

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040019**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.04.11

(51) Int. Cl. **A61K 51/10** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

(21) Номер заявки
201790060

(22) Дата подачи заявки
2015.06.30

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ CD33- И CD3-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

(31) **62/019,795; 62/111,470; 14/642,497**

(32) **2014.07.01; 2015.02.03; 2015.03.09**

(33) **US**

(43) **2017.08.31**

(86) **PCT/US2015/038666**

(87) **WO 2016/004108 2016.01.07**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АМФИВЕНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Эллвангер Кристина (DE), Эвнин
Люк, Фокс Джудит А. (US), Фусек
Ивиса (DE), Гуно Жанмари (US),
Кнакмусс Штефан (DE), Кункель
Лори (US), Литтл Мелвин, Молкентин
Вера, Ражкович Эрик, Реуш Увэ, Волл
Клаудиа, Вейчел Михаэль, Жуковский
Евгений (DE)**

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) EP-B1-2155783

COCHLOVIUS et al. Cure Of Burkitt's Lymphoma In Severe Combined Immunodeficiency Mice By T Cells, Tetravalent CD3 X CD19 Tandem Diabody, And CD28 Costimulation. Cancer Research. 15 August 2000, Vol. 60, pages 4336-4341; title; abstract; figure 1B; page 4339, fifth paragraph

WO-A2-2014012085

SUTHERLAND et al. SGN-CD33A: A Novel CD33-Targeting Antibody-Drug Conjugate Utilizing A Pyrrolobenzodiazepine Dimer As Active In Models Of Drug-Resistant AML. Blood Journal. 14 June 2013, pages 1-35, electronic version; tables 1, 2A; page 11, first paragraph.

WO-A1-2013190555

Li et al. Cytosine Arabinoside Promotes Cytotoxic Effect Of T Cells On Leukemia Cells Mediated By Bispecific Antibody. Human Genome Therapy. August 2013, Vol. 24, pages 751-760; abstract, DOI: 10.1089/hum.2013.051.

WO-A1-2007048186

PERERA et al. V(D)J Germline Gene Repertoire Analysis Of Monoclonal D Antibodies And The Implications For D Epitope Specificity. Transfusions. 2000, Vol. 40, No. 7, pages 846-855; AAF14210.

HU et al. Immunoglobulin Mu Heavy Chain, Partial, GenBank AFR53885.1. 16 September 2012; AFR53885.

WO-A2-2008119565

(57) В изобретении описаны связывающие белки, которые специфически связываются с человеческим CD33 и, в частности, биспецифические связывающие белки, которые специфически связываются с человеческим CD33 и человеческим CD3. Также в изобретении описаны биспецифические тандемные диатела, которые связываются с CD33 и CD3, и их применение для иммунотерапии CD33⁺-рака, заболеваний и состояний, таких как острый миелоидный лейкоз (AML).

B1**040019****040019****B1**

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США номер 62/019795, поданной 1 июля 2014 года; предварительной заявке на патент США номер 62/111470, поданной 3 февраля 2015 года; и является продолжением обычной заявки США номер 14/642497, поданной 9 марта 2015 года, содержание каждой из которых включено в настоящую заявку посредством отсылки.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который включен посредством ссылки в полном объеме. Документ, содержащий перечень последовательностей, созданный 30 июня 2015 года, назван 45375-704.601_SL.txt и имеет размер 147965 байтов.

Сведения о предшествующем уровне техники

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой острый лейкоз у взрослых и детей. CD33 экспрессируется на большинстве миелобластов AML. В некоторых публикациях сообщается, что экспрессия CD33 обычно ограничивается ранними мультилинейными миелоидными предшественниками и отсутствует в нормальных плюрипотентных гематopoэтических стволовых клетках.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе предлагаются связывающие белки, которые специфически связываются с человеческим CD33, и биспецифические связывающие белки, которые специфически связываются с человеческим CD33 и человеческим CD3. Также в настоящем документе предлагаются вариабельные домены анти-CD33 и вариабельные домены анти-CD3 для создания ряда биспецифических CD33/CD3-связывающих белков, таких как, например, тандемные диатела. Кроме того, в настоящем документе предлагаются также биспецифические тандемные диатела, которые связываются с CD33 и CD3, и их применение для иммунотерапии острого миелоидного лейкоза (AML) и других гематологических злокачественных опухолей, нарушений или состояний.

В частности, предлагаются связывающие белки, которые показывают связывание с CD33 человека и макака-крабоедов. В примерах показано, что эти CD33/CD3-тандемные диатела могут перенаправлять поликлональные CD3⁺-Т-клетки от здоровых доноров, а также аутологичные Т-клетки от пациентов с AML на эффективный лизис CD33⁺-клеток AML при низких соотношениях Е:Т. В этом процессе, который зависит от присутствия как CD33⁺-клеток-мишеней, так и Т-клеток, перенаправленные Т-клетки активируются, как видно по индукции CD25 и CD69, и стимулируются для пролиферации. Показано, что анти-AML эффект этих тандемных диател зависит от концентрации используемых антител, а также клеточного соотношения Е:Т. Тандемное диатело является четырехвалентным и имеет два участка связывания для CD33 и два участка связывания для CD3. Особым отличительным признаком описанных здесь CD33/CD3-тандемных диател является то, что они способствуют сильному и эффективному апоптозу, возникающему в результате бивалентного связывания, которое обеспечивает avidность к каждому антигену, а именно CD33 и CD3.

Вкратце, предлагаемые CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, в частности тандемные диатела, индуцируют сильный цитолитический CD33⁺-лейкозных клеток и клеток первичного AML *in vitro*. Примеры биспецифических CD33/CD3-связывающих белков в формате антитела на основе тандемных диател демонстрируют цитолитическую активность *in vivo* в клеточных линиях, клетках первичного AML, а также в моделях *in vivo* с клеточными линиями AML и клетками первичного AML, полученными от пациента. Это указывает на высокую *in vivo* активность, особенно заметную в строгой модели PDX AML. Кроме того, примеры биспецифических CD33/CD3-связывающих белков в формате антитела на основе тандемных диател демонстрируют цитолитическую активность *ex vivo* в образцах, полученных от пациентов на всех стадиях AML, включая впервые диагностированных, рецидивирующих и рефрактерных пациентов.

Кроме того, эти CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, способны достигать значительного лизиса CD33-экспрессирующих клеток в течение примерно четырех часов. Таким образом, CD33/CD3-связывающие белки проявляют высокую цитотоксичность при низких плотностях CD33 на клеточной поверхности, а также высокую цитотоксичность при низких соотношениях эффектор:мишень (Е:Т). Кроме того, CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, проявляют не только сильные аффинности связывания CD33 и CD3 с человеческими белками, но также показывают превосходную кросс-реактивность с соответствующими белками макака-крабоедов, например, с соотношениями K_D человек:макака-крабоед от 5 до 0,2. Кроме того, CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, не показывают значительной индукции высвобождения цитокина при отсутствии CD33⁺-клеток-мишеней, что является важным компонентом профиля безопасности этих молекул. Кроме того, CD33/CD3-тандемные диатела, описанные здесь, принадлежат классу молекул, которые имеют периоды полувыведения в интервале приблизительно 8-24 ч, что должно обеспечить удобное дозирование.

В одном аспекте в настоящем документе предлагаются CD33-связывающие белки, которые специфически связываются с эпитопом человеческого CD33. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки содержат вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи человеческого происхождения.

В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок имеет по меньшей мере один

участок связывания, содержащий переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен легкой цепи содержит гиперпеременный участок CDR1, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-27, CDR2, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28-34, и CDR3, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-41.

В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок имеет по меньшей мере один участок связывания, содержащий переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, при этом переменный домен тяжелой цепи содержит гиперпеременный участок CDR1, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48, CDR2, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-55, и CDR3, состоящий из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-63.

В определенных случаях CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена легкой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 28 и 35; SEQ ID NO: 22, 29 и 36; SEQ ID NO: 23, 30 и 37; SEQ ID NO: 24, 31 и 38; SEQ ID NO: 25, 32 и 39; SEQ ID NO: 26, 33 и 40; и SEQ ID NO: 27, 34 и 41.

В определенных случаях CDR1, CDR2 и CD3 переменного домена тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 49 и 56; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 58; SEQ ID NO: 43, 50 и 59; SEQ ID NO: 43, 50 и 60; SEQ ID NO: 44, 51 и 61; SEQ ID NO: 45, 52 и 62; SEQ ID NO: 46, 53 и 63; SEQ ID NO: 47, 54 и 63; и SEQ ID NO: 48, 55 и 63.

В определенных случаях участок связывания с человеческим CD33 переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19; и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD33 находится в пределах $_{62}$ DQEVQEETQ $_{70}$ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 SEQ ID NO: 93) человеческого CD33.

В любом из указанных выше вариантов осуществления CD33-связывающий белок содержит по меньшей мере один дополнительный функциональный домен. В некоторых случаях функциональный домен представляет собой эффекторный домен, который связывается с эффекторной клеткой. В определенных случаях эффекторный домен представляет собой CD3-связывающий участок, содержащий по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи антитела, образуя антигенсвязывающий участок для человеческого CD3.

В определенных случаях CD3-связывающий участок содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-последовательность STYAMN (SEQ ID NO: 72), CDR2-последовательность RIR-SKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73) и CDR3-последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74). В других случаях CD3-связывающий участок содержит переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), CDR2-последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 91) и CDR3-последовательность ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

В определенных случаях CD3-связывающий участок содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 64 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 68; переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 65 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 69; переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 66 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 70; или переменный домен тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 67 и переменный домен легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 71.

В любом из указанных выше вариантов осуществления CD33-связывающий белок представляет собой димерный белок. В любом из указанных выше вариантов осуществления CD33-связывающий белок является мультифункциональным.

В определенных случаях мультифункциональный CD33-связывающий белок обладает биспецифичностью в отношении CD33 и CD3, при этом специфичности связывания обеспечены переменными доменами тяжелой цепи и переменными доменами легкой цепи для CD33 и CD3, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68; SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71; и SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются биспецифические антигенсвязывающие тандемные диатела, специфические в отношении человеческого CD3 и человеческого CD33. В некоторых вариантах осуществления тандемные диатела содержат первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре последовательно связанных друг с другом переменных домена цепи, при этом каждый полипептид содержит переменный домен тяжелой цепи, специфический в отношении человеческого CD33; переменный домен легкой цепи, специфический в

отношении человеческого CD33; вариабельный домен тяжелой цепи, специфический в отношении человеческого CD3, и вариабельный домен легкой цепи, специфический в отношении человеческого CD3, и при этом в каждом полипептиде четыре вариабельных домена цепи последовательно связаны друг с другом посредством пептидных линкеров L1, L2 и L3 в следующем порядке: VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3); VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); или VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).

В некоторых вариантах осуществления VL-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-27; CDR2, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28-34; и CDR3, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-41.

В некоторых вариантах осуществления VH-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48; CDR2, состоящий из последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-55; и CDR3, состоящий из последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-63.

В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 VL-домена, специфического в отношении человеческого CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 28 и 35; SEQ ID NO: 22, 29 и 36; SEQ ID NO: 23, 30 и 37; SEQ ID NO: 24, 31 и 38; SEQ ID NO: 25, 32 и 39; SEQ ID NO: 26, 33 и 40; и SEQ ID NO: 27, 34 и 41.

В некоторых вариантах осуществления CDR1, CDR2 и CDR3 VH-домена, специфического в отношении человеческого CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 49 и 56; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 58; SEQ ID NO: 43, 50 и 59; SEQ ID NO: 43, 50 и 60; SEQ ID NO: 44, 51 и 61; SEQ ID NO: 45, 52 и 62; SEQ ID NO: 46, 53 и 63; SEQ ID NO: 47, 54 и 63; и SEQ ID NO: 48, 55 и 63.

В некоторых вариантах осуществления VL- и VH-домены, специфические в отношении CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19; и SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит CDR1-последовательность STYAMN (SEQ ID NO: 72), CDR2-последовательность RIR-SKYNNTATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73) и CDR3-последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74) или HGNFGNSYVSFYFAY (SEQ ID NO: 75).

