнивали с химерой антитела SP34 (с последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 137 и 138, соответственно, которое в данном тексте называют химерным антителом SP34).

Прототип антитела (переменные области тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями

SEQ ID NO: 91 и 105, и сокращенно VH1/VL1) с более низкой аффинностью связывалось со слитым белком CD3-эпсилон 1-26 человека_Fc (оценивали с помощью НИР, см. раздел Материалы и методы и фиг. 2А).

На основании 3D-модели первой пары прототипов переменных доменов выбирали подмножество замен, которые соответствовали любой из обратных мутаций между прототипом CDR-привитых зародышевых VH3/VK3 человека и последовательностью SP34 мыши (замены человеческих на мышьиные или мышьиных на человеческие), или рационально разработанные замены аминокислот. Ввели следующие замены и исследовали их в различных комбинациях: W100eF, и W100eY в переменном домене тяжелой цепи, и A2I, S25A, T27A, G27aA, V27cA, T28A, T29A, S30A, N31A, Y32A, E38Q, F44P, G46L, T51A, N52A, K53A, R54A, P56A, L66G, D69T, F87Y, Q89A, W91F, Y92A, S93A, N94A и Q100G в переменном домене легкой цепи (нумерация по Kabat; см. фиг. 2А). Стратегия конструирования в отношении комбинации замен была основана на комплементарности различных замен с точки зрения их предполагаемого влияния на участки CDR, и/или укладку переменных доменов, и/или иммуногенность, и/или влияния на временную экспрессию в клетках млекопитающих.

В первом подходе все кандидатные антитела переводили в формат антител IgG1 человека, и позже дополнительно исследовали в формате слитого белка scFv-Fc (фиг. 2В), при этом некоторые варианты содержали нарушенный с помощью G65S сайт связывания с белком А, присутствующий в домене VH. Наилучшие гуманизированные кандидатные антитела выбирали на основании уровней экспрессии и способности связываться со слитыми белками CD3-эпсилон 1-26 человека и яванского макака Fc с помощью ППР.

Неожиданно при изменении формата на scFv происходило резкое снижение экспрессии химеры SP34 и H1L21 по сравнению с форматом IgG1 (фиг. 3). Тем не менее, экспрессия scFv-Fc повышалась после введения комбинации замен W100eY в VH и W91F в VL (фиг. 2В).

Для того, чтобы дополнительно улучшить выполнимость производства биспецифических антител на основе CD3, было дополнительно сконструировано гуманизированное SP34 scFv. Для того, чтобы определить важные положения, влияющие на экспрессию SP34 scFv-Fc, осуществляли аланиновое сканирование VL21 CDR. Ввели следующие замены: T27A, G27aA, V27cA, T28A, T29A, S30A, N31A, Y32A, N52A, K53A, R54A, P56A, L90A, Y92A, S93A, N94A и L95A. Интересно, что только замены в положениях 29, 30 (VH1/VL26 SEQ ID NO: 139) и 95 (VH1/VL34 SEQ ID NO: 140) приводили к существенному повышению экспрессии scFv-Fc (фиг. 4), более того данные мутанты были единственными, у которых сохранилось связывание с CD3-эпсилон человека и яванского макака.

На основании данных результатов исследовали дополнительные замены в положениях 29, 30 и 95 в легкой цепи.

Так как в положениях 29 и 30 наблюдается гипервариабельность во всех различных семействах переменных областей легкой цепи, то данные два положения произвольно мутировали с помощью сайт-направленной ПЦР. Из всех полученных мутантов только замены T29A, T29E, T29S, S30A и S30D значительно улучшали уровень временной экспрессии (фиг. 5а и 5b), при этом сохранялось связывание с CD3-эпсилон человека.

В отличном подходе остаток L95, который известен в данной области как остаток канонической структуры, был замещен на остатки, наиболее часто находящиеся в этом самом положении в семействе переменных областей лямбда. Ввели следующие замены: L95A, L95G, L95T, L95S, L95D и L95N. Неожиданно, только L95G и L95T значительно улучшали экспрессию, при этом сохранялось связывание с мишенью (фиг. 5с).

В результате проведенной работы разработали несколько гуманизированных BEAT на основе SP34 и исследовали их экспрессию и связывание с CD3-эпсилон. Среди всех данных конструкций у биспецифического антитела, содержащего scFv с H5L65 (SEQ ID NO: 69) и H5L67 (SEQ ID NO: 70), выявили 2-кратное повышение экспрессии по сравнению с контролем H5L32 BEAT на основе scFv (фиг. 6).

H5L65 и H5L67 дополнительно подвергали анализу ДСК либо в виде IgG1, либо в виде scFv-Fc, и сравнивали с H5L32, H1L21 и химерой SP34. У H5L65 выявили лучшую термическую устойчивость в виде IgG1, но что еще более интересно, повышение на 5-2°C по сравнению с другими гуманизированными вариантами в формате scFv-Fc. (табл. 1). Стабильность *in vivo* улучшенных антител следовательно повышалась, также как и *in vitro*.

Таблица 1

Варианты SP34	Fab	IgG (Fab)	scFvFc
	Tm (°C)	Tm (°C)	Tm (°C)
Химера SP34	66,9	66,7	N/A
hSP34 H1/L21	75,1	73,1	56,7
hSP34 H5/L32	77,5	75,9	59,7
hSP34 H5/L65	78,1	77,3	61,6
hSP34 H5/L67	77,4	76,5	59,9

Предпочтительные комбинации переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи в отношении связывания антигена и рекомбинантной экспрессии описаны далее VH1 (SEQ ID NO: 42), или VH2 (SEQ ID NO: 43), или VH3 (SEQ ID NO: 44), или VH5 (SEQ ID NO: 45), образующие пару с доменами легких цепей VL21 (SEQ ID NO: 46), VL32 (SEQ ID NO: 47), VL65 (SEQ ID NO: 48) и VL67 (SEQ ID NO: 49).

2.2 Сайты связывания антигена CD38 человека.

CD38 представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа, который обычно находится на гематопозитических клетках и в твердых тканях. CD38 также экспрессируется при различных злокачественных гематологических заболеваниях. Биспецифические антитела, которые будут перенаправлять Т-клетки на уничтожение CD38-положительных раковых клеток, будут полезны для лечения различных злокачественных гематологических заболеваний, включая множественную миелому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, макроглобулинемию Вальденстрема, первичный системный амилоидоз, мантийноклеточную лимфому, пролимфоцитарный/миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, фолликулярную лимфому, NK-клеточный лейкоз и плазматический лейкоз. Несколько антител к CD38 были описаны как реагенты для исследования или кандидаты для терапии (публикация PCT № WO2006099875). Среди наилучшим образом исследованных антител к CD38 человека можно назвать мышинные гибридомы ОКТ-10 и HB-7 (Hoshino S и др., (1997) J Immunol, 158(2): 741-7).

В первом подходе сайты связывания антигена CD38 человека можно получить из мышинных гибридом ОКТ10 (вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 50 и 53 соответственно) или HB-7 (вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 51 и 54 соответственно) и их гуманизированных вариантов, которые можно в дальнейшем перевести в формат фрагментов FAB или scFv. Следуя способам и последовательности процесса, описанной в примере 2.1, можно сконструировать гуманизированные домены VH и VL для гибридомы HB-7 путем прививки CDR на зародышевые каркасы VH3-23 и VK1, соответственно.

Во втором подходе, следуя так называемому способу гуманизации с получением наиболее подходящих вариантов, описанному у Almagro JC & Fransson J (Front Biosci, (2008) 13: 1619-33), сконструировали наиболее подходящие гуманизированные домены VH и VL для гибридомы HB-7 путем прививки CDR на зародышевые каркасы IGHV4-59*03 и IGKV1-NL1*01 человека, соответственно (в соответствии с IMGT®, выше). Гуманизированные варианты VH и VL с различным количеством обратных мутаций исследовали *in silico*, и осуществляли временную экспрессию одного предпочтительного выбранного варианта гуманизированных VH и VL в виде формата IgG1 человека, и в данном тексте назвали его гуманизированным HB-7 с наиболее подходящими доменами VH (SEQ ID NO: 56) и VL (SEQ ID NO: 57). Ввели следующие обратные замены на мышинные остатки: (VH) - S35H, I37V, I48L, V67L, V71K, T73N, F78V, Y91F, и (VL)-M4L, L48I, Y49S, T69K (нумерация по Kabat).

Окрашивание гуманизированным наиболее подходящим антителом HB-7 (с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 141 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 142) рекомбинантных клеток CHO[CD38] анализировали с помощью FACS (результаты не представлены). Аффинность связывания с внеклеточной областью CD38 гуманизированного наиболее подходящего антитела HB-7 была аналогична таковой для химерного антитела HB-7 (с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 143 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 144) при анализе с помощью ППР (KD составляли 3,6 и 2,5 нМ, соответственно; фиг. 7А (химерное) и фиг. 7В (гуманизированное)). Неожиданно для гуманизированного наиболее подходящего антитела HB-7 наблюдали существенное повышение (+14,6°C) стабильности фрагмента Fab по сравнению с таковой для химерного антитела HB-7, о чем судили по профилям калориметрии (76,4°C (химерное) по сравнению с 91,0°C (гуманизированное), фиг. 7F).

В третьем подходе мышей, иммунизированных внеклеточным доменом CD38 человека, и CD38+ клетки человека использовали для получения новых гибридных кандидатов против CD38 человека. Способы получения гибридом известны, и способы, использованные в данной заявке, были аналогичны

способам, описанным в публикации PCT № WO 2013008171. Кандидатное антитело 9G7 мыши обладало высокой аффинностью к CD38 как человека, так и яванского макака (вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи с последовательностями SEQ ID NO: 52 и 55, соответственно). Данное антитело мыши сначала гуманизировали согласно способам, описанным в данном примере выше. Применяя подход наиболее подходящего варианта, зародышевые каркасы VH IGHV2-5*09 и каркас VK IGKV1-33*01 (в соответствии с IMGT® выше) выбирали в качестве исходных для процесса гуманизации. После прививки CDR наблюдали сильное связывание первого прототипа антитела (в формате изотипа IgG1 человека, с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 145 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 146) с CD38 человека, которое было лишь в три раза ниже, чем у исходного антитела мыши, о чем судили с помощью ППР (химерного антитела 9G7 с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 147 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 148; KD составляла 0,3 и 1 нМ для химерного антитела 9G7 (результаты не представлены) и первого гуманизированного прототипа (результаты не представлены), соответственно). Аффинность повышалась в два раза после введения обратной мутации F36Y в вариабельный домен легкой цепи антитела (нумерация по Kabat) (полученное в результате этого антитело в данном тексте называют гуманизированным наиболее подходящим антителом 9G7 с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 145 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 74; KD составляла 0,5 нМ к CD38 человека, фиг. 7C). Гуманизированное наиболее подходящее антитело 9G7 также проявляло высокую аффинность по отношению к антигену CD38 яванского макака (KD составляла 3,2 нМ, результаты не представлены), и повышенную термическую устойчивость FAB (Tm FAB получали в результате сканирования методом ДСК) по сравнению с химерным антителом 9G7 (94°C по сравнению с 82,2°C для гуманизированного наиболее подходящего антитела 9G7 и химерного антитела 9G7, соответственно; см. фиг. 7G). Гуманизированное наиболее подходящее антитело 9G7 содержало вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 58 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 59.

Кроме того, антитело 9G7 мыши гуманизировали, следуя подходу наилучшего каркаса, путем прививки CDR на зародышевые каркасы VH3-23 и VK1. Гуманизированные варианты VH и VL с различным количеством обратных мутаций исследовали *in silico*, и осуществляли временную экспрессию одного предпочтительного выбранного варианта гуманизированных VH и VL в виде антитела IgG1 человека (полученное в результате этого антитело в данном тексте называют гуманизированным антителом с наилучшим каркасом 9G7 с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 149 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 150). Ввели следующие обратные замены на мышьиные остатки: (VH) A24F, V37I, V48L, S49A, F67L, R71K, N73T, L78V, и K94R и (VL) F36Y (нумерация по Kabat). Выявили сильное связывание данного антитела с CD38 человека и CD38 яванского макака с константами сродства, аналогичными таковым для гуманизированного наиболее подходящего антитела 9G7 (KD составляла 0,4 и 1 нМ к CD38 человека и яванского макака, соответственно; фиг. 7D). Термическая устойчивость FAB (Tm FAB, полученная в результате сканирования методом ДСК) также была очень сходна с таковой для наиболее подходящего гуманизированного варианта 9G7 с F36Y (89,2°C, см. фиг. 7H). На фиг. 7J резюмированы различные гуманизированные антитела 9G7, описанные выше. Гуманизированное антитело с наилучшим каркасом 9G7 содержало вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 60 и вариабельный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 61.