В некоторых вариантах осуществления VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит CDR1-последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), CDR2-последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 91) и CDR3-последовательность ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

В некоторых вариантах осуществления VL- и VH-домены, специфические в отношении CD3, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 69; SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 70; и SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 71.

В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид содержит четыре вариабельных домена цепи, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68; SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71; и SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

В некоторых вариантах осуществления линкеры L1, L2 и L3 состоят из около 12 или меньше аминокислотных остатков. В определенных случаях линкеры L1, L2 и L3, каждый, независимо представляют собой GGSGGS (SEQ ID NO: 95), GGSG (SEQ ID NO: 96) или GGSGG (SEQ ID NO: 97). В других случаях линкеры L1 и L3 представляют собой GGSGGS (SEQ ID NO: 95), и линкер L2 представляет собой GGSG (SEQ ID NO: 96) или GGSGG (SEQ ID NO: 97).

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое тандемное диатело имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-121. В других вариантах осуществления биспецифическое тандемное диатело представляет собой тандемное диатело 01 (SEQ ID NO: 98), 02 (SEQ ID NO: 99), 03 (SEQ ID NO: 100), 04 (SEQ ID NO: 101), 05 (SEQ ID NO: 102), 06 (SEQ ID NO: 103), 07 (SEQ ID NO: 104), 08 (SEQ ID NO: 105), 09 (SEQ ID NO: 106), 10 (SEQ ID NO: 107), 11 (SEQ ID NO: 108), 12 (SEQ ID NO: 109), 13 (SEQ ID NO: 110), 14 (SEQ ID NO: 111), 15 (SEQ ID NO: 112), 16 (SEQ ID NO: 113), 17 (SEQ ID NO: 114), 18 (SEQ ID NO: 115), 19 (SEQ ID NO: 116), 20 (SEQ ID NO: 117), 21 (SEQ ID NO: 118), 22 (SEQ ID NO: 119), 23 (SEQ ID NO: 120) или 24 (SEQ ID NO: 121).

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие тандемные диатела проявляют связывание с константой диссоциации K_D , равной 10 нМ или менее, с CD33 на опухолевых CD33⁺-клетках, выбранных из HL-60, KG-1 и U-937.

В некоторых вариантах осуществления биспецифические антигенсвязывающие тандемные диатела

специфически связываются с эпитопом человеческого CD33, который находится в пределах ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 SEQ ID NO: 93) человеческого CD33.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются полинуклеотиды, кодирующие CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело по любому из указанных выше вариантов осуществления. В другом аспекте в настоящем документе предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды. В другом аспекте в настоящем документе предлагаются клетки-хозяева, трансформированные с помощью описанных векторов.

В еще другом аспекте в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело по любому из указанных выше вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще другом аспекте в настоящем документе предлагаются способы получения CD33-связывающего белка или биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления, включающие введение в клетку-хозяина полинуклеотида, кодирующего CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело по любому из указанных выше вариантов осуществления, или вектора, содержащего описанные полинуклеотиды, культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых происходит экспрессия CD33-связывающего белка или биспецифического тандемного диатела, и очистку экспрессированного CD33-связывающего белка или биспецифического тандемного диатела.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы лечения CD33⁺-рака, включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему CD33⁺-раком. В некоторых вариантах осуществления CD33⁺-рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников, миелоидную саркому, множественную миелому, острую лимфому, острую лимфобластную лимфому или хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML). В некоторых вариантах осуществления CD33⁺-рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML). В некоторых вариантах осуществления CD33⁺-рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления CD33⁺-рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL).

Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы лечения острого миелоидного лейкоза (AML), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему AML. В некоторых вариантах осуществления AML представляет собой AML с рецидивирующими генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; миелоидные новообразования, связанные с терапией; миелоидную саркому; миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна; новообразование из бластных плазматоидных дендритных клеток или AML, не классифицируемый другим образом. В некоторых вариантах осуществления AML представляет собой AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7. В других вариантах осуществления AML является впервые диагностированным, рецидивирующим или рефрактерным.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы лечения миелоидного диспластического синдрома (MDS), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему MDS.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы лечения миелопролиферативного заболевания (MPD), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему MPD.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему CMML.

Кроме того, в настоящем документе предлагаются способы лечения иммуносупрессии супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из указанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему угнетением иммунитета.

Указанные выше способы лечения в определенных случаях дополнительно включают введение цитарабина, азациитидина, децитабина, антрациклина (например, даунорубин, идарубин, доксорубин и т.п.), амсакрина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эпитодофиллотоксина (например, этопозид, тенипозид и т.п.), антрацендиона (например, митоксантрон, пиксантрон, лозоксантрон, пироксантрон, аметантрон и т.п.), агента анти-CD20 (например, ритуксимаб, окрелизумаб, офатумумаб и т.п.) или их комбинаций.

Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и заявки на патент, упомянутые в описании, включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы было конкретно и в индивидуальном порядке указано, что каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент включена посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

Новые признаки изобретения изложены более подробно в прилагаемой формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет достигнуто путем обращения на следующее далее подробное описание, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, где использованы принципы изобретения, и в сопровождающих чертежах которого

на фиг. 1 представлено схематическое изображение организации генов и порядок доменов CD3/CD33-тандемных диател (TandAb®). Тандемные диатела экспрессируются в виде единичного полипептида, состоящего из четырех вариабельных доменов, соединенных посредством коротких пептидных линкеров L1, L2 и L3. После экспрессии два мономерных полипептида нековалентно соединяются по типу "голова-к-хвосту" с образованием функциональной молекулы гомодимерного тандемного диатела. L1, L2, L3: линкер; V_H: вариабельный домен тяжелой цепи; V_L: вариабельный домен легкой цепи;

на фиг. 2 - захват CD3 тандемным диателом и механизм его действия. Тандемные диатела представляют собой четырехвалентные биспецифические белки, которые могут захватывать цитотоксические Т-клетки посредством связывания с CD3. Тандемное диатело связывается с CD33⁺-опухолевой клеткой с помощью двух из четырех связывающих доменов, и с CD3 с другими с помощью других двух связывающих доменов. Это событие связывания (поперечного сшивания) Т-клетка/клетка-мишень способствует активации Т-клетки и стимулирует последующую деструкцию опухолевой клетки посредством зависимой от антител клеточной цитотоксичности (ADCC);

на фиг. 3 - варианты порядка доменов CD33/CD3-тандемных диател. Варианты порядка доменов вариабельных тяжелых (VH) и вариабельных легких (VL) цепей в пределах генных последовательностей, кодирующих тандемные диатела, позволяет получать антитела с CD33- и CD3-специфичностями, локализованными на внутренней или наружной поверхности молекулы. Указаны специфичности доменов, локализация сигнальных последовательностей (ss) и линкеров (L1, L2, L3), и аффинные метки (His), а также 5'- и 3'-концы;

на фиг. 4 - сравнение позитивно обогащенных Т-клеток здоровых доноров с прошедшими негативную селекцию Т-клетками здоровых доноров. Клетки острого миелогенного лейкоза KG-1a инкубировали с 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) и 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) одного из 10 отобранных тандемных диател и прошедших негативную селекцию Т-клеток здоровых доноров или прошедших позитивную селекцию Т-клеток здоровых доноров при клеточном соотношении Е:Т 1:1 или 3:1, как указано. Через 48 ч определяли количество клеток и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания DAPI. Результаты выражены в виде среднего значения $\pm$ SEM для процентного содержания мертвых клеток (верхние панели) и процента специфической цитотоксичности (нижние панели) по результатам 3 независимых экспериментов, выполненных в двоянных лунках;

на фиг. 5 - стратегия анализа. Графики светорассеяния и гистограммы, построенные по данным анализа одной аликвоты Т-клеток от здорового донора, 1 репрезентативной клеточной линии AML (HL-60) и образца первичного AML (AMP002), каждый из которых иллюстрирует стратегию для определения индуцированной тандемным диателом цитотоксичности. FSC, прямое светорассеяние; SSC, боковое светорассеяние;

на фиг. 6 - скрининговый анализ цитотоксичности в клеточных линиях CD33⁺ AML. Парентальные клетки HL-60 (A,B) и KG-1a (C,D) инкубировали с 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) и 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) одной из 22 молекул CD33/CD3-тандемных диател или несвязывающего контрольного тандемного диатела (00) и здоровых донорных Т-клеток при клеточном соотношении Е:Т 1:1 (A,C) или 5:1 (B,D), как указано. Через 48 ч определяли количество клеток и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания DAPI для количественного определения зависящей от лекарственного средства цитотоксичности. Результаты выражены в виде среднего значения $\pm$ SEM для процентного содержания клеток DAPI⁺ по результатам 3 независимых экспериментов, выполненных в двоянных лунках. Качественно схожие результаты получали, когда цитотоксичность была выражена в виде процента специфической цитотоксичности;

на фиг. 7 - отбор образцов первичного AML для исследования. Для анализа получали замороженные аликвоты из общих образцов первичного человеческого AML. Процентное содержание бластов AML после оттаивания определяли с помощью проточной цитометрии на основе свойств CD45/бокового светорассеяния. Жизнеспособность образцов определяли после оттаивания, а также через 48 ч в цитокин-содержащей жидкой культуре (без добавления молекул тандемных диател или Т-клеток от здоровых доноров) путем проточной цитометрии с использованием DAPI в качестве маркера живых/мертвых клеток. Результаты по жизнеспособности после оттаивания, а также через 48 ч показаны для всех образцов, которые содержали >58% бластов AML. Квадрат: образцы первичного AML, которые показали жизнеспособность >50% при оттаивании, а также >50% через 48 ч в цитокин-содержащей жидкой культуре, которые были включены в конечные анализы;

на фиг. 8 - индуцированная тандемным диателом цитотоксичность в образцах первичного AML. Образцы первичного AML инкубировали с 2,5 пМ (приблизительно 250 пг/мл), 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) и 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) одной из 9 молекул тандемных диател без добавления Т-

клеток от здорового донора (А) или с Т-клетками от здорового донора при клеточном соотношении Е:Т 1:3 (В) или 1:1 (С), как указано. Через 48 ч определяли количество клеток и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания DAPI для количественного определения зависимой от лекарственного средства цитотоксичности. Результаты выражены в виде среднего значения $\pm$ SEM для процента специфической цитотоксичности по результатам экспериментов, выполненных в двоянных лунках;

на фиг. 9А представлена последовательность внеклеточного домена человеческого CD33 (аминокислотные остатки (aa) 18 - 259) (SEQ ID NO: 93);

на фиг. 9В - полная последовательность tandemного диатела 1 (SEQ ID NO: 98);

на фиг. 9С - полную последовательность tandemного диатела 2 (SEQ ID NO: 99);

на фиг. 9D - полную последовательность tandemного диатела 3 (SEQ ID NO: 100);

на фиг. 9Е - полную последовательность tandemного диатела 4 (SEQ ID NO: 101);

на фиг. 9F - полную последовательность tandemного диатела 5 (SEQ ID NO: 102);

на фиг. 9G - полную последовательность tandemного диатела 6 (SEQ ID NO: 103);

на фиг. 9H - полную последовательность tandemного диатела 7 (SEQ ID NO: 104);

на фиг. 9I - полную последовательность tandemного диатела 8 (SEQ ID NO: 105);

на фиг. 9J - полную последовательность tandemного диатела 9 (SEQ ID NO: 106);

на фиг. 9K - полную последовательность tandemного диатела 10 (SEQ ID NO: 107);

на фиг. 9L - полную последовательность tandemного диатела 11 (SEQ ID NO: 108);

на фиг. 9M - полную последовательность tandemного диатела 12 (SEQ ID NO: 109);

на фиг. 9N - полную последовательность tandemного диатела 13 (SEQ ID NO: 110);

на фиг. 9O - полную последовательность tandemного диатела 14 (SEQ ID NO: 111);

на фиг. 9P - полную последовательность tandemного диатела 15 (SEQ ID NO: 112);

на фиг. 9Q - полную последовательность tandemного диатела 16 (SEQ ID NO: 113);

на фиг. 9R - полную последовательность tandemного диатела 17 (SEQ ID NO: 114);

на фиг. 9S - полную последовательность tandemного диатела 18 (SEQ ID NO: 115);