В четвертом подходе фаговую библиотеку антител подвергали скринингу для получения дополнительных фрагментов scFv против CD38 человека. В данной библиотеке разнообразие было основано на встречающихся в природе генах V человека. В данной полученной из доноров библиотеке фагового дисплея антител использовали кДНК, амплифицированные из лимфоцитов крови, полученных из 48 доноров-людей, из которых у 70% было аутоиммунное заболевание (васкулит, системная красная волчанка, спондилоартропатия, ревматоидный артрит и склеродермия). При конструировании указанной библиотеки следовали протоколу, описанному у Schofield и др. (2007, *Genome Biol.*, 8(11): R254), при этом общее разнообразие составило $2,53 \times 10^{10}$ клонов. Фрагменты scFv, распознающие CD38 человека и/или яванского макака, выделяли из данной полученной из доноров библиотеки фагового дисплея, как описано далее. Фрагменты scFv выделяли в результате серии повторных циклов селекции на полученных рекомбинантным способом антигенах CD38 человека и/или яванского макака (см. раздел Материалы и методы). Известны способы скрининга библиотек фагового дисплея антител (Viti F и др., (2000) *Methods Enzymol*, 326: 480-505). Вкратце, после инкубации с библиотекой иммобилизованного антигена, которым предварительно покрывали пластиковую иммунопробирку (в течение ночи в ФБР при концентрации 20 мкг/мл) или который захватывали стрептавидином на поверхности гранул (при применении меченой биотином формы антигена, антиген захватывали при концентрации 50 нМ во всем процессе селекции), связавшиеся фаги выделяли, в то время как не связавшиеся фаги вымывали. Связавшиеся фаги освобождали, как описано у Marks и др. (Marks JD и др., (1991) *J Mol Biol*, 222(3): 581-97), и повторяли процесс селекции три раза. Экспрессировали свыше одной тысячи клонов из второго и третьего раундов пэннинга и анализировали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) их связывание с антигенами CD38 человека и яванского макака. Положительные клоны подвергали секвенированию ДНК и дополни-

тельно анализировали способность некоторых из уникальных клонов связываться с линиями клеток, экспрессирующих CD38 человека. После первого раунда пэннинга на меченом биотином варианте антигена CD38 человека, иммобилизованном на покрытых стрептавидином гранулах, и второго раунда пэннинга на меченом биотином варианте антигена CD38 яванского макака, иммобилизованном на покрытых стрептавидином гранулах, выбрали один предпочтительный фрагмент scFv (клон № 767), содержащий последовательность варибельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 62 и последовательность варибельной области легкой цепи SEQ ID NO: 63, так как он был способен связываться с CD38 как человека, так и яванского макака. Когда его перевели в формат антитела IgG1 человека, KD клона 767 составляла приблизительно 300 нМ к CD38 человека (фиг. 7Е) и приблизительно 1,2 мкМ к CD38 яванского макака (результаты не представлены) (клон 767 антитела IgG1 в данном тексте называют антителом 767 человека с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 151 и с последовательностью легкой цепи SEQ ID NO: 152). Термическая устойчивость FАВ (Tm FАВ, полученная в результате сканирования методом ДСК) составляла 70,2°C (фиг. 7I). Домен VН клона 767 принадлежит к подклассу доменов VН3.

Пример 3. Нацеленные на CD38/CD3 антитела BEAT

Плечи антитела против CD38 и против CD3-эпсилон могут быть в формате либо тяжелых цепей типа scFv-Fc, состоящих из фрагмента scFv, слитого с цепью BEAT, либо тяжелой цепи, состоящей из фрагмента Fab, слитого с цепью BEAT, аналогично таковой у встречающегося в природе антитела. Для образования функционального сайта связывания антигена требуется соединение тяжелой цепи на основе FАВ с родственной легкой цепью.

В области CH2 ввели замены L234А и L235А, и остаточное связывание с белком А нарушали, используя замены G65S или N82aS (нумерация по Kabat), при необходимости. Примеры антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, имели следующий формат:

Первый пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, в котором использовали наиболее подходящие последовательности VН и VЛ гуманизированного HВ7, получали в формате, описанном далее:

Антитело BEAT против CD38/CD3 сконструировали, применяя комбинацию сайтов связывания антигена, описанных в примерах 2.1 и 2.2 для плечей к CD3-эпсилон человека и к CD38 человека, соответственно. Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 153), содержащей варибельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234А и L235А (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1, соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 72). Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 154), содержащей фрагмент scFv, CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234А и L235А (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3. Данная тяжелая цепь содержала часть Fc-области IgG3 человека и, следовательно, не связывалась с белком А, но поскольку тяжелая цепь, используемая в данной заявке, содержала варибельный домен тяжелой цепи, происходящий из каркаса VН3, то домен VН мутировали, чтобы ввести замену N82aS, тем самым удаляя какие-либо дополнительные сайты связывания с белком А из тяжелой цепи. Указанное биспецифическое антитело в данном тексте называют антителом BEAT CD38-наиболее подходящее HВ7/CD3 (фиг. 8, формат А).

Осуществляли временную экспрессию антитела BEAT CD38-наиболее подходящее HВ7/CD3, очищали его и исследовали его аффинность *in vitro* к антигенам CD38 и CD3-эпсилон, его стабильность и способность перенаправлять уничтожение Т-клетками. Значение KD составляло 3,2 нМ к антигену CD38 человека (измеряли с помощью ПНР; фиг. 9А). Профили ДСК для указанного биспецифического антитела выявили хорошую термическую устойчивость с Tm, приблизительно равной 68°C для части scFv. Tm части FАВ составляла приблизительно 91°C (фиг. 9В).

Линии клеток, экспрессирующие CD38 (см. раздел Материалы и методы), использовали в анализах для оценки перенацеливания уничтожения Т-клетками. На фиг. 10 показано перенаправленное уничтожение Т-клетками клеток миеломы RPMI 8226 с применением антитела BEAT CD38-наиболее подходящее HВ7/CD3. Стоит отметить, что в данном анализе в качестве эффекторных клеток использовали очищенные Т-клетки при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням, составляющем 10 к 1. При измерении с помощью метода RDL-FACS EC₅₀ антитела BEAT CD38-наиболее подходящее HВ7/CD3 составляла 2,2 пМ (среднее значение по 2 донорам, инкубация в течение 48 ч).

Второй пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, в котором использовали последовательности VН и VЛ клона 767 из человека, получали в формате, описанном далее: антитело BEAT против CD38/CD3 сконструировали, применяя комбинацию сайтов связывания антигена, описанных в примерах 2.1 и 2.2 для плечей к CD3-эпсилон человека и к CD38 человека, соответственно. Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 65), содержащей варибельную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234А и L235А (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1, соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 138). Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи

BEAT (SEQ ID NO: 155), содержащей фрагмент scFv, CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3. Данная тяжелая цепь содержала часть Fc-области IgG3 человека и, следовательно, не связывалась с белком А, но поскольку тяжелая цепь, используемая в данной заявке, содержала переменный домен тяжелой цепи, происходящий из каркаса VH3, то домен VH мутировали, чтобы ввести замену G65S, тем самым удаляя какие-либо дополнительные сайты связывания с белком А из тяжелой цепи. Указанное биспецифическое антитело в данном тексте называют антителом BEAT CD38-767/CD3 (фиг. 8, формат В).

Осуществляли временную экспрессию антитела BEAT CD38-767/CD3, очищали его и исследовали его аффинность *in vitro* к антигенам CD38 и CD3-эпсилон, его стабильность и способность перенаправлять уничтожение Т-клетками. Линии клеток, экспрессирующие CD38 (см. раздел Материалы и методы), использовали в анализах для оценки перенацеливания уничтожения Т-клетками, аналогичных таковым, описанным в примере 3.2.1. На фиг. 11 показано перенаправленное уничтожение Т-клетками клеток Daudi с применением антитела BEAT CD38-767/CD3. Стоит отметить, что в данном анализе в качестве эффекторных клеток использовали МКПК человека при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням, составляющем 10:1. При измерении с помощью метода RDL-FACS EC₅₀ антитела BEAT CD38-767/CD3 составляла 244 пМ (среднее значение по 3 донорам, инкубация в течение 24 ч).

Другой пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, в котором использовали последовательности VH и VL с наилучшим каркасом гуманизированного 9G7, получали в формате, описанном далее: BEAT CD38/CD3 сконструировали, применяя комбинацию сайтов связывания антигена, описанных в примерах 2.1 и 2.2, для сайтов связывания антигенов CD3-эпсилон человека и CD38 человека соответственно.

Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 75 или 155), содержащей переменную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенную с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 77). Данная тяжелая цепь содержала часть Fc-области IgG3 человека и, следовательно, не связывалась с белком А, но поскольку тяжелая цепь, используемая в данной заявке, содержала переменный домен тяжелой цепи, происходящий из каркаса VH3, то домен VH мутировали, чтобы ввести замену G65S, тем самым удаляя какие-либо дополнительные сайты связывания с белком А из тяжелой цепи.

Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 68), содержащей фрагмент scFv, CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в данном тексте называют антителом BEAT CD38-наилучший КарКас9G7/CD3(SP34-каппа2).

Другой пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, в котором использовали последовательности VH и VL клона 767 из человека, получали в формате, описанном далее: BEAT против CD38/CD3 сконструировали, применяя комбинацию сайтов связывания антигена, описанных в примерах 2.1 и 2.2, для сайтов связывания антигенов CD3-эпсилон человека и CD38 человека соответственно.

Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 78), содержащей переменную область тяжелой цепи, область CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе γ 3, соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 66). Данная тяжелая цепь содержала часть Fc-области IgG3 человека и, следовательно, не связывалась с белком А, но поскольку тяжелая цепь, используемая в данной заявке, содержала переменный домен тяжелой цепи, происходящий из каркаса VH3, то домен VH мутировали, чтобы ввести замену G65S, тем самым удаляя какие-либо дополнительные сайты связывания с белком А из тяжелой цепи.

Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 68), содержащей фрагмент scFv, CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 1 с заменами L234A и L235A (нумерация EU), и домен CH3 BEAT на основе γ 1. Указанное биспецифическое антитело в данном тексте называют антителом BEAT CD38-767/CD3(SP34-каппа2).

В первой серии экспериментов выявили активацию Т-клеток посредством BEAT 9G7/SP34, когда они находились в комбинации с МКПК, но не выделенных Т-клеток.

Пример 4. Антитела BEAT против CD3/CD38, содержащие только один домен VH3.

Пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, в котором использовали наиболее подходящие последовательности VH и VL гуманизированного HB7, получали в формате, описанном далее: BEAT против CD38/CD3 сконструировали, применяя комбинацию сайтов связывания антигена, описанных в примерах 2.1 и 2.2 для плечей против CD3-эпсилон человека и против CD38 человека, соответственно. Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 71), содержащей переменный домен тяжелой цепи, CH1 γ 1, шарнирную область γ 1, область CH2 γ 3 с заменами L234A и L235A (нуме-

рация EU) и домен CH3 BEAT на основе $\gamma 3$, соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 72). Данная тяжелая цепь не связывалась с белком А, так как она содержала часть Fc-области IgG3 человека, и ее варибельный домен тяжелой цепи происходил из подкласса доменов, не относящихся к VH3. Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 157), содержащей фрагмент scFv, CH1 $\gamma 1$, шарнирную область $\gamma 1$, область CH2 $\gamma 1$ с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе $\gamma 1$. Такое соединение тяжелой и легкой цепей включало гуманизированную версию антитела к CD3-эпсилон человека (SP34), описанного в публикации PCT № WO 2008119565. Данный формат антитела BEAT в данном тексте называют анти-телом BEAT CD38-наиболее подходящее HB7/CD3(SP34) (фиг. 12, формат А).

Способность антитела BEAT CD38-наиболее подходящее HB7/CD3(SP34) перенаправлять Т-клетки на уничтожение CD38+ клеток исследовали *in vitro*. Линию CD38+ клеток В-лимфобластов Daudi использовали в анализе уничтожения. На фиг. 13 показано перенаправленное антителом BEAT CD38-наиболее подходящее HB7/CD3(SP34) уничтожение Т-клетками клеток Daudi. В данных анализах в качестве эффекторных клеток использовали МКПК человека при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням, составляющем 10 к 1, и способ считывания данных RDL-FACS после периода инкубации, составляющего 24 ч (см. раздел Материалы и методы). Полученные результаты показали, что антитело BEAT CD38-наиболее подходящее HB7/CD3(SP34) высокоэффективно перенаправляло уничтожение Т-клетками линии CD38+ клеток Daudi с EC₅₀, равной 1,8 пМ (среднее значение по 3 донорам).

Второй пример антител BEAT, нацеленных как на антиген CD38 человека, так и на CD3-эпсилон человека, в котором использовали наиболее подходящие последовательности VH и VL гуманизированного 9G7 (SEQ ID NO: 58 и 59, соответственно), получали в формате, описанном далее: BEAT против CD38/CD3 сконструировали, применяя комбинацию сайтов связывания антигена, описанных в примерах 2.1 и 2.2 для плечей против CD3-эпсилон человека и против CD38 человека соответственно. Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 73), содержащей варибельный домен тяжелой цепи, CH1 $\gamma 1$, шарнирную область $\gamma 1$, область CH2 $\gamma 3$ с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе $\gamma 3$, соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 74). Данная тяжелая цепь не связывалась с белком А, так как она содержала часть Fc-области IgG3 человека, и ее варибельный домен тяжелой цепи происходил из подкласса доменов, не относящихся к VH3. Плечо гетеродимерного иммуноглобулина, направленное против CD38 человека, состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 158), содержащей фрагмент scFv, CH1 $\gamma 1$, шарнирную область $\gamma 1$, область CH2 $\gamma 1$ с заменами L234A и L235A (нумерация EU) и домен CH3 BEAT на основе $\gamma 1$. Данное плечо биспецифического антитела содержало варибельные домены гуманизированного антитела SP34 VH5/VL32, описанного в примере 2.1. Данный формат антитела BEAT в данном тексте называют антителом BEAT CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2) (фиг. 12, формат В). Значение KD для антитела CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2) составляло 18 нМ по отношению к слитому белку CD3 человека l-26_Fc (фиг. 14).

Способность антитела BEAT CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2) перенаправлять Т-клетки на уничтожение CD38+ клеток исследовали *in vitro*. Линию CD38+ клеток В-лимфобластов Daudi использовали в анализе уничтожения. На фиг. 15 показано перенаправленное антителом BEAT CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2) уничтожение Т-клетками клеток Daudi. В данных анализах в качестве эффекторных клеток использовали МКПК человека при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням, составляющем 10 к 1, и способ считывания данных RDL-FACS после периода инкубации, составляющего 24 ч (см. раздел Материалы и методы). Полученные результаты показали, что антитело BEAT CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2) высокоэффективно перенаправляло уничтожение Т-клетками линии CD38+ клеток Daudi с EC₅₀, равной 2 пМ (среднее значение по 3 донорам).

Пример 5. Функциональная эквивалентность улучшенного SP34 в формате scFv.

Для того, чтобы определить, влияли ли модификации, введенные в различные scFv SP34 для улучшения их экспрессии, на функциональные свойства, а именно, на связывание CD3, их исследовали в контексте биспецифического антитела против CD38×CD3. Плечо антитела, связывающее CD38, представленное в виде FAB, содержало варибельную область тяжелой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 60, и варибельную область легкой цепи, кодируемую SEQ ID NO: 61. Плечо антитела, связывающее CD3, содержало исходный SP34 мыши в формате, измененном на scFv (SEQ ID NO: 207), или модифицированные гуманизированные scFv SP34, содержащие указанные комбинации тяжелых/легких цепей: H1/L21 (SEQ ID NO: 67), H5/L32 (SEQ ID NO: 68), H5/L65 (SEQ ID NO: 69) и H5/L67 (SEQ ID NO: 70).

Осуществляли временную экспрессию и очистку каждого из BEAT против CD3/CD38, в которых использовались различные варианты SP34. Их исследовали *in vitro* для сравнения способности перенаправлять уничтожение Т-клетками. Использовали линию клеток Raji, экспрессирующих CD38 (см. раздел Материалы и методы), чтобы оценить перенаправленное уничтожение Т-клетками. В данном анализе в качестве эффекторных клеток использовали МКПК человека при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням, составляющем 10:1.

При измерении с помощью метода RDL-FACS, для всех BEAT выявили сравнимую EC_{50} между 6 и 10 нМ (среднее значение по 2 донорам, инкубация в течение 24 ч), фиг. 16.

Пример 6. Замена D401Q нарушает связывание белков А и G в одном из двух видов гомодимеров.

Для аналитических целей мы получили гомодимеры ВТА и ВТВ антитела BEAT FAB $\times$ scFv, в которых плечо FAB (гомодимер ВТА) не связывалось с белком А, поскольку оно содержало не являющийся VH3 переменный домен и часть Fc-области IgG3 человека, аналогичной таковой, описанной выше, а плечо scFv (гомодимер ВТВ) связывалось с белком А посредством как переменного домена на основе VH3, так и Fc-области IgG1 человека. После экспрессии и очистки (описанных выше) мы обнаружили, что хотя гомодимер ВТА можно было легко очистить с помощью белка G (тяжелая цепь SEQ ID NO: 156 и легкая цепь SEQ ID NO: 74), гомодимер ВТВ можно было выделить только с помощью белка А, и он не связывался с белком G, что позволило предложить, например, неправильную укладку или конформационные изменения в сайте связывания белка G в Fc-области, несущей домен CH3 ВТВ (SEQ ID NO: 159). Учитывая, что белок G связывается практически с той же самой частью Fc-области, что и белок А (на границе доменов CH2-CH3), было неожиданным, что гомодимеры ВТВ связываются с белком А, но не с белком G. Затем предположили, что связывание белка А гомодимером ВТВ было опосредовано только одним сайтом связывания с белком А, расположенным в молекуле scFv, которая, как упоминалось выше, содержит переменный домен на основе VH3. Для того, чтобы оценить участие scFv в связывании с белком А, получили конструкцию, которая не содержала scFv на основе VH3, и обнаружили, что она более не связывала белок А (SEQ ID NO: 160, см. фиг. 17). Пришли к выводу, что в Fc-области гомодимера ВТВ оба сайта связывания белков А и G не функциональны.

Этот последний результат позволил предположить, что гомодимер ВТВ действительно имел неправильную укладку или его структура была изменена в области связывания белков А/G. Тем не менее, более ранние результаты, в которых домен CH3 ВТВ использовали в контексте гетеродимерного иммуноглобулина, говорили о противоположном. Для того, чтобы дополнительно исследовать функциональность домена CH3 ВТВ в гетеродимерном контексте в отношении связывания с белком А, мы получили антитело BEAT FAB $\times$ scFv, состоящее из плеча FAB (плеча ВТА), которое не связывалось с белком А, поскольку оно содержало не являющийся VH3 переменный домен, шарнир IgG1 человека, домен CH2 IgG3 человека и сконструированный домен CH3 ВТА, происходящий из изоформа IgG3 человека (тяжелая цепь плеча FAB с последовательностью SEQ ID NO: 156 и легкая цепь плеча FAB с последовательностью SEQ ID NO: 74), и плеча scFv (плеча ВТВ), содержащего фрагмент scFv на основе VH3, который был лишен способности связываться с белком А, шарнир IgG1 человека, домен CH2 IgG1 человека и сконструированный домен CH3 ВТВ, происходящий из изоформа IgG1 человека (тяжелая цепь плеча scFv с последовательностью SEQ ID NO: 161), следовательно, ожидали связывание гетеродимера с белком А только в Fc-области плеча scFv. После экспрессии и очистки (описанных выше) обнаружили, что в действительности данная молекула связывала белки А и G (фиг. 18А) и отсутствовали следы гомодимеров ВТВ. Таким образом пришли к выводу, что сайты связывания белков А и G интактны в контексте гетеродимерного иммуноглобулина и что только при соединении цепей ВТА и ВТВ образуется функциональный сайт связывания белков А/G.

Для того, чтобы понять молекулярную основу нарушения сайта связывания белков А/G в гомодимере ВТВ, исследовали ранее сконструированные домены CH3 ВТВ, происходящие из изоформа IgG1 человека. Замену D401Q, нумерация EU, сравнение между нумерацией EU и IMGT представлено на странице в сети Интернет http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGH_Gnber.html, в домене CH3 ВТВ обнаружили в исследованиях моделирования, и ее ввели, чтобы нарушить предполагаемое электростатическое взаимодействие между Arg411 первой цепи гомодимера ВТВ и Asp401 второй цепи гомодимера ВТВ, принимая во внимание, что данное взаимодействие могло стабилизировать гомодимерный комплекс. Поскольку данную замену вводили только на последнем этапе конструирования домена CH3 ВТВ, антитело BEAT FAB $\times$ scFv, описанное выше, было получено без указанной замены D401Q в домене CH3 ВТВ (плечо FAB с последовательностями тяжелой цепи и легкой цепи SEQ ID NO: 156 и 74, соответственно; плечо scFv с последовательностью тяжелой цепи SEQ ID NO: 162). После экспрессии и очистки (описанных выше) обнаружили, что данная молекула связывала белки А и G (фиг. 18В), но выявили присутствие гомодимеров ВТВ, что свидетельствовало о том, что замена D401Q отвечает за отсутствие связывания белков А/G, наблюдаемое в гомодимерах ВТВ, таким образом необходимо способствовать тому, чтобы уменьшить примеси указанного ВТВ в гетеродимерном иммуноглобулине. Важно отметить, что сам по себе остаток 401 не является частью сайта связывания белков А/G, но расположен напротив на границе CH2-CH3. Таким образом, нарушение связывания белков А/G не является результатом непосредственного нарушения взаимодействий между белками А/G и Fc-областью. Скорее предполагают, что, неожиданно, D401Q приводит к отдаленным конформационным изменениям на границе CH2-CH3 в результате плохой способности цепей ВТВ соединяться в пары друг с другом. В случае гетеродимера границы идеально совмещаются, и, таким образом, правильная конформация на границе CH2/CH3 делает сайт связывания белков А/G функциональным.

Данный неожиданный результат можно использовать для разработки новой стратегии эффективно-

го выделения гетеродимерных иммуноглобулинов без примесей гомодимеров, используя следующий особый план: гетеродимерный иммуноглобулин содержит первую цепь, содержащую Fc-область изотипа IgG3, которая будет содержать домен CH3 BTA и не являющийся VH3 переменный домен или переменный домен на основе VH3, который был лишен способности связываться с белком А (например, с использованием замен G65S или N82aS), или не будет содержать переменный домен и, следовательно, не сможет связываться с белком А, и вторую цепь, которая связывает белок А, содержащую домен CH3 BTV D401Q (например, происходящий из изотипа IgG1 человека) и либо не являющийся VH3 переменный домен, либо переменный домен VH3, который был лишен способности связываться с белком А (например, с использованием замен G65S или N82aS), либо не содержащую переменный домен. В данной ситуации оба гомодимера не содержали сайты связывания с белком А. Первый гомодимер представлял собой димер первой цепи и не связывал белок А, так как в нем отсутствовал сайт связывания с белком А, тогда как второй гомодимер представлял собой димер второй цепи с сайтом связывания с белком А, который был нефункционален. Полученный в результате этого гетеродимер содержал только один сайт связывания с белком А, находящийся во второй цепи (сайт связывания с белком А цепи BTV функционален только при соединении с цепью BTA). Следовательно, гетеродимер будет единственным видом молекул, связывающимся с хроматографической смолой с белком А, тогда как нежелательные гомодимеры цепей BTA и BTV будут вымываться.

Пример 7. Активность BEAT против CD3/CD38 *in vivo* у яванского макака.

Яванским макакам (*Macaca fascicularis*, 1 самец, 1 самка на дозу) вводили путем внутривенной болюсной инъекции дозу антитела к CD3/CD38 (содержащего комбинацию тяжелой/легкой цепей H5/L65 SP34 в формате scFv с последовательностью SEQ ID NO: 69 против CD3 и переменную область тяжелой цепи, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 60, и переменную область легкой цепи, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 61, в формате FAB против CD38), называемого в данном примере BEAT против CD3/CD38.

Проводили иммунофенотипирование всех животных по образцам крови (ЭДТА), взятым до лечения и в различные моменты времени после каждого введения BEAT против CD3/CD38. Оценку популяций лимфоцитов осуществляли с помощью проточной цитометрии, используя следующие маркеры: маркер всех Т-лимфоцитов (CD4 и CD8), маркер моноцитов (CD14) и CD38. Образцы анализировали на проточном цитометре FACSCanto™ II. Результаты анализировали, применяя аналитическое программное обеспечение FACSDiva™, как описано далее: сначала рисовали электронное окно (гейт) на основе свойств прямого и бокового светорассеяния, чтобы выбрать популяции лимфоцитов или моноцитов (исходную популяцию). Абсолютные количества на мкл целой крови популяции Т-лимфоцитов (CD4+ Т-клетки и CD8+ Т-клетки) и популяции CD38-положительных моноцитов (CD14+CD38+) рассчитывали исходя из их относительного процентного содержания, полученного для окна исходной популяции, и общего количества клеток в исходной популяции, полученного на достоверном гематологическом анализаторе, согласно формуле: абсолютное количество в популяции ($\times 10^6$ /мкл) = (относительный % в популяции $\times$ общее количество клеток в исходной популяции)/100.