на фиг. 9T - полную последовательность tandemного диатела 19 (SEQ ID NO: 116);

на фиг. 9U - полную последовательность tandemного диатела 20 (SEQ ID NO: 117);

на фиг. 9V - полную последовательность tandemного диатела 21 (SEQ ID NO: 118);

на фиг. 9W - полную последовательность tandemного диатела 22 (SEQ ID NO: 119);

на фиг. 9X - полную последовательность tandemного диатела 23 (SEQ ID NO: 120); и

на фиг. 9Y - полную последовательность tandemного диатела 24 (SEQ ID NO: 121). Подчеркнутые последовательности представляют собой линкеры L1, L2 и L3;

на фиг. 10 показан эффект tandemных диател 16 и 12 на рост клеток HL-60 у мышей NOD/scid. Восемь экспериментальных групп иммунодефицитных мышей NOD/scid подвергали ксенотрансплантации путем подкожной инъекции суспензии 4×10^6 клеток HL-60 на день 0. Перед инъекцией клетки HL-60 смешивали с 3×10^6 очищенных Т-клеток от здоровых доноров. Все животные экспериментальных групп, подвергнутые трансплантации опухолевых клеток и Т-клеток, получали внутривенное болюсное введение на дни 0, 1, 2, 3 и 4 носителя (контролем) или tandemного диатела 16 или 12 в трех разных дозах, как указано (0,1, 1 и 10 мкг). Одна группа без обработки эффекторными клетками и носителем служила в качестве дополнительного негативного контроля;

на фиг. 11 - противоопухолевая активность tandemного диатела 16 в модели ксенотрансплантата AML. Мышей NOD/scid сублетально облучали (2 Гр) и подкожно инокулировали 4×10^6 клеток HL-60. На день 9 животные получали однократную болюсную инъекцию анти-asialo GM1 кроличьего антитела (Ab). Когда опухоли достигали объема 50-150 мм³ (среднее значение 73 ± 11 мм³) на день 10 животных распределяли на 3 лечебные группы. Группы 2 и 3 (n = 8) интраперитонеально инъецировали $1,5 \times 10^7$ размноженных и активированных человеческих Т-клеток. В период с 13 по 21 день (qdx9) животные получали tandemное диатело 16 (группа 3) или носитель в латеральную хвостовую вену (группа 1 и группа 2);

на фиг. 12 - относительное количество (А) и абсолютное количество (В) бластов человеческой AML в костном мозге (BM) и селезенке мышей NSG на день 38 после обработки 5 мкг (0,25 мг/кг) или 50 мкг (2,5 мг/кг) CD33/CD3-tandemного антитела 12 и 16;

на фиг. 13 - кинетика лизиса клеток-мишеней, опосредованного CD33/CD3-tandemным диателом 16. 1×10^4 меченных кальцеином клето-мишеней HL-60 инкубировали с первичными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 25:1 в присутствии серийных разведений tandemного диатела 16 или без антитела (w/o) в течение 30 мин, 1, 2, 3, 4 или 5 ч. В каждый момент времени флуоресцентный кальцеин, высвобождающийся из лизированных клеток-мишеней, использовали для расчета специфического лизиса. На график наносили средние значения и стандартное отклонение (SD), являющиеся результатом экспериментов, проводимых в трех повторах;

на фиг. 14 - кинетика значений EC_{50} и специфического лизиса для CD33/CD3-tandemного диатела 16. Значения EC_{50} (жирные точки) и опосредованного tandemным диателом 16 лизиса клеток-мишеней (незаштрихованные квадраты) определяли в анализах цитотоксичности с высвобождением кальцеина при

указанных значениях времени инкубации с помощью нелинейной регрессии/сигмоидальной кривой доза-ответ и наносили на график;

на фиг. 15 - цитотоксическая активность в образцах от пациента с впервые диагностированным, рецидивирующим и рефрактерным AML.

Подробное описание изобретения

В соответствии с первым аспектом в документе описаны связывающие белки, обладающие специфичностью в отношении, по меньшей мере, CD33, предпочтительно человеческого CD33. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающие белки обладают специфичностью в отношении CD33 человека и макака-крабоедов, то есть являются кросс-реактивными. В некоторых вариантах осуществления эти кросс-реактивные связывающие белки связываются с CD33 человека и макака-крабоедов со схожей аффинностью.

CD33 экспрессируется на миелоидных клетках, например, таких как бласты острого миелоидного лейкоза (AML). Для выделения доменов антитела, специфических в отношении CD33, такого как человеческий CD33, может быть проведен скрининг библиотек антител. Например, может быть проведен скрининг библиотек фагового дисплея IgM путем использования, например, гибридного рекомбинантного белка CD33-Fc, содержащего аминокислоты 1-243 внеклеточного домена человеческого CD33 (фиг. 9A, SEQ ID NO: 93).

В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок имеет по меньшей мере один участок связывания с CD33, содержащий вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. Вариабельный домен легкой цепи содержит CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, и вариабельный домен тяжелой цепи содержит CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления эти CDR легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) выбраны из человеческих последовательностей CDR, показанных в табл. 1 (SEQ ID NO: 21-41). В определенных случаях CDR1 легкой цепи выбран из SEQ ID NO: 21-27. В определенных случаях CDR2 легкой цепи выбран из SEQ ID NO: 28-34. В определенных случаях CDR3 легкой цепи выбран из SEQ ID NO: 35-41.

В некоторых вариантах осуществления эти CDR тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи) выбраны из человеческих последовательностей CDR, показанных в табл. 2 (SEQ ID NO: 42-63). В определенных случаях CDR1 тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 42-48. В определенных случаях CDR2 тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 49-55. В определенных случаях CDR3 тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 56-63.

В некоторых вариантах осуществления CDR легких и тяжелых цепей выбраны без окружающих каркасных последовательностей соответствующих вариабельных доменов, которые включают каркасные последовательности из других иммуноглобулинов или консенсусные каркасные области, необязательно, кроме того, являются мутированными и/или замененными на другие подходящие каркасные последовательности. Таким образом, в настоящем документе в некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-связывающий белок, содержащий вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 21; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 28 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 22; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 29 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 23; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 30 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 24; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 31 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 25; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 32 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 26; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 33 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 27; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 34 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 41.

Также, в настоящем документе в некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-связывающий белок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 42; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 49 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок

содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 44; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 51 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 45; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 52 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 46; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 53 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 47; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 54 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 48; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 55 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 63.

В других вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10, показанных в табл. 3. В других вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-20, показанных в табл. 4. В еще других вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10, показанных в табл. 3, и вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-20, показанных в табл. 4.

Термин "связывающий белок" относится к производному иммуноглобулина с антигенсвязывающими свойствами, то есть полипептидам иммуноглобулина или его фрагментам, которые содержат антигенсвязывающий участок. Связывающий белок содержит вариабельные домены антитела или его фрагментов. Каждый антигенсвязывающий домен образован вариабельным доменом тяжелой цепи (VH) антитела, то есть иммуноглобулина, и вариабельным доменом легкой цепи (VL) антитела, связанным с одним и тем же эпитопом, при этом вариабельный домен тяжелой цепи (VH) содержит три определяющих комплементарность области (CDR) тяжелой цепи: CDR1, CDR2 и CDR3; и вариабельная область легкой цепи (VL) содержит три определяющих комплементарность области (CDR) легкой цепи: CDR1, CDR2 и CDR3. В некоторых случаях связывающий белок в соответствии с некоторыми вариантами осуществления в настоящем документе не содержит константных доменов иммуноглобулина. В некоторых случаях вариабельные домены легких и тяжелых цепей, образующие антигенсвязывающий участок, ковалентно связаны друг с другом, например, посредством пептидного линкера, или, в других случаях, вариабельные домены легких и тяжелых цепей нековалентно связаны друг с другом с образованием антигенсвязывающего участка. Термин "связывающий белок" относится также к фрагментам антитела или производным антитела, включая, например, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечные Fv, tandemные одноцепочечные Fv ((scFv)₂), биспецифические Т-клеточные антитела (Bi-specific T-cell engagers, BiTE®), переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (dual affinity retargeting antibodies, DART™), диатело и tandemное диатело (TandAb®). Кроме того, в определенных случаях связывающий белок является мультивалентным, то есть имеет два, три или более участков связывания для CD33.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3
вариабельной области легкой цепи анти-CD33

CDR	Идентифи- катор последова- тельности	Последовательность CDR легкой цепи
CDR1	SEQ ID NO:21	GGNNIGSTTVH
	SEQ ID NO:22	SGSRSNIGSNTVN
	SEQ ID NO:23	SGSSSNIGSNTVN
	SEQ ID NO:24	TGSSSNIGAGYDVH
	SEQ ID NO:25	SGSSSNIGSNIVN
	SEQ ID NO:26	SGSSSNIGSNTVK
	SEQ ID NO:27	SGSSSNIGDNVVN
CDR2	SEQ ID NO:28	DDNERPS
	SEQ ID NO:29	GNNQRPS
	SEQ ID NO:30	SDNQRPS
	SEQ ID NO:31	GNSNRPS
	SEQ ID NO:32	SNNQRPS
	SEQ ID NO:33	SNNQRSS
	SEQ ID NO:34	STNKRPS
CDR3	SEQ ID NO:35	QVWDSGSDH
	SEQ ID NO:36	ATWDDSLIG
	SEQ ID NO:37	ATWDDSLNG
	SEQ ID NO:38	QSYDSSLSD
	SEQ ID NO:39	AAWDDSLKG
	SEQ ID NO:40	AAWDDSLNG
	SEQ ID NO:41	AAWDDSLSA

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3
вариабельной области тяжелой цепи анти-CD33

CDR	Идентифика тор последова тельности	Последовательность CDR тяжелой цепи
CDR1	SEQ ID NO:42	SNYGIH
	SEQ ID NO:43	TSYDIN
	SEQ ID NO:44	TSYMH
	SEQ ID NO:45	TSYWIG
	SEQ ID NO:46	SSYAIS
	SEQ ID NO:47	SSYGIS
	SEQ ID NO:48	DSYAIS
CDR2	SEQ ID NO:49	LISYDGNKKFYADSVKG
	SEQ ID NO:50	WMNPNSGNTGFAQKFQG
	SEQ ID NO:51	GIINPSGGSTSYAQKFQG
	SEQ ID NO:52	IIYPGDS DTRYSPSFQG
	SEQ ID NO:53	GIYPIFGSANYAQKFQG
	SEQ ID NO:54	GIPIFGSAHYAQKFQG
	SEQ ID NO:55	GIPIFGSAHYSQKFQG
CDR3	SEQ ID NO:56	DRLESAAFDY
	SEQ ID NO:57	DRANTDFSYGMDV
	SEQ ID NO:58	DRAVTDYYYGMDV
	SEQ ID NO:59	DRANTDYSFGMDV
	SEQ ID NO:60	DRANTDYSLGMDV
	SEQ ID NO:61	DVVPAAIDYYGMDV
	SEQ ID NO:62	HKRGSDAFDI
	SEQ ID NO:63	EYYYDSSEWAFDI

Таблица 3. Аминокислотные последовательности всех переменных доменов легкой цепи анти-CD33 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области легкой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

клон анти- CD33	Идентифика- тор последова- тельности	Последовательность переменного домена легкой цепи (VL)
01	SEQ ID NO:1	SYELTQPPSVSVAPGQTAMITC <u>GGNNIGSTTVH</u> WYQQKPGQAPVLVV Y <u>DDNERPS</u> GIPERFSGSNSGSTATLTINRVEAGDEADYYC <u>QVWDSGSD</u> <u>HVVFGGGTKLTVL</u>
02	SEQ ID NO:2	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>GNNQRPS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
03	SEQ ID NO:3	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>GNNQRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
04	SEQ ID NO:4	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>GNNQRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
05	SEQ ID NO:5	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>GNNQRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
06	SEQ ID NO:6	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGSSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>SDNQRPS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSDDEADYYC <u>ATWDDSLN</u> <u>GAVFGGGTKLTVL</u>
07	SEQ ID NO:7	QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCT <u>SGSSNIGAGYDVH</u> WYQQLPGTAPKL LIY <u>GNSNRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC <u>QSYDSSL</u> <u>SDVVFGGGTKLTVL</u>
08	SEQ ID NO:8	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGSSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>SNNQRPS</u> GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLKG</u> <u>YVFGGGTKLTVL</u>
09	SEQ ID NO:9	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGSSNIGSNTVK</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>SNNQRSS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLN</u> <u>GYVFGGGTKLTVL</u>
10	SEQ ID NO:10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS <u>SGSSNIGDNVNVN</u> WYQQLPGTAPKLLI Y <u>STNKRPS</u> GVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLS</u> <u>AYVFGGGTKLTVL</u>

Таблица 4. Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи анти-CD33 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области тяжелой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

Клон анти-CD33	Идентификатор последовательности	Последовательность варибельного домена тяжелой цепи (VH)
01	SEQ ID NO:11	QVQLQESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFSF <u>SNYGIHW</u> VRQAPGKGLEWVA <u>LISYDGNKKFYADSVKGR</u> FAISRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAK <u>DRLESAAFDY</u> WGQGLTVTVSS
02	SEQ ID NO:12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDFS</u> YGMDEVWGQGLTVTVSS
03	SEQ ID NO:13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRAVTDY</u> YGMDEVWGQGLTVTVSS
04	SEQ ID NO:14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDYS</u> FGMDEVWGQGLTVTVSS
05	SEQ ID NO:15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDYS</u> LGMDVWGQGLTVTVSS
06	SEQ ID NO:16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTF <u>TSYMH</u> WVRQAPGQGLEW <u>MGIINPSGGSTSYAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDVVPAAIDY</u> YGMDEVWGQGLTVTVSS
07	SEQ ID NO:17	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYF <u>TSYWIG</u> WVRQMPGKGLEWM <u>GHIYPGDS</u> TRYSPS <u>FOGQ</u> VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR <u>HKRGSDAFDI</u> WGQGLTVTVSS
08	SEQ ID NO:18	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTF <u>SSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GIYPIFGSANYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC <u>EYYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS
09	SEQ ID NO:19	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTF <u>SSYGIS</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GGIPIFGSAHYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EYYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS
10	SEQ ID NO:20	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTF <u>DSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GGIPIFGSAHYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>YYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок, обуславливающий специфичность к CD33, выбран из одной из следующих комбинаций варибельного домена тяжелой цепи и варибельного домена легкой цепи, образующих участок связывания с человеческим CD33, как показано в табл. 3 и табл. 4. Неограничивающие примеры включают: (i) SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11; (ii) SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12; (iii) SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 13; (iv) SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 14; (v) SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15; (vi) SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16; (vii) SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17; (viii) SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18; (ix) SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19; и (x) SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 20.

Также, в настоящем документе описаны связывающие белки, которые не только обладают специфичностью в отношении CD33, но которые также имеют по меньшей мере один дополнительный функциональный домен. В следующем варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный функциональный домен представляет собой эффекторный домен. "Эффекторный домен" содержит участок связывания антитела, специфического в отношении эффекторной клетки, который может стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена, высвобождение цитокина. Такие эффекторные клетки представляют собой, например, но без ограничения, Т-клетки. В частности, эффекторный домен содержит по меньшей мере один варибельный домен тяжелой цепи антитела и по меньшей мере один варибельный домен легкой цепи антитела, образующие антигенсвязывающий участок для антигена на Т-клетках, таких как, например, CD3 человека.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок является мультифункциональным. Используемый здесь термин "мультифункциональный" означает, что связывающий белок проявляет две или более различных биологических функций. Например, различные биологические функции представляют собой различные специфичности в отношении различных антигенов. В определенных случаях мультифункциональный CD33-связывающий белок является мультиспецифическим, то есть обладает специфичностью связывания с CD33 и одним или несколькими дополнительными антигенами. В определенных случаях связывающий белок является биспецифическим со специфичностями в отношении CD33 и CD3. Такие биспецифические связывающие белки включают, например, биспецифические моноклональные антитела классов IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, диатела, одноцепочечные диатела (scDb), tandemный одноцепочечный Fv (scFv)₂, например биспецифические Т-клеточные антитела (Bi-specific T-cell engagers, BiTE®), переориентирующие антитела с двойной аффинностью (dual affinity retargeting antibodies, DART™), tandemные диатела (TandAb®) и Flexibodies.

В определенных вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и

CD3-связывающего белка обладает специфичностью в отношении человеческого CD3 и, в некоторых случаях, CD3 макак-крабоедов. Примерами такого участка связывания являются полипептиды, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 VH-домена из последовательностей, показанных в табл. 5 (SEQ ID NO: 64-67), и CDR1, CDR2 и CDR3 VL-домена из последовательности, показанной в табл. 6 (SEQ ID NO: 68-71). В определенных случаях CD3-связывающий участок представляет собой комбинацию варибельного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 64 и варибельного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 68. В определенных случаях участок связывания с CD3 является комбинацией варибельного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 65 и варибельного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 69. В определенных случаях участок связывания с CD3 является комбинацией варибельного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 66 и варибельного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 70. В определенных случаях участок связывания с CD3 является комбинацией варибельного домена тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 67 и варибельного домена легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 71.

Таблица 5. Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи анти-CD3 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельных доменов тяжелой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

анти-CD3	Последовательность VH-домена
SEQ ID NO:64 CD3-01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWV <u>GRIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKD</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLK</u> TEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO:65 CD3-02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWV <u>GRIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKD</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLK</u> TEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO:66 CD3-03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWV <u>GRIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKD</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLK</u> TEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO:67 CD3-04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWV <u>GRIRSKYNNY</u> <u>ATYYADSVKD</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLK</u> TEDTAVYYCAR <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS

Таблица 6. Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи анти-CD3 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельных доменов легкой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

анти-CD3	Последовательность VL-домена
SEQ ID NO:68 CD3-01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT <u>CRSSTGAVTT</u> SNYANWVQKPGKAPKALIG <u>GTNKR</u> AP GVPSRFGSLIGDKATLTIS <u>SLQ</u> PEDFATYYC <u>ALWYSN</u> LWVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:69 CD3-02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT <u>CRSSTGAVTT</u> SNYANWVQKPGKAPKGLIG <u>GTNKR</u> AP GVPARFSGSGSGTDFLTIS <u>SLQ</u> PEDFATYYC <u>ALWYSN</u> LWVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:70 CD3-03	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT <u>CRSSTGAVTT</u> SNYANWVQKPGKAPKGLIG <u>GTNKR</u> AP GVPSRFGSLIGDKATLTIS <u>SLQ</u> PEDFATYYC <u>ALWYSN</u> LWVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:71 CD3-04	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT <u>CRSSTGAVTT</u> SNYANWVQKPGKAPKGLIG <u>GTNKR</u> AP GVPSRFGSLIGTDFLTIS <u>SLQ</u> PEDFATYYC <u>ALWYSN</u> LWVFGQGTKVEIK

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-последовательность STYAMN (SEQ ID NO: 72). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CD112-последовательность RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3-последовательность HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR3-последовательность HGNFGNSYVSYFAY (SEQ ID NO: 75). В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок связывающий участок имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, CDR2 и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 72-74, соответственно. В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, CDR2 и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 72, 73 и 75, соответственно.

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из NTYAMN (SEQ ID NO: 76), NTYAMH (SEQ ID NO: 77) и NKYAMN (SEQ ID NO: 78). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из RIRNKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID

NO: 79), RIRNKYNNYATEYADSVKD (SEQ ID NO: 80), RIRSKYNNYATEYAASVKD (SEQ ID NO: 81), RIRNKYNNYATEYAASVKD (SEQ ID NO: 82), RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 83) и RIRSKYNNYATEYADSVKS (SEQ ID NO: 84). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 85), HGNFGNTYVSWFAY (SEQ ID NO: 86), HGNFGCSYVSWFAY (SEQ ID NO: 87), HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO: 88) и HGNFGNSYVSFFAY (SEQ ID NO: 89).

В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, CDR2 и CDR3, представленную в SEQ ID NO: 76, 73 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 79 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 80 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 81 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 82 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 83 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 72, 83 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 72, 83 и 85 соответственно, SEQ ID NO: 76, 83 и 86 соответственно, SEQ ID NO: 77, 83 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 72, 83 и 87 соответственно, SEQ ID NO: 78, 73 и 88 соответственно или SEQ ID NO: 78, 84 и 89 соответственно.

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-последовательность RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR2-последовательность GTNKRAP (SEQ ID NO: 91). В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR3-последовательность ALWYSNL (SEQ ID NO: 92). В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет вариабельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1, CD2 и CD3, представленную в SEQ ID NO: 90-92 соответственно.

В определенных случаях CD3-связывающий участок обладает высокой аффинностью по отношению к CD3. Альтернативно, в других случаях CDR1, CDR2, CDR3 из домена тяжелой цепи, а также домена легкой цепи или, необязательно, вариабельных доменов легкой цепи и вариабельных доменов тяжелой цепи получены из других антител к CD3, таких как, например, UCHT1, муромонаб-CD3 (OKT3), отеликсизумаб (TRX4), теллизумаб (MGA031), визилизумаб (Nuvion) и т.п.

В другом аспекте в настоящем документе описаны CD33-связывающие белки, а также биспецифические CD33- и CD3-связывающие белки, которые являются гуманизированными или полностью человеческими, то есть имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический CD33- и CD3-связывающий белок имеет одну из следующих комбинаций, обеспечивающих специфичность в отношении CD33 и CD3 с помощью вариабельных доменов легких и тяжелых цепей для CD33 и CD3, включая, но без ограничения: (i) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69, (ii) SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69, (iii) SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69, (iv) SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69, (v) SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68, (vi) SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68, (vii) SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70, (viii) SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70, (ix) SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70, и (x) SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68, (xi) SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71, (xii) SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68, (xiii) SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68, (xiv) SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68, (xv) SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68, (xvi) SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71, (xvii) SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68, (xviii) SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; (xix) SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71, и (xx) SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

Консервативные варианты CDR-последовательностей и доменов тяжелых и легких цепей.

В альтернативных вариантах осуществления домены тяжелых и легких цепей включают иммунологически активные гомологи или варианты последовательностей CDR, описанных здесь. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления последовательность CDR в домене тяжелой или легкой цепи, которая связывается с CD33 или CD3, является схожей, но не идентичной, с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21-63 или 72-92. В определенных случаях вариантная последовательность CDR обладает 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21-63 или 72-90, и которая является иммунологически активной.

В других случаях вариантная последовательность CDR включает 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены включают аминокислотные замены, которые заменяют заданную аминокислоту на другую аминокислоту со схожими свойствами и, кроме того, включают, из числа алифатических аминокислот, замену аланина, валина, лейцина и изолейцина; замену гидроксильных остатков серина и треонина, замену кислотных остатков аспартата и глутамата, замещение между амидными остатками аспарагина и глутамина, замену основных остатков лизина и аргинина, и замены из числа ароматических остатков фенилаланина и тирозина.

В еще других случаях вариантная последовательность CDR включает замены, которые усиливают свойства CDR, такие как повышение стабильности, устойчивости к протеазам и/или аффинностей связывания с CD33 или CD3.

В других случаях вариантная последовательность CDR модифицирована для замены некритических остатков или остатков в некритических областях. Аминокислоты, которые являются некритическими, могут быть идентифицированы с помощью известных способов, таких как "созревание аффинности",

"прогулка по CDR" (CDR walking), сайт-направленный мутагенез, кристаллизация, ядерный магнитный резонанс, фотоаффинное мечение или аланин-сканирующий мутагенез.

В других альтернативных вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающие белки содержат домены тяжелых и легких цепей, которые являются иммунологически активными гомологами или вариантами последовательностей доменов тяжелых и легких цепей, представленных здесь. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок содержит последовательность домена тяжелой или легкой цепи, которая является сходной, но не идентичной аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1-20 или 64-71. В определенных случаях вариантная последовательность тяжелой или легкой цепи обладает 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1-20 или 64-71, и которая является иммунологически активной.