Наблюдалось явное раннее уменьшение количеств Т-клеток, как CD4-положительных, так и CD8-положительных, после дозы 1 и 10 мг/кг (фиг. 19). По сравнению с количествами клеток, полученными за 1 день до введения дозы, наблюдалось уменьшение на 48 и 78% количества CD4+ Т-клеток после введения дозы 1 мг/кг и более чем на 90% после введения дозы 10 мг/кг в момент времени 4 часа. Количество CD8+ Т-клеток еще более значительно уменьшалось, падая до 86% после введения дозы 1 мг/кг. Количество CD4+ Т-клеток быстро восстанавливались и через 48 часов, в целом, были близкими к количествам перед введением дозы. Тем не менее, количества CD8+ Т-клеток более медленно восстанавливались и достигали уровней, близких уровням до введения дозы, через 1 неделю. Такое временное уменьшение количества Т-клеток периферической крови было ожидаемым и отражало активацию данных популяций антителом BEAT против CD3/CD38. Данные наблюдения позволяют предположить, что Т-лимфоциты, и, в частности, цитотоксические CD8+ Т-клетки, вовлечены в уничтожение специфических клеток в указанных тканях.

Также наблюдалось явное уменьшение популяции циркулирующих CD38+ моноцитов (фиг. 20). Наблюдалось очень быстрое исчезновение, а затем восстановление уровня в периоде между 24 и 48 ч. За таким восстановлением уровня, как правило, следовало второе существенное уменьшение количеств CD38+ моноцитов, свидетельствующее о том, что данная популяция, вероятно становилась мишенью и уничтожалась цитотоксическим действием Т-лимфоцитов.

Пример 8. Антитела BEAT на основе 9G7 проявляли повышенную активность к уничтожению, по сравнению с OKT10×OKT3 BEAT.

Исследовали активности двух различных антител BEAT на основе 9G7 по сравнению с антителом BEAT на основе OKT10 в анализах RDL.

Биспецифическое антитело, называемое в данном тексте BEAT CD38-9G7/мышь/CD3, представляет собой антитело BEAT против CD38/CD3, полученное на основе комбинации сайтов связывания антигена, описанных в примере 2 (scFv VH11/VL8 OKT3 для плеча против CD3-эпсилон человека и FAB химерно-

го антитела мыши-человека 9G7 для плеча против CD38 человека). Плечо против CD38 человека биспецифического антитела состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 177), соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 178). Плечо против CD3-эпсилон человека биспецифического антитела состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 179), содержащей фрагмент scFv против CD3-эпсилон человека. Осуществляли временную экспрессию указанного биспецифического антитела и очищали его, как описано выше.

Биспецифическое антитело, называемое в данном тексте BEAT CD38-ОКТ10мыши/CD3, представляет собой антитело BEAT против CD38/CD3, полученное на основе комбинации сайтов связывания антигена, описанных в примере 2 (scFv VH11/VL8 ОКТ3 для плеча против CD3-эпсилон человека и FАВ химерного антитела мыши-человека ОКТ10 для плеча против CD38 человека). Плечо против CD38 человека биспецифического антитела состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 180), соединенной с родственной легкой цепью (SEQ ID NO: 181). Плечо против CD3-эпсилон человека биспецифического антитела состояло из тяжелой цепи BEAT (SEQ ID NO: 179), содержащей фрагмент scFv против CD3-эпсилон человека. Осуществляли временную экспрессию указанного биспецифического антитела и очищали его, как описано выше.

Антитело BEAT, которое в данном тексте называют антителом BEAT CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2), было описано выше в примере 4.

Цитотоксический потенциал различных антител BEAT на основе МАТ 9G7 или ОКТ10 против CD38 оценивали в анализе уничтожения CD38⁺ клеток-мишеней Daudi (ATCC). Для определения количества погибших клеток-мишеней осуществляли считывание данных на основе проточной цитометрии. Аналогичное считывание данных на основе проточной цитометрии использовали в Moore и др. Blood от 28 апреля 2011 г.; 117(17):4542-51; Friedrich и др. Mol Cancer Ther 2012; 11:2664-2673; Schlereth и др. Cancer Res 2005; 65:2882-2889. Эффекторные клетки представляли собой нестимулированные МКПК из здоровых доноров. Отношение эффектор:мишень обычно составляло 10:1 и время инкубации составляло 48 ч. Вкратце, клетки-мишени (Daudi) метили флуоресцентным цитоплазматическим красителем, таким как CFSE, и распределяли по 96-луночным планшетам (TPP). Затем по соответствующим лункам распределяли серийные разведения антител (3× растворы) и МКПК (50 мкл/лунку). Указанные планшеты инкубировали в течение 48 ч в термостате при 5 % CO₂ и 37°C. Клетки ресуспендировали пипетированием и переносили в 96-луночные планшеты с U-образным дном (TPP). Планшеты с U-образным дном центрифугировали 3 мин при 300 g, супернатанты отбрасывали и клетки ресуспендировали в 200 мкл холодного буфера для FACS (PBS + 2% FBS + 10% версена) с добавлением 7-AAD (Becton Dickinson) при разведении 1/40. Указанные планшеты незамедлительно считывали на проточном цитометре Guava easyCyte™ (Millipore). Для каждой лунки определяли абсолютное количество живых клеток-мишеней путем установки окна для отбора положительной по красителю (CFSE) и отрицательной по 7ADD популяции, применяя программное обеспечение Flowjo (Treestar). % специфической цитотоксичности для каждого образца определяли, используя условие, при котором инкубировали только клетки-мишени, в качестве фонового уровня или используя условие, при котором клетки-мишени смешивали с МКПК (условие без антитела). Значения EC₅₀ определяли, используя метод нелинейной регрессии с переменным наклоном, с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad Software).

Результаты, представленные в табл. 2, показывают значения EC₅₀, полученные для различных конструкций BEAT. У антител BEAT на основе 9G7 (BEAT CD38-9G7мыши/CD3 и BEAT CD38-наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34-каппа2)) выявили активность уничтожения, характеризующую явно более низкой EC₅₀, чем у антитела BEAT CD38-ОКТ10мыши/CD3 (3,2 и 1,9 пМ для антител BEAT на основе 9G7 по сравнению с 125,6 пМ для антитела BEAT на основе ОКТ10), что свидетельствует о более высоком цитотоксическом потенциале антител BEAT на основе 9G7 против CD38/CD3.

Таблица 2. У антител BEAT на основе 9G7 выявляли повышенную активность к уничтожению по сравнению с ОКТ10×ОКТ3 BEAT

	BEAT CD38- 9G7мыши/CD3	BEAT CD38- наиболее подходящее 9G7/CD3(SP34- каппа2)	BEAT CD38- ОКТ10мыши/CD3
EC50 (nM)*	3,2	1,9	126

*EC₅₀ указывают на средние значения результатов анализов уничтожения, выполненных для различных доноров МКПК. N = 8 для 9G7×ОКТ3, N = 2 для ОКТ10×ОКТ3 и N = 1 для 9G7×SP34(GV2)

Пример 9. Антитела 9G7 и 767 не проявили агонизм, в противоположность антителу HB7

Так как CD38 был способен передавать сигнал, то исследовали агонистические свойства антител 9G7 и 767 по сравнению с клоном HB7 в анализе притока кальция на линии клеток Jurkat Т-клеточной лимфомы человека, которая естественным образом экспрессирует CD38. Клетки Jurkat нагружали красителем Fluo-4 при концентрации 2 мкМ (Invitrogen) в течение 1 ч при 37°C. Клетки промывали и ресуспендировали.

пендировали в ФБР, дополненном 1 mM Ca_2^+ и 1 mM Mg_2^+ . Образцы анализировали на проточном цитометре FACScalibur (Becton Dickinson) в течение 40 с для определения фонового уровня. Затем добавляли к образцам исследуемые антитела при концентрации 10 мкг/мл и возобновляли сбор данных до 7 мин. На фигуре G показана средняя интенсивность флуоресценции (MFI) красителя fluo-4 (канал FL-1), которая представляет собой выявленную мобилизацию кальция в цитоплазму клеток как функцию времени. Хотя контроль изотипа (антитело IgG1 человека) не приводил к какому-либо притоку кальция, антитело hB7 против CD38 вызывало сильный сигнал. Поразительно, что ни антитело 9G7, ни антитело 767 не были способны вызывать сигнал мобилизации кальция, указывая на то, что данные антитела, в противоположность антителу hB7, не обладают свойствами агонизма CD38.

В той же серии экспериментов также показали, что 9G7 и 767 специфично связываются с клетками, экспрессирующими CD38.

Пример 10. Картирование эпитопа.

Картирование эпитопа h9G7.

Использовали линейное пептидное картирование для определения эпитопа гуманизированного 9G7 (наиболее подходящего варианта). Внеклеточный домен CD38 человека (остатки 43-300) разделяли на 19 последовательных пептидов длиной по 13 аминокислот и конечный пептид длиной 11 аминокислот. Пептиды соединяли с Fc-областью IgG1 человека (CH2-CH3) с помощью состоящего из двух аминокислот линкера (Ala-Ser) между Fc и последовательностью пептида. Данные конструкции называли F1-F20 (последовательности SEQ ID NO: 182-201) и их связывание анализировали с помощью ППР. Гуманизированное антитело 9G7 (тяжелая цепь SEQ ID NO: 145 и легкая цепь SEQ ID NO: 146) ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (приблизительно 1800 RU). Слитые белки пептид-Fc подавали при концентрации 15 нМ в течение 240 с. Внеклеточный домен CD38 человека подавали в качестве контроля. Только для F6 и контроля получили сигнал связывания (фиг. 22). Все фрагменты заново подавали при концентрации 200 нМ и наиболее сильный сигнал получили для F6 (фиг. 23), тогда как для остальных фрагментов выявили отсутствие связывания (результаты не представлены). Так как F6 представлял собой часть эпитопа антитела SAR650984, описанного в публикации PCT № WO 2008047242 (тяжелая цепь с последовательностью SEQ ID NO: 202 и легкая цепь с последовательностью SEQ ID NO: 203), то их взаимодействие проверяли с помощью ППР и подтвердили (результаты не представлены). Таким образом, h9G7 и SAR650984 конкурируют за связывание с CD38 человека. Более того, когда последовательность F6 картировали на трехмерную поверхность внеклеточного домена CD38 человека, она перекрывалась с эпитопом SAR650984. Тем не менее было показано, что SAR650984 не вступало в перекрестную реакцию с CD38 яванского макака, тогда как гуманизированное 9G7 связывалось с CD38 яванского макака с высокой аффинностью (фиг. 24), позволяя предложить, что у двух указанных антител перекрывающиеся, но различные эпитопы.

В последовательности F6 остаток M110 представляет собой валин в CD38 яванского макака. Таким образом, в контексте полноразмерного внеклеточного домена CD38 человека, мы мутировали M110 на валин (SEQ ID NO: 204) и сравнили связывание с ним h9G7 и SAR650984. Выявили пониженное связывание SAR650984 по сравнению со связыванием с CD38 дикого типа из человека, тогда как на связывание гуманизированного 9G7 это не повлияло (результаты не представлены). На основании кристаллической структуры SAR650984 в комплексе с внеклеточным доменом CD38 человека (PDB, код доступа 4CMH, Deckert и др., 2014 *Gin.Cancer Res.* 20: 4574) мы обнаружили дополнительный остаток, который потенциально важен для связывания SAR650984 и который отличается между CD38 человека и яванского макака. Данный остаток представлял собой T148 и представлял собой метионин в CD38 яванского макака. Мутация T148 на метионин во внеклеточном домене CD38 человека (SEQ ID NO: 205) значительно снижала связывание SAR650984, тогда как на связывание гуманизированного 9G7 это не повлияло (результаты не представлены). Двойная мутация внеклеточного домена CD38 человека, включающая мутации M110V и T148M (SEQ ID NO: 206, см. фиг. 23), нарушала связывание SAR650984, тогда как на связывание гуманизированного 9G7 это не повлияло (фиг. 24). Таким образом, можно прийти к заключению, что хотя гуманизированное 9G7 и SAR650984 конкурируют за связывание с CD38 человека, остатки, которые связываются данными антителами, не идентичны.