В других случаях вариантная последовательность домена тяжелой или легкой цепи включает 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены включают аминокислотные замены, которые заменяют заданную аминокислоту другой аминокислотой со схожими свойствами и, кроме того, включают, из числа алифатических аминокислот, замену аланина, валина, лейцина и изолейцина; замену гидроксильных остатков серина и треонина, замену кислотных остатков аспартата и глутамина, замещение между амидными остатками аспарагина и глутамина, замену основных остатков лизина и аргинина, и замены из числа ароматических остатков фенилаланина и тирозина.

В еще других случаях вариантная последовательность домена легкой или тяжелой цепи включает замены, которые усиливают свойства CDR, такие как повышение стабильности, устойчивости к протеазам и/или аффинностей связывания с CD33 или CD3.

В других случаях вариантная последовательность домена легкой цепи модифицирована для изменения некритических остатков или остатков в некритических областях. Аминокислоты, которые являются некритическими, могут быть идентифицированы с помощью известных способов, таких как "созревание аффинности", "прогулка по CDR" (CDR walking), сайт-направленный мутагенез, кристаллизация, ядерный магнитный резонанс, фотоаффинное мечение или аланин-сканирующий мутагенез.

CD33- и CD3-биспецифические и тандемные диатела.

В другом аспекте CD33-связывающий белок или биспецифический CD33- и CD3-связывающий белок представляет собой димер, то есть содержит два полипептида с антигенсвязывающими участками для CD33 и CD3.

Также, в другом аспекте в документе предлагается димерный и биспецифический CD33- и CD3-связывающий белок в формате тандемного диатела (TandAb®). Такие тандемные диатела сконструированы путем связывания четырех переменных связывающих доменов антитела (двух переменных доменов тяжелой цепи (VH) и двух переменных доменов легкой цепи (VL)) в одну генную конструкцию (фиг. 1), обеспечивая возможность гомодимеризации. В таких тандемных диателах линкер имеет такую длину, которая предотвращает внутримолекулярное спаривание переменных доменов, так чтобы молекула не могла обратно сворачиваться с образованием одноцепочечного диатела, а наоборот вынуждена была спариваться с комплементарными доменами другой цепи. Домены также организованы таким образом, что соответствующие домены VH и VL спариваются во время этой димеризации. После экспрессии из одной генной конструкции две идентичные полипептидные цепи сворачиваются по типу "голова к хвосту", образуя функциональный нековалентный гомодимер размером приблизительно 105 кДа (фиг. 1). Несмотря на отсутствие межмолекулярных ковалентных связей гомодимер является высокостабильным после формирования, остается интактным и не превращается обратно в мономерную форму.

Тандемные диатела обладают рядом свойств, которые обеспечивают преимущества перед традиционными моноклональными антителами и другими биспецифическими молекулами меньшего размера. Тандемные диатела содержат только переменные домены антитела и, следовательно, предполагается отсутствие побочных эффектов или неспецифических взаимодействий, которые могут быть связаны с Fc-фрагментом. Например, Fc-рецепторы, которые могут связываться с Fc-доменами, обнаружены на многочисленных типах клеток, таких как белые клетки крови (например, базофилы, В-клетки, эозинофилы, естественные клетки-киллеры, нейтрофилы и т.п.) или клетки Купфера. Так как тандемные диатела обеспечивают возможность бивалентного связывания с каждым из CD33 и CD3, авидность совпадает с авидностью IgG. Размер тандемного диатела при приблизительно 105 кДа меньше, чем размер IgG, что может обеспечить возможность усиленного проникновения внутрь опухоли. Однако этот размер значительно больше почечного порога выведения для клиренса при "первом прохождении", обеспечивая фармакокинетическое преимущество по сравнению с биспецифическими форматами меньшего размера на основе антитело-связывающих доменов или каркасов, не принадлежащих антителу. Кроме того, тандемные диатела являются предпочтительными по сравнению с другими биспецифическими связывающими белками, такими как молекулы BiTE или DART, исходя из этих фармакокинетических и авидных свойств, что приводит к более длинным собственным периодам полувыведения и быстрой цитотоксичности. Тандемные диатела хорошо экспрессируются в клетках-хозяевах, например клетках CHO млекопитающих. Предполагается, что надежный вышестоящий и нижестоящий производственный процесс является доступным для тандемных диател.

CD33- и CD3-биспецифические тандемные диатела, описанные здесь, разработаны таким образом, чтобы обеспечить возможность специфического нацеливания на CD33⁺-опухолевые клетки путем рекрутинга цитотоксических Т-клеток. Это улучшает ADCC (антителозависимую клеточную цитотоксичность) по сравнению с полноразмерными антителами, направленными на единственный антиген и не способными к прямому рекрутингу цитотоксических Т-клеток. В противоположность этому, путем захвата молекул CD3, экспрессирующихся специфически на этих клетках, тандемное диатело может сшивать цитотоксические Т-клетки с CD33⁺-опухолевыми клетками высокоспецифическим образом, тем самым значительно увеличивая цитотоксический потенциал таких молекул. Этот механизм показан на фиг. 2. Тандемные диатела проявляют сильную, специфическую и эффективную ADCC. Сообщается, что Т-клетки могут участвовать в контроле роста опухоли. Например, было показано, что присутствие цитотоксических Т-клеток в колоректальных опухолях, а также лимфатических узлах от пациентов с неходжкинской лимфомой (NHL) коррелирует с лучшим клиническим результатом. Кроме того, потенциал терапий, разработанных для индукции Т-клеточных ответов, был продемонстрирован для вакцин против меланомы, а также антитела, направленного против CTLA-4, негативного регулятора Т-клеточной активации. Тандемные диатела, описанные здесь, захватывают цитотоксические Т-клетки посредством связывания с экспрессирующимся на поверхности CD3, который образует часть Т-клеточного рецептора. Одновременное связывание этого тандемного диатела с CD3 и CD33, экспрессирующимися на поверхности конкретных опухолевых клеток, вызывает активацию Т-клеток и опосредует последующий лизис опухолевой клетки (фиг. 2).

Таким образом, в другом аспекте предлагается мультиспецифическое тандемное диатело. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое тандемное диатело обладает специфичностями в отношении двух, трех или более различных эпитопов, при этом два или более эпитопов могут быть одного и того же антигена-мишени или различных антигенов-мишеней. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое тандемное диатело является биспецифическим и четырехвалентным, то есть содержит четыре антигенсвязывающих участка. Такое биспецифическое тандемное диатело связывается с помощью по меньшей мере одного антигенсвязывающего участка с человеческим CD3 и человеческим CD33, при этом в определенных случаях тандемное диатело связывается с помощью двух антигенсвязывающих участков с человеческим CD3 и с помощью двух других антигенсвязывающих участков с человеческим CD33, то есть тандемное диатело связывается бивалентно с каждым антигеном.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антигенсвязывающее тандемное диатело является специфическим в отношении человеческого CD33 и человеческого CD3, при этом указанное тандемное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре последовательно связанных друг с другом переменных домена цепи, при этом каждый полипептид содержит:

- (i) переменный домен тяжелой цепи (VH), специфический в отношении человеческого CD33;
- (ii) переменный домен легкой цепи (VL), специфический в отношении человеческого CD33;
- (iii) VH-домен, специфический в отношении CD3, и
- (iv) VL-домен, специфический в отношении CD3.

В конкретных вариантах осуществления биспецифическое тандемное диатело специфически связывается с эпитопом человеческого CD33, который находится в пределах ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 SEQ ID NO: 93) человеческого CD33. В конкретных случаях такое тандемное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре последовательно связанных друг с другом переменных домена цепи, при этом каждый полипептид содержит:

- (i) переменный домен тяжелой цепи, специфический в отношении эпитопа человеческого CD33, который находится в пределах ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 SEQ ID NO: 93) человеческого CD33;
- (ii) переменный домен легкой цепи, специфический в отношении эпитопа человеческого CD33, который находится в пределах ₆₂DQEVQEETQ₇₀ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 SEQ ID NO: 93) человеческого CD33;
- (iii) переменный домен тяжелой цепи, специфический в отношении человеческого CD3, и
- (iv) переменный домен легкой цепи, специфический в отношении человеческого CD3.

В других вариантах осуществления в настоящем документе описаны CD33/CD3-тандемные диатела, которые обладают аффинностью в отношении CD33 на CD33⁺-клетках с константой диссоциации K_D, равной 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. CD33⁺-клетки могут быть выбраны из опухолевых клеток, таких как, например, HL-60 или KG-1.

В других вариантах осуществления описанное здесь CD33/CD3-тандемное диатело связывается с CD3 и в определенных случаях эpsilon-цепью CD3 на CD3⁺-клетках, в частности, Т-клетках, с константой диссоциации K_D, равной 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, или 2 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид биспецифического тандемного диатела содержит одну из следующих комбинаций четырех переменных доменов цепи: (i) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69, (ii) SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69, (iii) SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69, (iv) SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69, (v) SEQ

ID NO: 1, 11, 64 и 68, (vi) SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68, (vii) SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70, (viii) SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70, (ix) SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70, и (x) SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68, (xi) SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71, (xii) SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68, (xiii) SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68, (xiv) SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68, (xv) SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68, (xvi) SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71, (xvii) SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68, (xviii) SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; (xix) SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71, и (xx) SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

Используемый здесь термин "димер" относится к комплексу из двух полипептидов. В определенных вариантах осуществления два полипептида являются нековалентно связанными друг с другом, в частности, при условии, что не существует ковалентной связи между двумя полипептидами. В определенных случаях два полипептида связаны ковалентными связями, такими как дисульфидные связи, которые образуются для содействия стабилизации димера. В определенных вариантах осуществления димер является гомодимерным, то есть содержит два идентичных полипептида. Термин "полипептид" относится к полимеру из аминокислотных остатков, связанных амидными связями. В определенных случаях полипептид представляет собой одноцепочечный гибридный белок, который является неразветвленным. В полипептиде вариабельные домены антитела последовательно связаны друг с другом. В других случаях полипептид может иметь последовательно расположенные аминокислотные остатки дополнительно к N-концевым и/или C-концевым остаткам вариабельного домена. Например, такие последовательно расположенные аминокислотные остатки могут содержать Tag-последовательность, в некоторых случаях на C-конце, что, может оказаться полезным для очистки и детекции полипептида.

В одном аспекте каждый полипептид биспецифического тандемного диатела содержит четыре вариабельных домена, вариабельную легкую цепь (VL) и вариабельную тяжелую цепь (VH) CD3-связывающего белка, а также вариабельную легкую цепь (VL) и вариабельную тяжелую цепь (VH) CD33-связывающего белка. В определенных вариантах осуществления четыре вариабельных домена связаны посредством пептидных линкеров L1, L2 и L3, и в некоторых случаях организованы в направлении от N-конца к C-концу следующим образом:

порядок доменов:

- (1) VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); или
- (2) VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3); или
- (3) VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); или
- (4) VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).

Согласно опубликованным исследованиям длина линкеров оказывает влияние на гибкость антиген-связывающего тандемного диатела. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления длина пептидных линкеров L1, L2 и L3 является такой, что домены одного полипептида могут образовывать межмолекулярные связи с доменами другого полипептида с образованием димерного антигенсвязывающего тандемного диатела. В определенных вариантах осуществления такие линкеры являются "короткими", то есть состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в определенных случаях линкеры состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков. В случае 0 аминокислотных остатков линкер представляет собой пептидную связь. Такие короткие линкеры способствуют межмолекулярной димеризации двух полипептидов путем связывания и образования правильных антигенсвязывающих участков между вариабельными доменами легкой цепи антитела и вариабельными доменами тяжелой цепи антитела различных полипептидов. Как правило, укорачивание линкера до около 12 или менее аминокислотных остатков предотвращает межмолекулярное взаимодействие соседних доменов одной и той же полипептидной цепи друг с другом. В некоторых вариантах осуществления эти линкеры состоят из около 3-10, например 4, 5 или 6 последовательно расположенных аминокислотных остатков.

Что касается аминокислотного состава линкеров, то выбирают пептиды, которые не препятствуют димеризации двух полипептидов. Например, линкеры, содержащие остатки глицина и серина, обычно обеспечивают устойчивость к действию протеаз. Аминокислотная последовательность линкеров может быть оптимизирована, например, методами фагового дисплея для улучшения связывания антигена и выхода антигенсвязывающего полипептидного димера. В некоторых вариантах осуществления примерами пептидных линкеров, подходящих для тандемного диатела, являются GSGSGS (SEQ ID NO: 95), GSGS (SEQ ID NO: 96) или GSGSG (SEQ ID NO: 97).

Неограничивающими примерами тандемных диател, описанных здесь, являются тандемные диатела, имеющие VL- и VH-домен анти-CD33, VL- и VH-домен анти-CD3, порядок доменов и линкер согласно табл. 7.

Таблица 7. Иллюстративные CD33/CD3-тандемные диатела (TandAbs)

Танд. диатело	Домен анти-CD33		Домен анти-CD3		Порядок доменов	Линкер	
	VL	VH	VH	VL		L1/L3	L2
01	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
02	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
03	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
04	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
05	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSGG (SEQ ID NO: 97)
06	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSGG (SEQ ID NO: 97)
07	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)
08	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	3	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)
09	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:70	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
10	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:70	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
11	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:70	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
12	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
13	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:71	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
14	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
15	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
16	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
17	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
18	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	2	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
19	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
20	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:71	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
21	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)

						NO: 95)	
22	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
23	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:71	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)
24	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS (SEQ ID NO: 95)	GGSG (SEQ ID NO: 96)

В некоторых вариантах осуществления тандемное диатело представляет собой тандемное диатело 01 (SEQ ID NO: 98), 02 (SEQ ID NO: 99), 03 (SEQ ID NO: 100), 04 (SEQ ID NO: 101), 05 (SEQ ID NO: 102), 06 (SEQ ID NO: 103), 07 (SEQ ID NO: 104), 08 (SEQ ID NO: 105), 09 (SEQ ID NO: 106), 10 (SEQ ID NO: 107), 11 (SEQ ID NO: 108), 12 (SEQ ID NO: 109), 13 (SEQ ID NO: 110), 14 (SEQ ID NO: 111), 15 (SEQ ID NO: 112), 16 (SEQ ID NO: 113), 17 (SEQ ID NO: 114), 18 (SEQ ID NO: 115), 19 (SEQ ID NO: 116), 20 (SEQ ID NO: 117), 21 (SEQ ID NO: 118), 22 (SEQ ID NO: 119), 23 (SEQ ID NO: 120) или 24 (SEQ ID NO: 121), как показано на фиг. 9B-9Y.

В некоторых вариантах осуществления описанный здесь CD33-связывающий белок и биспецифический CD33/CD3-связывающий белок (например, биспецифическое CD33/CD3-тандемное диатело) получают путем экспрессии полинуклеотидов, кодирующих полипептид тандемного диатела, который связан с другим идентичным полипептидом с образованием антигенсвязывающего тандемного диатела. Таким образом, другим аспектом является полинуклеотид, например ДНК или РНК, кодирующий полипептид антигенсвязывающего тандемного диатела, как описано здесь.

Полинуклеотид сконструирован с помощью известных способов, например, путем объединения генов, кодирующих по меньшей мере четыре вариабельных домена антителя, разделенных пептидными линкерами или, в других вариантах осуществления, напрямую связанных пептидной связью, в единую генетическую конструкцию, оперативно связанную с подходящим промотором и, необязательно, подходящим терминатором транскрипции, и ее экспрессии в бактерии или другой подходящей экспрессионной системе, такой как, например, клетки CHO. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина можно использовать любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцируемые промоторы. Промотор выбирают таким образом, чтобы он управлял экспрессией полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид вставляется в вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, который представляет следующий вариант осуществления. Этот рекомбинантный вектор может быть сконструирован в соответствии с известными способами.

Разнообразные экспрессионные системы вектор/хозяин могут быть использованы для включения и экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного антигенсвязывающего тандемного диатела. Примерами экспрессионных векторов для экспрессии в *E.coli* являются pSKK (Le Gall et al., J Immunol Methods. (2004) 285(1):111-27) или pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающего.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, получают путем введения вектора, кодирующего полипептид, описанный выше, в клетку-хозяина и культивирования указанной клетки-хозяина в условиях, при которых полипептидные цепи экспрессируются, могут быть выделены и необязательно в последующем очищены.

В других аспектах CD33-связывающий белок или биспецифический CD33/CD3-связывающий белок (например, биспецифическое CD33/CD3-тандемное диатело), описанный здесь, имеет модификацию. Типичные модификации включают, но без ограничения, ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение группы гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, конъюгирование лекарственного средства, поперечное сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, γ -карбоксилирование, гликозилирование, образование якоря GPI, гидроксилирование, иодинирование, метилирование, миристоилирование, оксидирование, протеолитическую обработку, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатацию, опосредуемое транспортной РНК добавление к белкам аминокислот, такое как аргинилирование, и убиквитинирование. В других вариантах осуществления CD33-связывающий белок или биспецифический CD33/CD3-связывающий белок модифицирован дополнительными аминокислотами, такими как лидерная или секреторная последовательность, или последовательность для очистки полипептида.

В других аспектах в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие CD33-связывающий белок, антигенсвязывающее тандемное диатело, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид антигенсвязывающего тандемного диатела, или клетку-хозяина, транс-

формированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но без ограничения, любой носитель, который не препятствует эффективности биологической активности ингредиентов и является нетоксичным для пациента, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают фосфатно-буферные солевые растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы и т.п. Такие носители могут быть составлены общепринятыми способами и могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консервант, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть обеспечено путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов.

Биспецифические CD33/CD3-связывающие белки, обладающие высокой аффинностью связывания с CD33 и CD3, являются высокоактивными в большом количестве образцов первичного AML, поэтому можно предположить, что эти молекулы могут проявлять активность против человеческого AML по всему цитогенетическому/молекулярному спектру заболеваний, даже в случаях минимальной экспрессии CD33. Следует отметить, что специфическая к лекарственному средству цитотоксичность также наблюдается в присутствии остаточных аутологичных Т-клеток и значительно возрастает при добавлении контролируемых количеств Т-клеток от здоровых доноров (см. пример 6).

Биспецифические CD33/CD3-связывающие белки, в частности тандемные диатела, могут индуцировать сильный цитолитический эффект CD33⁺-лейкозных клеток *in vitro*. Данные указывают на то, что высокоаффинное связывание с CD33 и CD3 максимально увеличивает индуцированную биспецифическим белком активацию Т-клеток и эффективность против AML. Высокоаффинные CD33/CD3-направляемые биспецифические связывающие белки, такие как тандемные диатела, описанные здесь, проявляют цитолитическую активность в первичном AML *in vitro*. Таким образом, эти биспецифические связывающие белки и тандемные диатела являются подходящими для терапевтического подхода к лечению острого миелоидного лейкоза (AML) или других гематологических злокачественных опухолей, например, миелоидного диспластического синдрома (MDS) или миелопролиферативного заболевания (MPD).

Таким образом, в настоящем документе предлагаются способы, в которых антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в эффективной дозе субъекту, например, пациенту, для лечения CD33⁺-рака (например, острого миелоидного лейкоза (AML)), заболевания или состояния. CD33⁺-рак включает, но без ограничения, острый лейкоз, такой как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), включая лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников, миелоидную саркому, множественную миелому, острую лимфому, такую как острая лимфобластная лимфома, хронический миеломоноцитарный лейкоз и т.п. CD33⁺-заболевания и состояния включают иммуносупрессивные состояния или среды, обусловленные супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC) в определенных типах рака и хронического воспаления.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения острого миелоидного лейкоза (AML). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения подтипа острого миелоидного лейкоза.

Франко-американо-британская система классификации подразделяет AML на восемь подтипов: AML-M0 (с минимальной дифференцировкой), AML-M1 (без клеточного созревания), AML-M2 (с созреванием клеток гранулоцитарного ряда), AML-M3 (промиелоцитарный или острый промиелоцитарный лейкоз), AML-4 (острый миеломоноцитарный лейкоз), AML-M5 (острый монобластный или моноцитарный лейкоз), AML-M6 (острый эритроидный лейкоз) и AML-M7 (острый мегакариобластный лейкоз). В определенных случаях антиген-связывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7.

Система классификации AML согласно Всемирной организации здравоохранения (WHO) подразделяет AML на следующие подтипы: AML с рецидивирующими генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; миелоидные новообразования, связанные с терапией; миелоидная саркома, миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна, новообразование из бластных плазматитоидных дендритных клеток; и AML, не классифицируемый другим образом. В других определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения AML с рецидивирующими генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; миелоидных новообразований, связанных с терапией; миелоидной саркомы; миелоидных пролифераций, связанных с синдромом Дауна; новообразования из бластных плазматитоидных дендритных клеток; и AML, не классифицируемого другим образом.

В некоторых других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения впервые диагностированного, рецидивирующего или рефрактерного AML.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения предлейкозных нарушений крови, таких как миелоидный диспластический синдром (MDS) или миелопролиферативное заболевание (MPD). В определенных случаях антигенсвязывающее

танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения MDS. В определенных случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения MPD.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения множественной миеломы. В других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для ингибирования или уничтожения супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) высоко экспрессируют CD33 в определенных изолированных тканях, пораженных заболеванием, и обладают высокими иммуносупрессорными активностями. В определенных типах рака у человека (CD33⁺, а также не-CD33⁺), MDSC пролиферируют и активируются для подавления опухоль-специфических CD4⁺-Т-клеточных ответов и индуцируют Treg-клетки, позволяя опухоли или раку стремительно развиваться в микроокружении. Согласно имеющимся данным при хроническом воспалении MDSC-клетки распространяются и обнаруживаются в участках воспаления для подавления иммунной функции Т-клеток. В других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения состояния, связанного с MDSC-клетками. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения иммуносупрессии. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения воспаления, подавленного MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения пониженного иммунного ответа, вызванного MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения ангиогенеза, инвазии опухоли или метастазов рака, стимулированных MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят для лечения рака или опухоли, которая является усиленной, расширенной, отягощенной или увеличенной под действием MDSC-клеток.

Антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, предусматривается для применения в качестве лекарственного средства. Введение достигается различными путями, например путем внутривенного, интраперитонеального, подкожного, внутримышечного, местного или интрадермального введения. В некоторых вариантах осуществления способ введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Режим дозирования будет определяться лечащим врачом и другими клиническими факторами. Дозы для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, подлежащее введению, времени и способа введения, вида терапии, общего состояния здоровья и других вводимых параллельно лекарственных средств. Используемая здесь "эффективная доза" относится к количеству активного ингредиента, которое является достаточным для воздействия на течение и тяжесть заболевания, вызывая сокращение или ремиссию такой патологии. "Эффективная доза", подходящая для лечения и/или предупреждения AML, может быть определена с использованием известных способов.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации со стандартной терапией для CD33⁺-типов рака, заболеваний или состояний. Стандартные терапии включают химиотерапии, иммунотерапии, гормональные терапии, облучение, хирургию, генные терапии и т.п. В определенных случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации со стандартной терапией AML. В определенных случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с цитарабином, азациитидином, децитабином, антрациклином (например, даунорубицин, идарубицин, доксорубицин и т.п.), амсакрином, флударабином, клофарабином, кладрибином, неларабином, метотрексатом, бортезомибом, карфилзомибом, мелфаланом, ибрутинибом, талидомидом, леналидомидом, помалидомидом, апремиластом или эписподофиллотоксином (например, этопозид, тенипозид и т.п.), антраценедином (например, митоксантрон, пиксантрон, лозоксантрон, пироксантрон, аметантрон и т.п.), агентом анти-CD20 (например, ритуксимаб, окрелизумаб, офатумумаб) или их комбинацией. В определенных случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с цитарабином (ара-С). В определенных случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с азациитидином. В определенных случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с децитабином. В других случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с антрациклином (например, даунорубицин, идарубицин, доксорубицин и т.п.). В других случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с ингибиторами контрольных точек (например, ингибитор PD-1, ингибитор CTLA-4 и т.п.). В еще других случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с эписподофиллотоксином (например, этопозид, тенипозид и т.п.). В других случаях антигенсвязывающее танDEMное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с антраценедином (например, митоксантрон, пиксантрон, лозоксантрон, пироксантрон, аметантрон и т.п.).

Примеры, представленные ниже, дополнительно иллюстрируют описанные варианты осуществления без ограничения объема изобретения.