Картирование эпитопа 767

Эпитоп антитела 767 картировали, используя такой же набор слитых белков линейный пептид-Fc, как и использованный в экспериментах по картированию эпитопов, описанных выше. Антитело 767 (тяжелая цепь с последовательностью SEQ ID NO: 151 и легкая цепь с последовательностью SEQ ID NO: 152) ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 (приблизительно 700 RU). Слитые белки пептид-Fc (F1-F20, SEQ ID NO: 182-201) подавали при концентрации 1000 нМ в течение 240 с. Внеклеточный домен CD38 человека подавали в качестве контроля. Только для F3 и контроля получили сигнал связывания (фиг. 25). Когда последовательность F3 картировали на трехмерную поверхность внеклеточного домена CD38 человека (фиг. 26), он частично перекрывался с эпитопом SAR650984, в частности, с двумя остатками: E76 и H79. Тем не менее, 767 вступало в перекрестную реакцию с CD38 яванского макака (с более низкой аффинностью), тогда как SAR650984 не вступало, позволяя предложить, что у данных двух антител перекрывающиеся, но различные эпитопы. Более того, SAR650984 не связывалось конструкцией

F3, что выявили с помощью ППР (фиг. 27). Таким образом, можно прийти к заключению, что хотя 767 и SAR650984 конкурируют за связывание с CD38 человека, остатки, которые связываются данными антителами, не идентичны.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его фрагмент, которые связываются с CD38 человека, содержащие CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 208, и CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 209, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 210; и содержащие CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 211 или SEQ ID NO: 214, и CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 29 или SEQ ID NO: 212, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 213.

2. Антитело или его фрагмент по п.1, причем указанное антитело или его фрагмент представляет собой антитело мыши, химерное антитело или гуманизированное антитело.

3. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, причем указанное антитело или его фрагмент содержит последовательность вариательной области тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариательной области тяжелой цепи, и/или указанное антитело или его фрагмент содержит последовательность вариательной области легкой цепи, включающую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариательной области легкой цепи.

4. Антитело или его фрагмент по п.1 или 2, причем указанное антитело или его фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи, включающую последовательность аминокислот, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариательной области тяжелой цепи, и/или указанное антитело или его фрагмент содержит последовательность легкой цепи, включающую последовательность аминокислот, выбранную из группы из SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, или последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична не относящемуся к CDR участку любой из указанных последовательностей вариательной области легкой цепи.

5. Антитело или его фрагмент по пп.1-3, причем указанное антитело или фрагмент содержит константные области тяжелой и/или легкой цепей человека и константная область тяжелой цепи человека выбрана из группы иммуноглобулинов человека, состоящей из IGHG1, нефукозилированного IGHG1 и IGHG4.

6. Биспецифическое антитело, которое связывается с человеческим CD38 и человеческим CD3, содержащее фрагмент антитела против CD38 по любому из пп.1-3 и фрагмент антитела против CD3, причем указанный фрагмент антитела против CD3 содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 3, и CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 4, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 9; и содержит CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 6, и CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 11, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; или указанный фрагмент антитела против CD3 содержит CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 163, и CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 164, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 165; и содержит CDR1 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 166, и CDR2 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 167, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность аминокислот SEQ ID NO: 168.

7. Биспецифическое антитело по п.6, причем указанный фрагмент антитела против CD38 выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, биспецифических димеров одноцепочечных Fv, диател, триател и scFv.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп.6, 7, дополнительно содержащее фрагмент антитела против CD3, выбранный из группы, состоящей из Fab, Fab', Fab'-SH, Fd, Fv, dAb, F(ab')₂, scFv, биспецифических димеров одноцепочечных Fv, диател, триател и scFv.

9. Композиция для лечения гематологического заболевания, содержащая антитело или его фрагмент, которые связываются с человеческим CD38, по любому из пп.1-5 или биспецифическое антитело, которое связывается с человеческим CD38 и человеческим CD3, по любому из пп.6 - 8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Иммуноконъюгат для доставки терапевтического агента в клетку, которая экспрессирует антиген-мишень, содержащий антитело или его фрагмент, которые связываются с человеческим CD38, по любому из пп.1-5 или биспецифическое антитело, которое связывается с человеческим CD38 и человеческим CD3, по любому из пп.6-8, конъюгированное с терапевтическим агентом.

11. Применение антитела или его фрагмента по любому из пп.1- 5 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из злокачественных гематологических заболеваний, включая множественную миелому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, макроглобулинемию Вальденстрема, первичный системный амилоидоз, мантийноклеточную лимфому, пролимфоцитарный/миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, фолликулярную лимфому, NK-клеточный лейкоз и плазматический лейкоз.

12. Применение биспецифического антитела по любому из пп.6-8 в качестве лекарственного средства для лечения заболевания, выбранного из группы, состоящей из злокачественных гематологических заболеваний, включая множественную миелому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, В-клеточный острый лимфоцитарный лейкоз, макроглобулинемию Вальденстрема, первичный системный амилоидоз, мантийноклеточную лимфому, пролимфоцитарный/миелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, фолликулярную лимфому, NK-клеточный лейкоз и плазматический лейкоз.

Антитело	Обратные мутации VH / VL	SEQ ID NO H / L цепи	Временная экспрессия (мг/л)	FAB Tm (°C)	Окрашивание HPB-ALL по сравнению с химерой ОКТ3
Химерное ОКТ3	не применимо	25/26	20	80.7	+++
VH/VL	- / -	27/39	50	88.1	-
VH/VL2	- / M4L	27/41	47	90.6	-
VH/VL3	- / M4L- F71Y	27/42	43	89.8	+
VH1/VL1	A49G / F71Y	28/40	22	90.1	-
VH1/VL2	A49G / M4L	28/41	42	90.5	-
VH1/VL3	A49G / M4L-F71Y	28/42	40	90.7	+
VH2/VL1	I34M-A49G / F71Y	29/40	51	89.5	-
VH2/VL2	I34M-A49G / M4L	29/41	43	90.1	-
VH2/VL3	I34M-A49G / M4L- F71Y	29/42	42.5	89.5	+
VH3/VL1	A49G-A71T / F71Y	30/40	33.5	89.7	-
VH3/VL2	A49G-A71T / M4L	30/41	42	90.4	-
VH3/VL3	A49G-A71T / M4L- F71Y	30/42	56.5	89.8	+

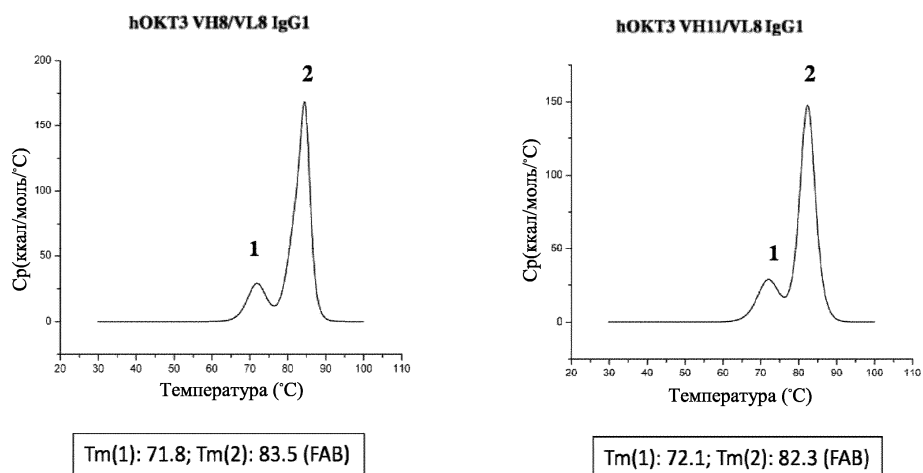
Фиг. 1А

Антитело	Обратные мутации	SEQ ID NO H / L цепи	Временная экспрессия (мг/л)	FAB Tm (°C)	Окрашивани е HPB-ALL по сравнению с химерой ОКТ3
VH4/VL2	I34M-A49G-A71T / M4L	31/41	20	88.4	++
VH4/VL3	I34M-A49G-A71T / M4L-F71Y	31/42	34	88.7	++
VH5/VL2	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L	32/41	40	87	++
VH5/VL3	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-F71Y	32/42	36	87.2	++
VH5/VL4	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	32/43	12	80.3	+++
VH5/VL6	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y-P96F	32/45	15.6	78.6	+++
VH5/VL7	I34M-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-V33M-A34N-F71Y-P96F	32/46	35.4	84.1	++
VH6/VL3	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-F71Y	33/42	23	88.3	++
VH6/VL4	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	33/43	14	80.8	+++
VH6/VL5	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-V33M-A34N-F71Y	33/44	26	86.1	++
VH6/VL6	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y-P96F	33/45	14.8	79.1	+++
VH6/VL7	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-V33M-A34N-F71Y-P96F	33/46	32	85.3	++

Фиг. 1В

Антитело	Обратные мутации	SEQ ID NO H / L цепи	Временная экспрессия (мг/л)	FAB Tm (°C)	Окрашивание с НРВ-ALL по сравнению с химерой ОКТ3
VH6/VL8	I34M-V48I-A49G-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	33/47	7	80.6	+++
VH7/VL3	I34M-A49G-R58N-I69L-A71T-T73K / M4L-F71Y	34/42	21	86.1	++
VH7/VL4	I34M-A49G-R58N-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	34/43	25	80.5	+++
VH7/VL5	I34M-A49G-R58N-I69L-A71T-T73K / M4L-V33M-A34N-F71Y	34/44	26	84.12	++
VH8/VL4	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	35/43	7	80.9	+++
VH8/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	35/47	23	83.5	+++
VH9/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-G65S-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	36/47	13	82	+++
VH10/VL4	I34M-V48I-A49G-R58Y-G65S-F67A-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-F71Y	37/43	7	78.6	+++
VH10/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-G65S-F67A-I69L-A71T-T73K / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	37/47	10	80.4	+++
VH11/VL4	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K-N82aS / M4L-L46R-L47W-F71Y	38/43	8	80.3	+++
VH11/VL8	I34M-V48I-A49G-R58Y-I69L-A71T-T73K-N82aS / M4L-L46R-L47W-R66G-F71Y	38/47	15	82.3	+++

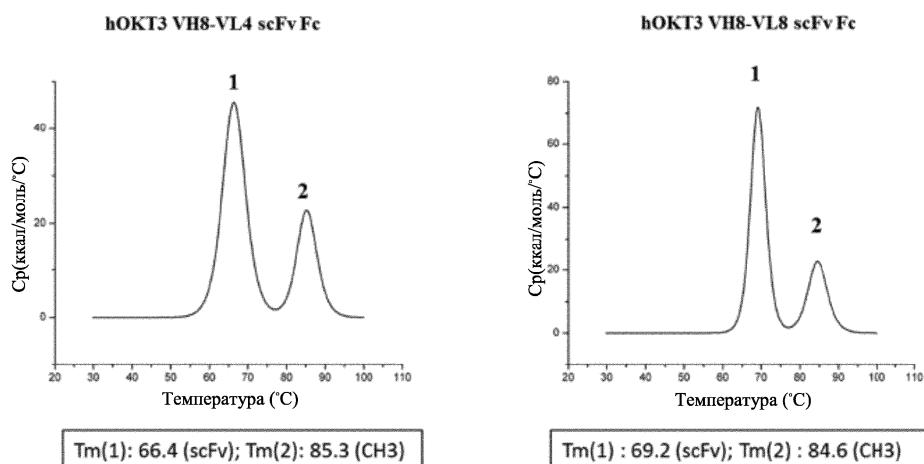
Фиг. 1С



Фиг. 1D

Слитые scFv-Fc	SEQ ID NO	Временная экспрессия (мг/л)	scFv Tm (°C)	Окрашивание НРВ-ALL по сравнению с химерой ОКТ3
ОКТ3 мыши	52	0.35	-	++
VH5-VL3	53	21	71.2	+
VH6-VL4	54	29	65.3	++
VH6-VL5	55	27	71.2	++
VH8-VL4	56	28	66.4	+++
VH8-VL8	57	28	69.2	+++