Пример 1.

Клонирование экспрессионных ДНК-конструкций, кодирующих одноцепочечные Fv антитела.

Для бактериальной экспрессии анти-CD33 одноцепочечных Fv (scFv) антител в *E.coli* кодирующие последовательности ДНК всех молекул клонировали в бактериальный экспрессионный вектор. Разрабатывали экспрессионные конструкции, все из которых содержали кодирующие последовательности для N-концевого сигнального пептида и C-концевой гексагистидиновой (6×His)-метки (SEQ ID NO: 122) для содействия секреции антитела в периплазму и очистке соответственно. Аминокислотные последовательности VL- и VH-доменов из всех анти-CD33 scFv клонов показаны в табл. 3 и 4.

Экспрессия рекомбинантных анти-CD33 scFv антител в *E.coli*.

Рекомбинантные scFv антитела экспрессировали в виде растворимых секретируемых белков в периплазме *E.coli*. На первой стадии среду для малых культур, дополненную ампициллином, инокулировали трансформированными бактериями и инкубировали в течение 16 ч при 28°C. Затем оптическую плотность регулировали путем добавления второй среды, дополненной ампициллином, и инкубировали снова при 28°C до достижения величины оптической плотности в диапазоне 0,6-0,8 при длине волны 600 нм. Экспрессию белка индуцировали посредством добавления 50 мкМ IPTG и инкубации культур при 21-28°C и 200 об/мин в течение 16 ч. После инкубации клетки осаждали центрифугированием (30 мин, 4°C, 7500 об/мин) и хранили при -20°C до последующей обработки.

Очистка анти-CD33 одноцепочечных Fv антител.

Рекомбинантный scFv экстрагировали из периплазмы *E.coli* после центрифугирования бактериальных клеточных культур путем ресуспендирования клеточной массы в буфере и инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре при легком перемешивании. Клетки осаждали центрифугированием и сохраняли супернатанты, содержащие рекомбинантные белки. Процедуру повторяли еще раз перед объединением супернатантов и гомогенизации с помощью ультразвуковой обработки. Гомогенаты разбавляли, дополняли низкими концентрациями имидазола и нагружали на предварительно упакованную колонку для аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом (IMAC) (GE Healthcare). Колонку промывали до приведения в исходное состояние, а затем связанный белок элюировали имидазольным буфером. Содержащие антитело фракции объединяли, а затем очищали эксклюзионной хроматографией (SEC). В заключение, белковые элюаты концентрировали путем ультрафильтрации и подвергали диализу против буфера хранения. После обработки при низких значениях pH (инкубация при pH 3,0 в течение 20-24 ч при 37°C) образцы нейтрализовали с использованием Tris. Очищенные белки хранили в виде аликвот при -80°C до использования.

Пример 2.

Клонирование экспрессионных ДНК-конструкций, кодирующих тандемные диатела (TandAb®).

Для экспрессии биспецифических тандемных диател в клетках CHO кодирующие последовательности всех молекул клонировали в экспрессионную векторную систему млекопитающего. scFv-домены анти-CD33 из примера 1 использовали для конструирования CD33/CD3-тандемных диател в комбинации с scFv-доменом анти-CD3, при этом домены организованы, как показано в табл. 7 и на фиг. 3. Вкратце, синтезировали и субклонировали генные последовательности, кодирующие VH- и VL-домены анти-CD33, разделенные пептидным линкером (VH-линкер-VL или VL-линкер-VH). Полученную конструкцию расщепляли для создания отдельных кодирующих последовательностей VH и VL, используя сайт рестрикции Bam HI, локализованный в пределах последовательности линкера. Затем эти VH- и VL-фрагменты лигировали с фрагментом ДНК, кодирующим VH- и VL-домены анти-CD3 (VH-линкер-VL или VL-линкер-VH), с получением конечной конструкции. Варианты 1-3 порядка доменов CD33/CD3-тандемных диател показаны на фиг. 3. Все экспрессионные конструкции были разработаны таким образом, чтобы содержать кодирующие последовательности для N-концевого сигнального пептида и C-концевой гексагистидиновой (6×His)-метки (SEQ ID NO: 122) для содействия секреции антитела и очистке соответственно.

Экспрессия тандемных диател в стабильно трансфицированных клетках CHO.

Использовали экспрессионную систему на основе клеток CHO (Flp-In®, Life Technologies), полученных из клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1968;60(4):1275-81). Адгезивные клетки субкультивировали в соответствии со стандартными протоколами для клеточных культур от фирмы Life Technologies.

Для адаптации к росту в суспензии клетки открепляли от колб для культуры ткани и вносили в среду без сыворотки. Адаптированные к суспензии клетки криоконсервировали в среде, содержащей 10% DMSO.

Рекомбинантные клеточные линии CHO, стабильно экспрессирующие секретируемые тандемные диатела, генерировали путем трансфекции адаптированных к суспензии клеток. Во время селекции на среде с антибиотиком гигромицином В измеряли плотность жизнеспособных клеток два раза в неделю, и клетки центрифугировали и ресуспендировали в свежей селективной среде при максимальной плотности $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Пулы клеток, стабильно экспрессирующие тандемные диатела, извлекали через 2-3 недели селекции и переносили в стандартную культуральную среду, содержащуюся во

встряхиваемых колбах. Экспрессию рекомбинантных секретируемых белков подтверждали путем проведения гель-электрофореза белков или проточной цитометрии. Стабильные пулы клеток криоконсервировали в среде, содержащей DMSO.

Тандемные диатела получали в культурах с 10-дневной подпиткой стабильно трансфицированных клеточных линий CHO путем секреции в супернатант клеточной культуры. Супернатанты клеточной культуры собирали через 10 дней при показателях жизнеспособности культуры, как правило, >75%. Образцы собирали из производственных культур через день и оценивали на клеточную плотность и жизнеспособность. На день сбора супернатанты клеточных культур осветляли путем центрифугирования и вакуумной фильтрации перед последующим использованием.

Титры экспрессии белка и целостность продукта в супернатантах клеточных культур анализировали с помощью SDS-PAGE.

Очистка тандемных диател.

Тандемные диатела очищали из супернатантов клеточной культуры CHO с помощью двухступенчатой процедуры. На первой стадии His6-меченные (SEQ ID NO: 122) конструкции подвергали хроматографии на Ni-NTA Superflow, а затем на второй стадии эксклюзионной хроматографии (SEC) на Superdex 200. Элюированные тандемные диатела характеризовали в отношении содержания гомодимера (тандемного антитела) и объединяли, если содержание гомодимера составляло 90% или выше. В заключение, объединенные образцы подвергали замене буфера и концентрировали путем ультрафильтрации до типичной концентрации >1 мг/мл. Чистоту и однородность (обычно >90%) конечных образцов оценивали с помощью SDS PAGE в восстановительных и невосстановительных условиях с последующим иммуноблоттингом с использованием анти-His-Tag антитела, а также путем аналитической SEC, соответственно. Очищенные белки хранили в аликвотах при -80°C до использования.

Полипептиды CD33/CD3-тандемных диател показаны в табл. 7 и на фиг. 3. Каждое тандемное диатело состоит из двух идентичных полипептидов (фиг. 1). Оба внешних линкера L1 и L3 состоят из шести аминокислот GGS GGS (SEQ ID NO: 95), при этом центральный пептидный линкер 2 варьирует по длине (4-6 аминокислот) с последовательностями, соответственно, GGS G (SEQ ID NO: 96), GGS GG (SEQ ID NO: 97) или GGS GGS (SEQ ID NO: 95).

С использованием серий варибельных доменов анти-CD33 и варибельных доменов анти-CD3 создано большое количество молекул тандемных диател, которые могут быть стабильно продуцированы в трансфицированных клеточных линиях и которые сохраняют стабильность при температуре тела, а также после повторных циклов замораживания/оттаивания. Для содействия дальнейшей разработке и доклиническим токсикологическим исследованиям внимание было акцентировано на селекцию молекул тандемных диател, которые показали связывание как с человеческим CD33, так и CD33 макак-крабоедов. Примеры полных аминокислотных последовательностей показаны для одиночной цепи тандемных диател 12 (SEQ ID NO: 109), 14 (SEQ ID NO: 111) и 16 (SEQ ID NO: 113) на фиг. 9M, 9O и 9Q соответственно. В этом примере порядок варибельных доменов и их линкеры для структур представляет собой следующий: VL (CD3)-L1-VH (CD33)-L2-VL (CD33)-L3-VH (CD3).

Пример 3.

Определение аффинности антител с помощью проточной цитометрии.

Клетки инкубировали с 100 мкл серийных разведений CD33/CD3-тандемных диател. После промывания три раза FACS-буфером клетки инкубировали с 0,1 мл мышиноного моноклонального анти-His антитела при концентрации 10 мкг/мл в том же самом буфере в течение 45 мин на льду. После второго цикла промывания клетки инкубировали с 0,1 мл FITC-конъюгированных козьих антимышиных IgG-антител при концентрации 15 мкг/мл в тех же самых условиях, как и ранее. В качестве контроля клетки инкубировали с анти-His IgG с последующими FITC-конъюгированными козьими анти-мышинными IgG-антителами без анти-CD33 тандемных диател. Затем клетки снова промывали и ресуспендировали в 0,2 мл FACS-буфера, содержащего 2 мкг/мл пропидия йодида (PI) для исключения мертвых клеток. Флуоресценцию 1×10^4 живых клеток измеряли с помощью проточного цитометра FC500 MPL фирмы Beckman-Coulter с использованием программного обеспечения MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) или проточного цитометра Guava EasyCyte фирмы Millipore с использованием программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Germany). Средние значения интенсивности флуоресценции клеточных образцов рассчитывали с использованием программного обеспечения CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) или программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Germany). После вычитания значений интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных только вторичными и третичными реагентами, полученные значения использовали для расчета величин K_D с помощью уравнения для связывания в одном участке (уравнение гиперболы) GraphPad Prism (версия 6.00 для Windows, программное обеспечение GraphPad Software, La Jolla California USA).

Тандемные диатела тестировали на их аффинности связывания с человеческими CD3⁺- и CD33⁺-клетками, и CD3⁻ и CD33⁻-клетками макак-крабоедов. Иллюстративные данные по связыванию для отобранных тандемных диател приведены в обобщенном виде в табл. 8.

Таблица 8. Характеристики CD3- и CD33-связывания CD33/CD3-тандемных диател

TandAb	K _D на Т-клетках [нМ]	K _D на HL-60 [нМ]	K _D на KG-1 [нМ]	K _D на U-937 [нМ]	Отношение K _D CD33 макак-крабоедов/CD33 человека	EC ₅₀ на HL-60 [нМ]
01	94.2	0.6	0.9	7.1	0.7	1.9
02	69.8	0.2	0.3	0.9	1.1	0.5
03	81.9	1.1	1.8	8.9	0.6	3.6
04	79.3	0.5	0.5	1.7	1.1	1.8
05	69.5	1.0	1.2	6.2	0.8	2.7
06	86.3	0.4	0.5	1.6	0.8	1.6
07	49.7	13.7	47.9	47.1	45.8	17.8
08	2.4	0.3	0.5	1.8	0.6	1.8
09	2.4	0.5	0.3	2.2	1.0	6.8
10	1.9	0.5	1.0	1.7	0.8	7.0
11	2.6	0.3	0.5	0.6	1.2	5.9
12	1.5	0.3	0.9	0.5	1.7	1.3
13	55.7	0.2	0.3	0.5	1.6	1.1
14	2.1	0.3	0.3	1.2	1.0	1.6
15	1.3	0.4	0.3	0.9	1.1	1.8
16	2.1	0.3	0.2	0.3	1.4	1.5
17	3.3	5.0	52.5	24.4	1.9	18.4
18	1.9	3.4	16.3	15.1	3.1	6.3
19	6.3	2.8	3.6	5.4	37.3	5.7
20	143.8	4.1	7.0	7.2	33.8	10.0
21	2.1	9.7	25.1	80.2	0.9	7.6
22	4.1	0.7	2.0	8.6	0.6	3.2
23	97.2	0.4	1.0	5.1	1.9	2.8
24	2.3	5.6	12.4	39.5	1.8	9.6

#Отношение K_D CD33 макак-крабоедов/CD33 человека рассчитывали на основе значений K_D, измеренных на клетках CHO, экспрессирующих CD33 макак-крабоедов и CD33 человека соответственно.