Фиг. 1E



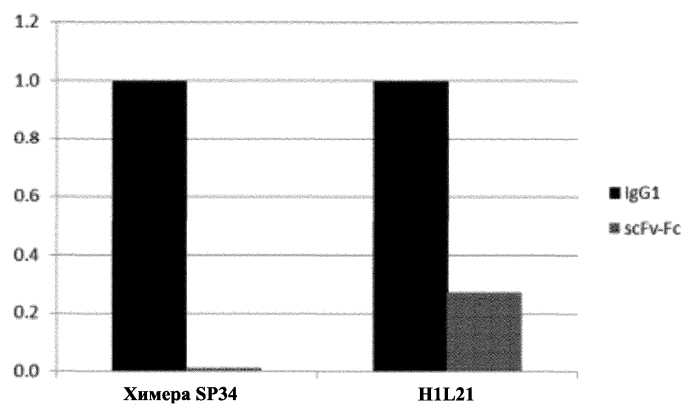
Фиг. 1F

Антитело	Обратные мутации VH/VL	SEQ ID NO H/L цепи	Формат	Временная экспрессия (мг/л)	ППР: Связывание с CD3-эпсилон 1-26 человека/ яванского макака_Fc
Химерное SP34	не применимо	62/63	IgG1	7	++++
VH1/VL1	-/-	64/69	IgG1	8	+
VH1/VL2	-/Q89A	64/70	IgG1	1	++++
VH1/VL3	-/делеция 8P	64/71	IgG1	0.5	-
VH1/VL4	-/делеция 8P-Q89A	64/72	IgG1	0.5	++++
VH1/VL5	-/A2I-Q89A	64/73	IgG1	2.6	++++
VH1/VL6	-/F44P-Q89A	64/74	IgG1	0.9	++++
VH1/VL7	-/A2I-F44P-Q89A	64/75	IgG1	Нет экспрессии	Не тестировали
VH1/VL8	-/L66G-Q89A	64/76	IgG1	0.8	+
VH1/VL9	-/A2I-L66G-Q89A	64/77	IgG1	Нет экспрессии	Не тестировали
VH1/VL10	-/F87Y-Q89A	64/78	IgG1	6	++++
VH1/VL11	-/L66G-D69T-Q89A	64/79	IgG1	0.8	+
VH1/VL12	-/D69T-Q89A	64/80	IgG1	1.5	++
VH1/VL13	-/S25A/Q89A	64/81	IgG1	1	+++
VH1/VL14	-/G46L-Q89A	64/82	IgG1	3	-
VH1/VL15	-/E38Q-Q89A	64/83	IgG1	3	++++
VH1/VL16	-/A2I-D69T-Q89A	64/84	IgG1	0.5	+
VH1/VL17	-/A2I-S25A-Q89A	64/85	IgG1	1	++
VH1/VL18	-/A2I-Q89A-Q100G	64/86	IgG1	1	++
VH1/VL19	-/A2I-D69T-F87Y-Q89A	64/87	IgG1	0.2	+
VH1/VL20	-/A2I-E38Q-D69T-F87Y-Q89A	64/88	IgG1	Нет экспрессии	Не тестировали
VH1/VL21	-/A2I-F87Y-Q89A	64/89	IgG1	8	++++
VH1/VL22	-/A2I-E38Q-F87Y-Q89A	64/90	IgG1	2	+++

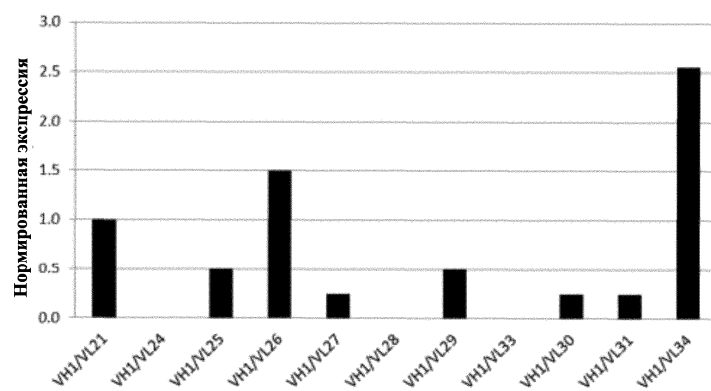
Фиг. 2A

Слитый scFv-Fc	Обратные мутации VH/VL	SEQ ID NO H/L цепи	Формат	Временная экспрессия (мг/л)	ППР: Связывание с CD3-эпсилон 1-26 человека/яванского макака_Fc
VH2/VL21	G65S /A2I -F87Y-Q89A	91	scFv-Fc	5	+++
VH3/VL23	G65S-W100eY /A2I-F87Y-Q89A-W91F	92	scFv-Fc	10	++
VH4/VL23	G65S-W100eF /A2I-F87Y-Q89A-W91F	93	scFv-Fc	5.5	++++
VH5/VL23	W100eY/A2I-F87Y-Q89A-W91F	94	scFv-Fc	15	++++
VH1/VL24	-/A2I-T27A-G27aA- F87Y-Q89A	349	scFvFc	Нет экспрессии	Не тестировали
VH1/VL25	-/A2I-V27cA-T28A- F87Y-Q89A	350	scFvFc	4	-
VH1/VL26	-/A2I-T29A-S30A- F87Y-Q89A	351	scFvFc	12	++++
VH1/VL27	-/A2I-N31A-Y32A- F87Y-Q89A	95	scFv-Fc	2	-
VH1/VL28	-/A2I-N52A-K53A- F87Y-Q89A	96	scFv-Fc	Нет экспрессии	Не тестировали
VH1/VL29	-/A2I-R54A-P56A- F87Y-Q89A	97	scFv-Fc	4	-
VH1/VL30	-/A2I-Y92A-S93A- F87Y-Q89A	98	scFv-Fc	2	+
VH1/VL31	-/A2I-N94A -F87Y-Q89A	99	scFv-Fc	2	++
VH5/VL32	W100eY/A2I-T29A-S30A-T51A-F87Y-Q89A-W91F	100	scFv-Fc	25	++++

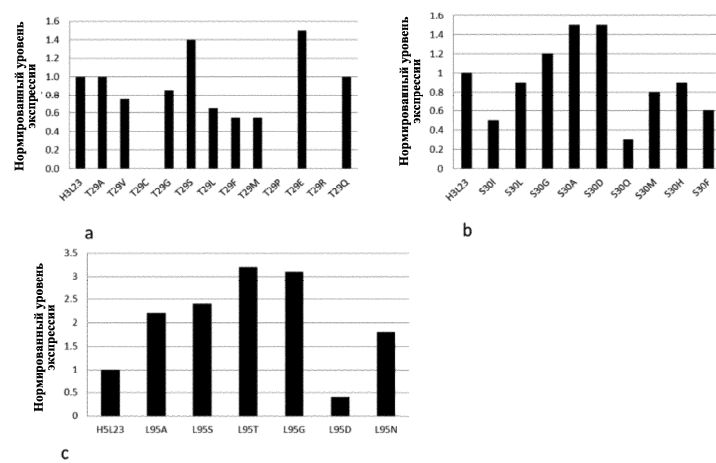
Фиг. 2B



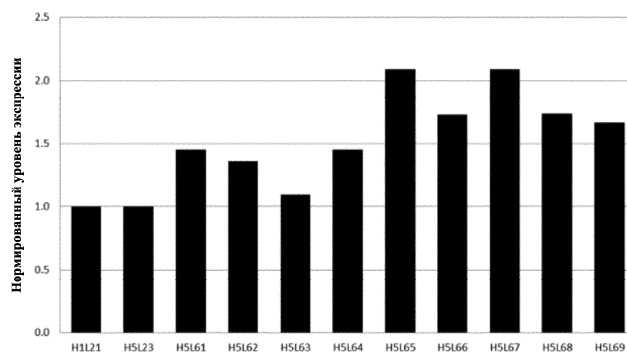
Фиг. 3



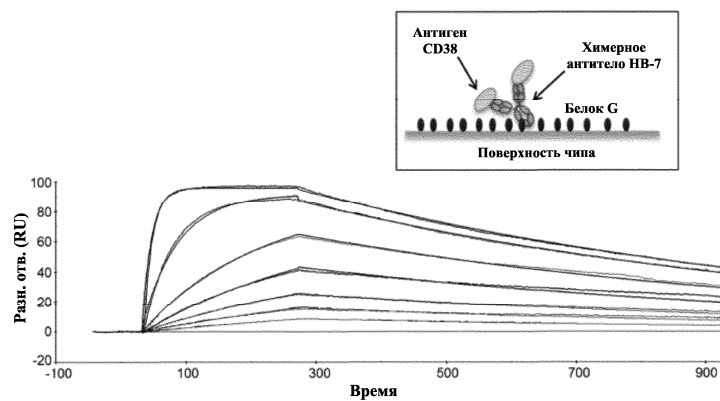
Фиг. 4



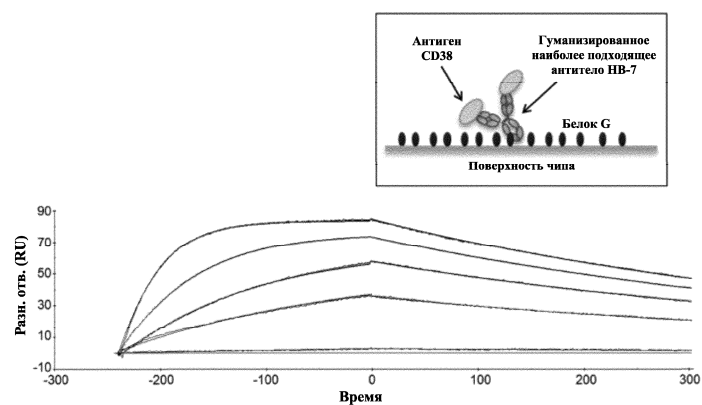
Фиг. 5



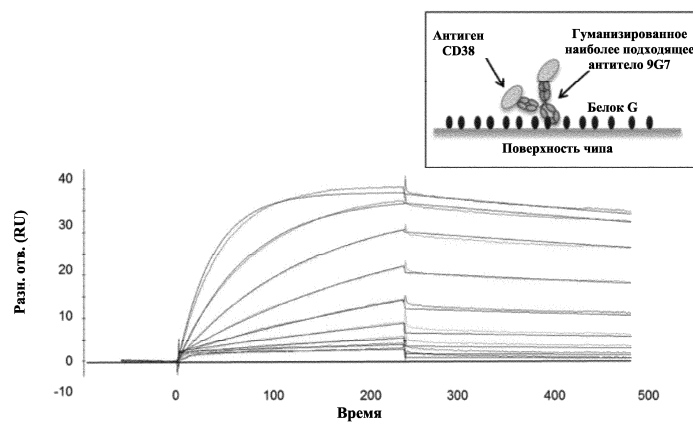
Фиг. 6



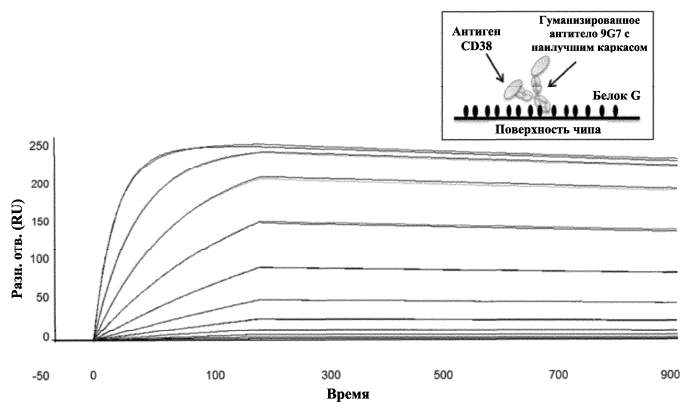
Фиг. 7А



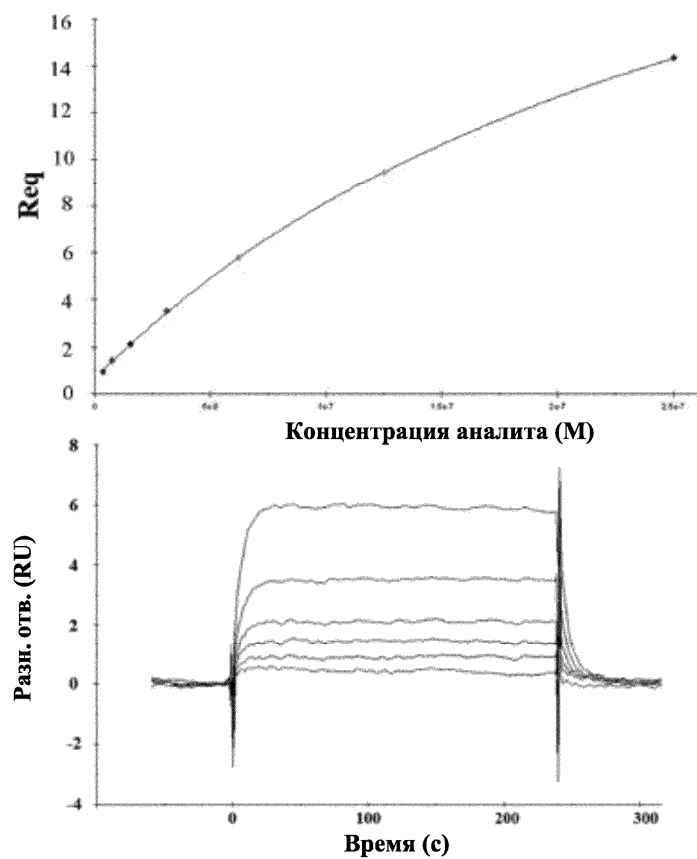
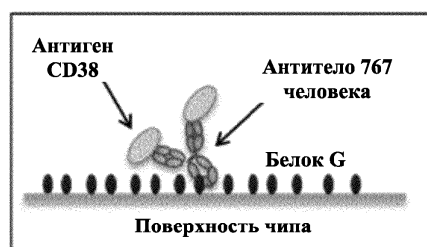
Фиг. 7В



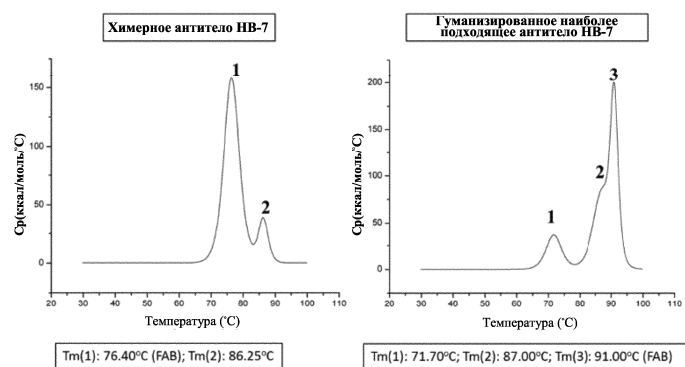
Фиг. 7С



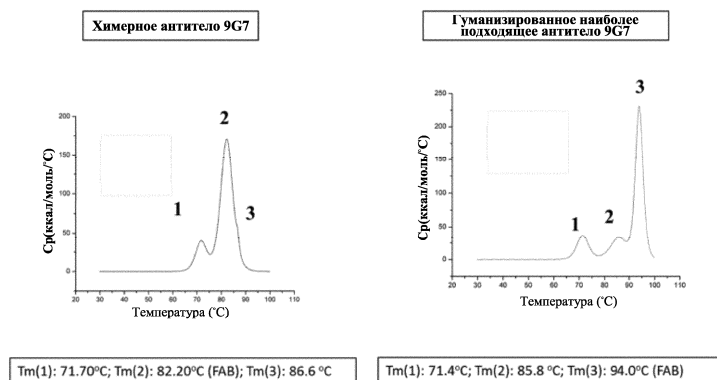
Фиг. 7D



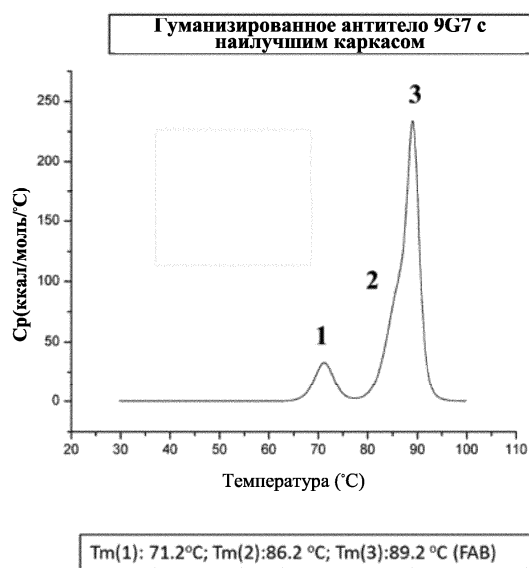
Фиг. 7Е



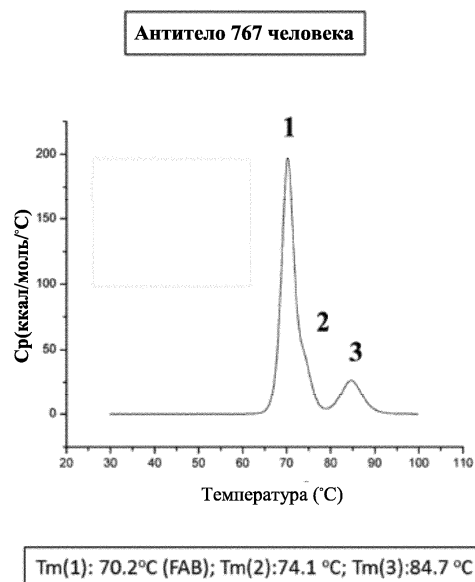
Фиг. 7F



Фиг. 7G



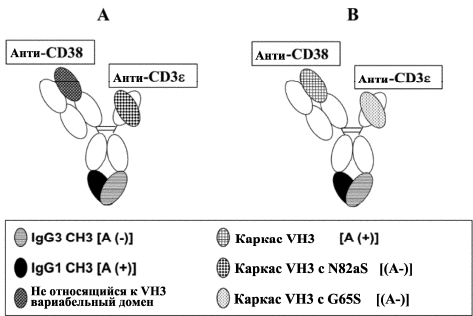
Фиг. 7H



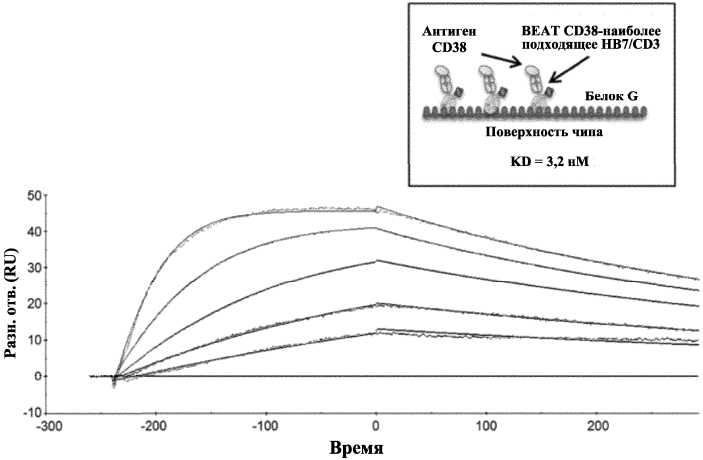
Фиг. 7I

	Химерное антитело 9G7	Гуманизированное наиболее подходящее антитело 9G7	Гуманизированное антитело 9G7 с наилучшим каркасом
HC/LC SEQ ID NO	126/127	124/128	131/132
Уровни временной экспрессии (мг/л)	20	11	17
KD CD38 человека (нМ)	0.4	0.5	0.4
KD CD38 яванского макака (нМ)	1	3.2	1
FAB Tm (°C)	82.2	94	89.2

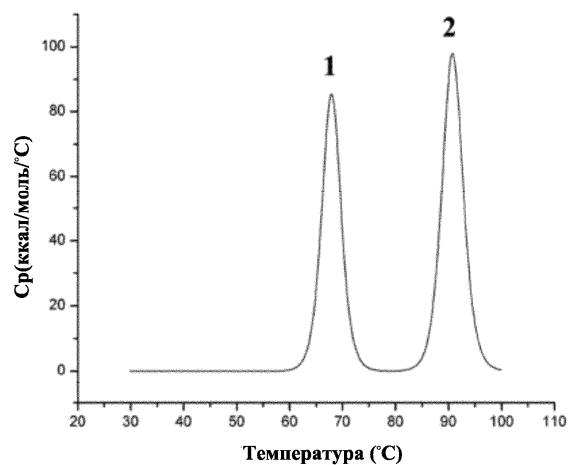
Фиг. 7J



Фиг. 8



Фиг. 9A



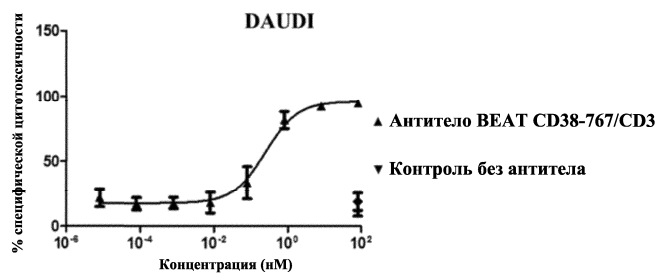
Tm(1): 67.9°C (scFv); Tm(2): 90.8°C (FAB)

Фиг. 9В

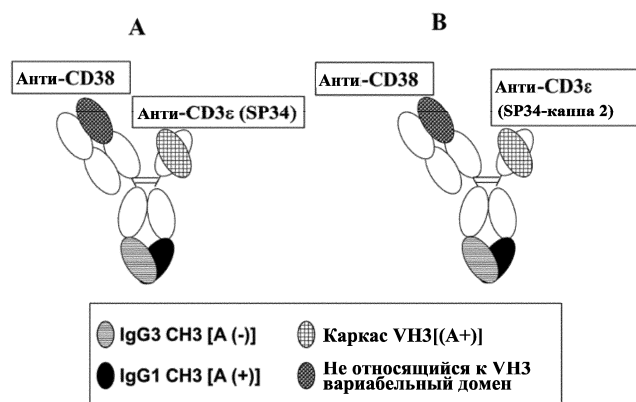
RPMI 8226



Фиг. 10

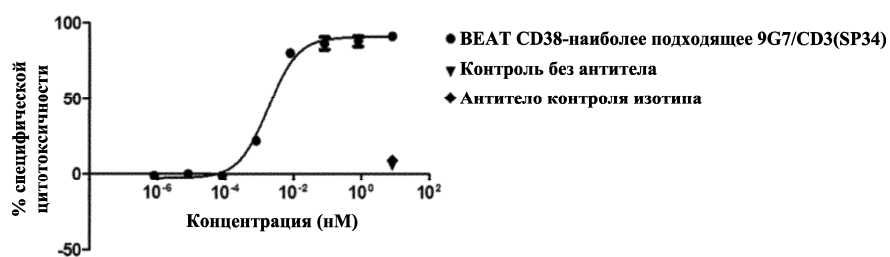


Фиг. 11



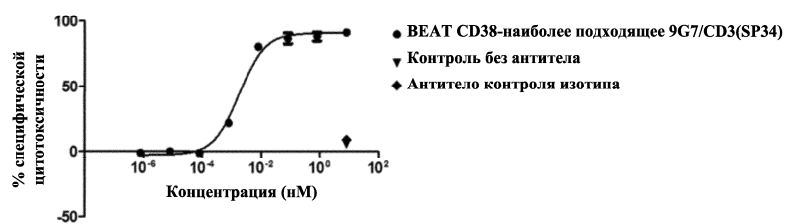
Фиг. 12

DAUDI

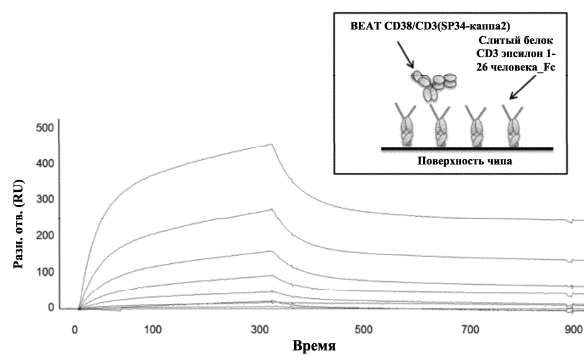


Фиг. 13

DAUDI

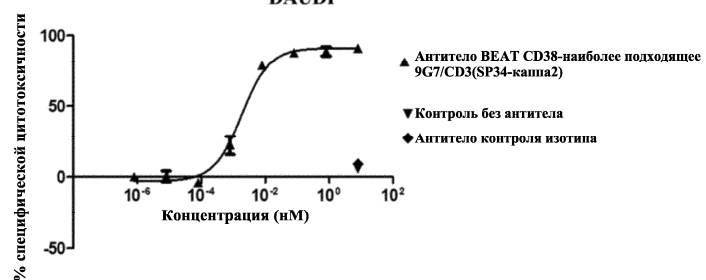


Фиг. 13



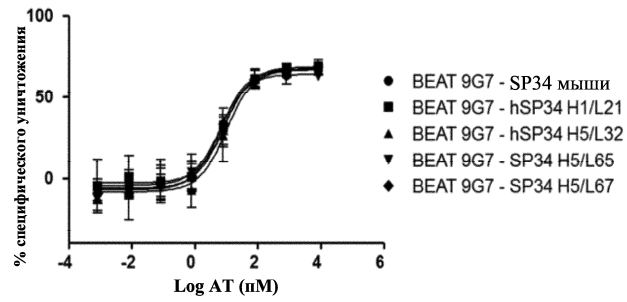
Фиг. 14

DAUDI



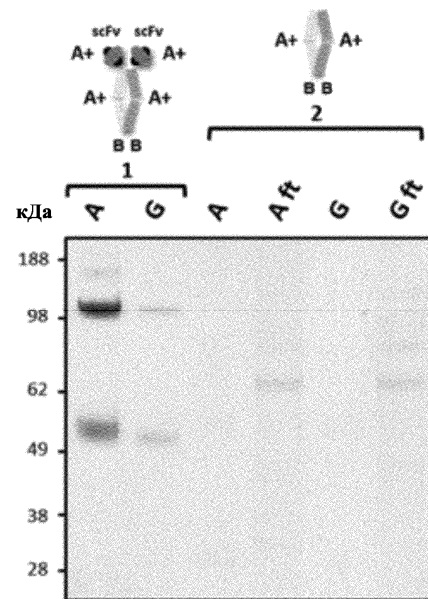
Фиг. 15

RDL на клетках RAJI – Среднее значение по 2 донорам

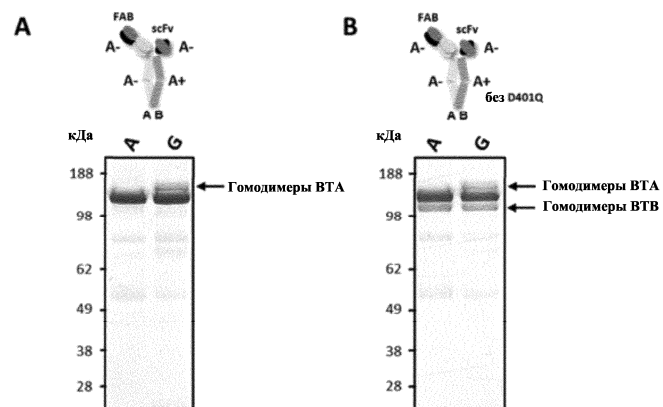


	EC50 BEAT 9G7-SP34 мыши	EC50 BEAT 9G7 - RSP34 H1L21	EC50 BEAT 9G7 - RSP34 H5L32	EC50 BEAT 9G7 - RSP34 H5L65	EC50 BEAT 9G7 - RSP34 H5L6
Среднее	7.883	8.807	10.09	6.170	6.493
Ст. отклонение	2.879	5.098	1.185	1.326	

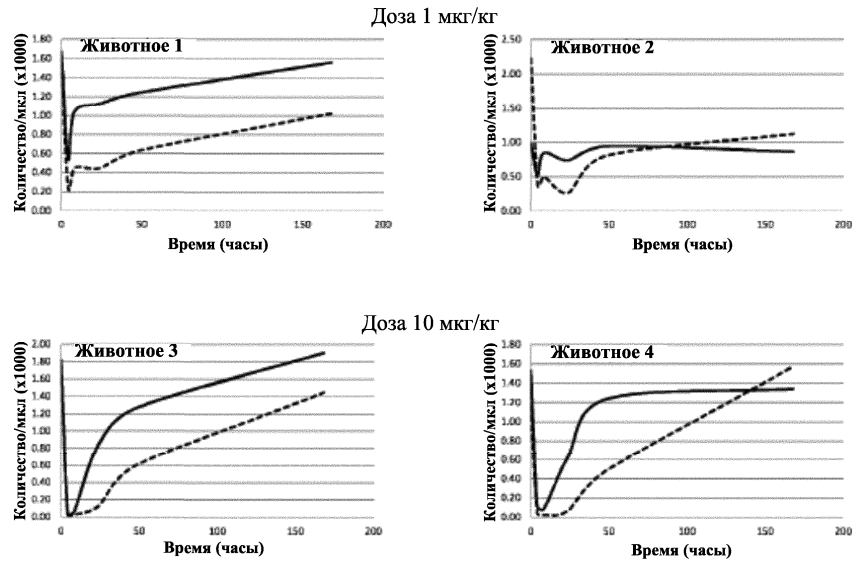
Фиг. 16



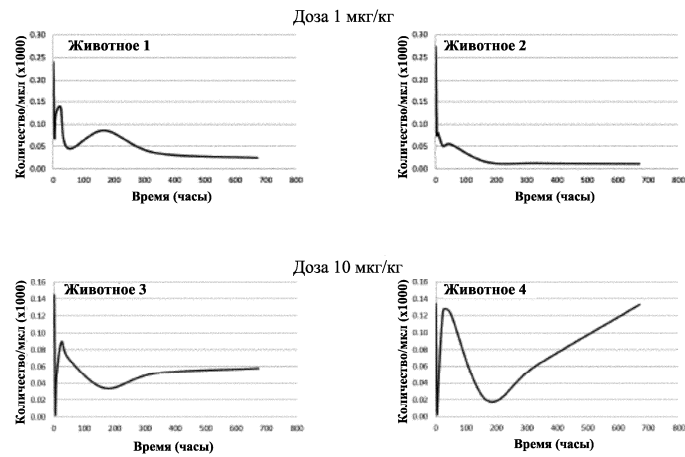
Фиг. 17



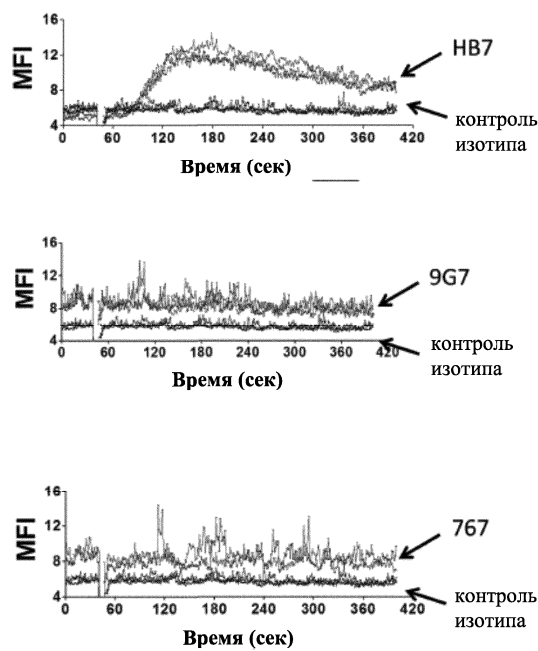
ФИГ. 18



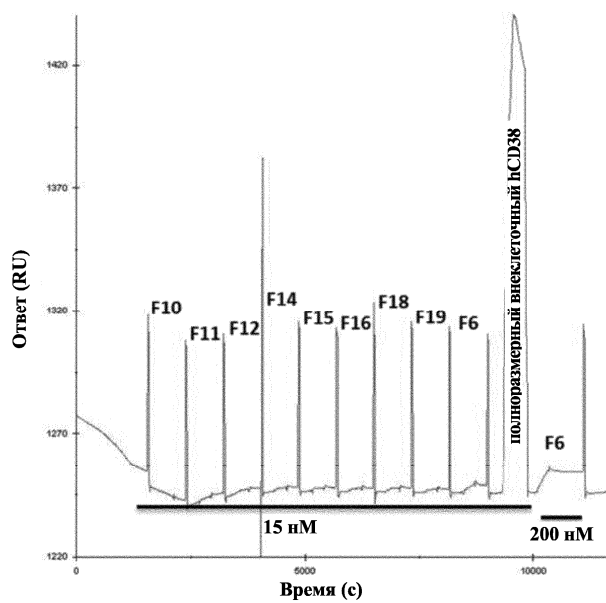
Фиг. 19



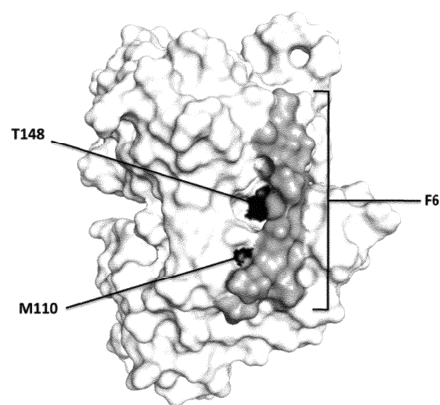
Фиг. 20



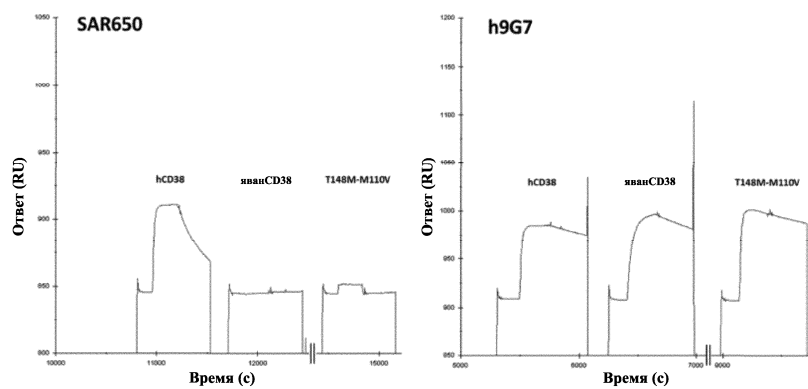
Фиг. 21



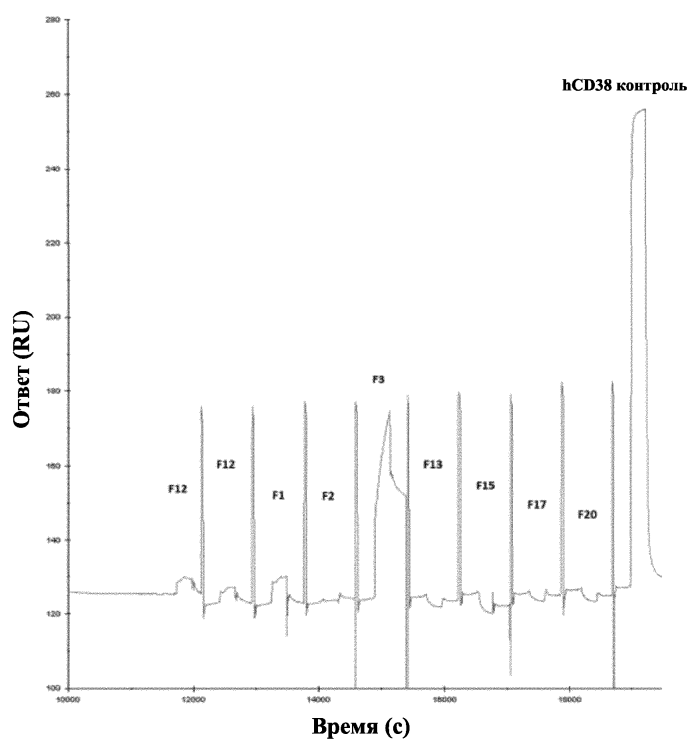
Фиг. 22



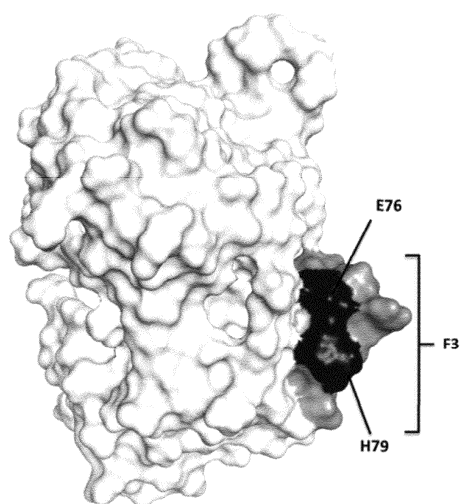
Фиг. 23



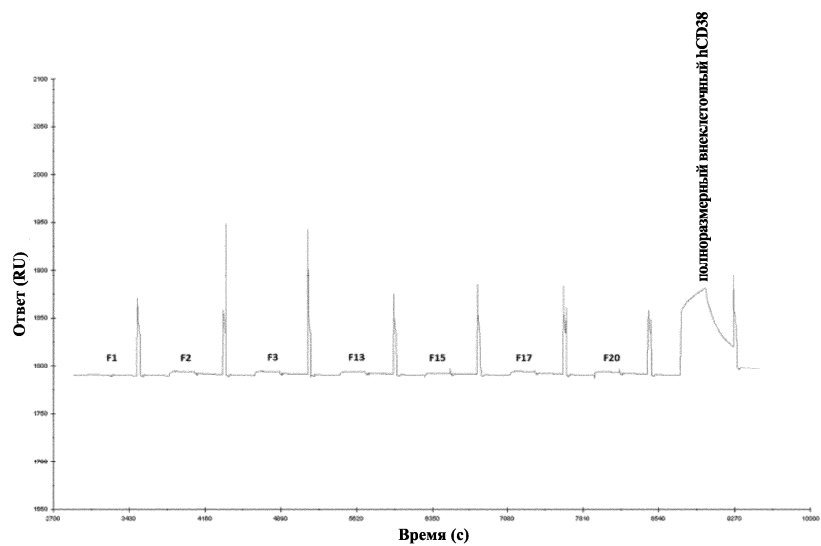
Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26



Фиг. 27