‡ Отношение K_D CD3 человека/CD33 человека рассчитывали на основе значений K_D, измеренных на клетках Jurkat (CD3 человека) и среднего значения K_D трех CD33⁺-опухолевых клеточных линий человека (HL-60, KG-1, U937).

Аффинность связывания с CD3 и кросс-реактивность оценивали в экспериментах по титрованию и проточной цитометрии на CD3⁺-клетках Jurkat (полученных от Dr. Moldenhauer, DKFZ Heidelberg; острый Т-клеточный лейкоз человека) и линии клеток CD3⁺ HSC-F макак-крабоедов (JCRB, номер по каталогу: JCRB1164). Связывание с CD33 и кросс-реактивность оценивали на CD33⁺-опухолевых клеточных линиях человека: HL-60 (DSMZ, номер по каталогу: ACC3, лейкоз из В-клеток-предшественников человека), U-937 (DSMZ, номер по каталогу: ACC5; гистиоцитарная лимфома человека) и KG-1 (DSMZ, номер по каталогу: ACC14; острый миелоидный лейкоз). Соотношение K_D кросс-реактивности рассчитывали с использованием значений K_D, определенных на клеточных линиях CHO, экспрессирующих рекомбинантные антигены человека или макак-крабоедов.

Тандемные диатела проявили относительно высокую аффинность в отношении человеческих CD33⁺ на большинстве тестированных опухолевых клеточных линиях, которая составила менее 1 нМ. Аффинность в отношении человеческого CD3 была равна 2 нМ или меньше.

Пример 4.

Анализ цитотоксичности.

Для анализа цитотоксичности клетки-мишени, культивированные в стандартных условиях, собира-

ли, промывали и ресуспендировали в разбавителе C, содержащемся в наборе PKN67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit, до плотности 2×10^7 клеток/мл. Затем клеточную суспензию смешивали с равным объемом PKN67-меченого раствора в двойной концентрации и инкубировали в течение 2-5 мин при комнатной температуре. Реакцию окрашивания выполняли путем добавления равного объема FCS и инкубации в течение 1 мин. После промывания меченых клеток-мишеней полной средой RPMI клетки подсчитывали и ресуспендировали до плотности 2×10^5 клеток/мл в полной среде RPMI. Затем 2×10^4 клеток-мишеней высевали вместе с обогащенными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток в соотношении Е:Т 5:1 в присутствии возрастающих концентраций указанных тандемных диател в индивидуальных лунках микротитровального планшета в общем объеме 200 мкл/лунку. Спонтанную гибель клеток и уничтожение мишеней Т-клетками при отсутствии антител определяли по меньшей мере в трех повторях на каждом планшете. После центрифугирования аналитические планшеты инкубировали в течение указанных периодов времени при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации культуры промывали один раз FACS-буфером, а затем ресуспендировали в 150 мкл FACS-буфера, дополненного 2 мкг/мл PI. Абсолютное количество живых клеток-мишеней оценивали по положительному зеленому окрашиванию PKN67 и негативному окрашиванию йодистым пропидием (PI) с помощью проточного цитометра FC500 MPL фирмы Beckman-Coulter (Beckman-Coulter) или проточного цитометра Guava EasyCyte фирмы Millipore (Merck Millipore). На основании измеренных оставшихся живыми клеток-мишеней рассчитывали процент специфического лизиса клеток по следующей формуле:

$$[1 - (\text{количество живых мишеней}_{\text{(образец)}} / \text{количество живых мишеней}_{\text{(спонтанное выделение)}})] \times 100\%.$$

Сигмоидальные кривые доза-ответ и значения EC₅₀ анализировали с применением нелинейной регрессии/4-параметрической логистической регрессии с использованием программного обеспечения GraphPad. Величины лизиса, полученные для заданной концентрации антитела, использовали для построения сигмоидальных кривых доза-ответ с применением 4-параметрической логистической регрессии с использованием программного обеспечения Prism.

Значения EC₅₀ определяли в 20-24-часовом анализе на клетках-мишенях CD33⁺ U-937 (DSMZ, номер по каталогу: ACC5; гистиоцитарная лимфома человека) с обогащенными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток в соотношении 5:1. Некоторые тандемные диатела тестировали также в анализах цитотоксичности на клетках-мишенях CD33⁺ KG-1 (DSMZ, номер по каталогу: ACC14; острый миелоидный лейкоз) и HL-60. В частности, клетки HL-60 выбирали в качестве модели AML с относительно высокой экспрессией CD33 на клеточной поверхности (средняя интенсивность флуоресценции (MFI) в условных единицах [среднее значение ± SEM]: 3133 ± 215; n=3), и KG-1a выбирали в качестве модели AML с очень ограниченной экспрессией CD33 (MFI в условных единицах: 277 ± 11; n=3). Иллюстративные данные по цитотоксичности для отобранных тандемных диател приведены в обобщенном виде в табл. 9. Дополнительные данные по цитотоксичности для клеточных линий HL-60 представлены в табл. 8, последняя колонка.

Таблица 9. Сила in vitro CD33/CD3-тандемных антител на различных CD33⁺ опухолевых клеточных линиях

Тандемное диатело	EC ₅₀ [пМ (пг/мл)] на человеческих CD33 ⁺ целевых клеточных линиях			
	HL-60	U-937	KG-1	среднее
12	1.3 (137)	0.8 (84)	1.2 (126)	1.1 (116)
14	1.6 (168)	3.6 (378)	2.6 (273)	2.6 (273)
16	1.5 (158)	1.9 (200)	1.8 (189)	1.7 (179)

Значения EC₅₀ определяли в анализах цитотоксичности на основе FACS с первичными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 5:1 на указанных линиях клеток-мишеней, инкубированных в течение 20-24 ч. Каждое тандемное диатело тестировали на каждой опухолевой линии клеток по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Представлены средние значения.

Пример 5.

Дополнительные скрининговые эксперименты на цитотоксичность в человеческих клеточных линиях CD33⁺ AML через 48 ч.

Как описано выше, значительную цитотоксичность детектировали уже через 24 ч, однако более высокие уровни токсичности могут быть детектированы через 48 ч. Для последующих анализов выбирали контрольный момент времени, составляющий 48 ч. Тестировали влияние селекции Т-клеток на индуцированную тандемными диателами цитотоксичность. Для этого получали нестимулированные РВМС от здоровых доноров-волонтеров и CD3⁺-клетки выделяли путем простого "позитивного обогащения" посредством использования CD3 MicroBeads, а также с помощью более сложной "негативной селекции" посредством коктейля антител MicroBead Cocktail против CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 и CD235a. Как показано на фиг. 4, индуцированная тандемным диателом цитотоксичность была более высокой с негативно селектированными Т-клетками от здоровых доноров по сравнению с позитивно селектированными Т-клетками. Однако способ селекции Т-клеток не повлиял на относительные

цитотоксические активности индивидуальных тандемных диател. Поэтому последующие анализы выполняли с использованием позитивно обогащенных Т-клеток от здоровых доноров.

Нестимулированные мононуклеарные клетки собирали от здоровых взрослых добровольцев посредством лейкофереза в центре Hematopoietic Cell Processing Core (Core Center of Excellence) Онкологического центра имени Фреда Хатчинсона (Fred Hutchinson Cancer Research Center, FHCRC) согласно исследовательским протоколам, утвержденным Институциональным наблюдательным советом FHCRC. Т-клетки обогащали посредством магнитной сортировки клеток с помощью CD3 MicroBeads ("позитивное обогащение") или с помощью набора Pan T-Cell Isolation Kit ("негативная селекция"; оба от фирмы Miltenyi Biotec, Auburn, CA), а затем замораживали в аликвотах и хранили в жидком азоте. Оттаявшие аликвоты клеток метили 3 мкМ CellVue Burgundy (eBioscience, San Diego, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Очищенные PBMC культивировали в присутствии различных концентраций молекул тандемных диател.

Для количественного определения индуцированной лекарственным средством цитотоксичности клетки инкубировали при 37°C (в 5% CO₂ и воздухе), как в примере 4, при различных клеточных соотношениях Е:Т. Через 24-72 ч количество клеток и индуцированную лекарственным средством цитотоксичность, используя DAPI для детекции нежизнеспособных клеток, определяли с использованием цитометра LSRII (BD Biosciences) и анализировали с помощью программы FlowJo. Клетки AML идентифицировали по свойствам прямого/бокового светорассеяния, а в экспериментах, в которых добавляли Т-клетки от здоровых доноров, по негативности окрашивания красителем CellVue Burgundy (фиг. 5). Индуцированная лекарственным средством специфическая цитотоксичность представлена в следующем виде:

$$\% \text{ цитотоксичность} = 100 \times (1 - \text{живые клетки-мишени}_{\text{обработанные}} / \text{живые клетки-мишени}_{\text{контроль}}).$$

Результаты анализов цитотоксичности представляли в виде средних значений $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Непараметрическую корреляцию Спирмена использовали для вычисления корреляций между характеристиками непрерывной выборки. Все Р-значения являются двусторонними. Статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

При отсутствии Т-клеток от здоровых доноров ни одно из CD33/CD-тандемных диател не проявило какого-либо заметного цитотоксического эффекта на клеточные линии AML при отсутствии Т-клеток, подтверждая обязательное требование для Т-клеток в отношении их цитотоксических эффектов (данные не показаны). В присутствии Т-клеток степень индуцированной тандемными диателами специфической цитотоксичности зависела от концентрации тандемного диатела, а также клеточного соотношения Е:Т. Прямые сравнительные исследования CD33/CD3-направляемых молекул тандемных диател и одного контрольного тандемного диатела (00) показали значительные различия в индуцированной антителом цитотоксичности в клетках HL-60 (фиг. 6A/B и табл. 10) и клетках KG-1a (фиг. 6C/D и табл. 10), при этом результаты имеют высокий уровень воспроизводимости в повторных экспериментах. В целом, степень индуцированной тандемными диателами цитотоксичности коррелировала с аффинностью связывания в отношении CD3 на первичных человеческих Т-клетках (для цитотоксичности в клетках KG-1a при 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) и Е:Т=5:1: $r=-0,542$, $p=0,009$; для цитотоксичности в клетках HL-60 при 25 пМ и Е:Т=5:1: $r=-0,391$, $p=0,07$). Тандемные диатела 12, 14, 16 были высоко цитотоксическими в отношении обеих клеток HL-60 и KG-1a.

Таблица 10. Индукция и цитотоксичность CD25 и CD69 через 48 ч CD33/CD3-тандемных диател

Танд. диател ¹	CD3 К _D (нМ) чел.Т- клетки	CD33 К _D (нМ) клетки HL-60	CD25 Индукция EC ₅₀ (нМ) ²	CD69 Индукция EC ₅₀ (нМ) ²	Т-клеточная пролиферация в РВМС EC ₅₀ (нМ) ³	Цитотоксич- ность, клетки HL-60 (% ± SEM) ⁴	Цитотокси- чность, клетки KG-1a (% ± SEM) ⁴
15	1.3	0.4	6	7	7	82.9 ± 3.7	80.2 ± 1.9
12	1.5	0.3	6	3	2	84.7 ± 2.3	85.6 ± 1.6
10	1.9	0.5	10	6	6	48.0 ± 2.4	78.6 ± 2.3
14	2.1	0.3	10	7	6	86.0 ± 0.4	69.8 ± 5.7
21	2.1	9.7	ND	225	500	12.4 ± 1.0	0.0 ± 0.2
24	2.3	5.6	ND	57	264	24.5 ± 1.9	1.1 ± 0.2
09	2.4	0.5	11	7	9	43.2 ± 15.8	74.6 ± 3.2
11	2.6	0.3	11	5	6	52.7 ± 8.1	84.7 ± 1.4
17	3.3	5.0	30	114	30	4.2 ± 0.2	0.7 ± 0.4
22	4.1	0.7	10	4	7	74.2 ± 7.4	44.4 ± 5.3
16	5.1	0.3	1	2	3	86.0 ± 1.4	81.3 ± 1.5
19	6.3	2.8	9	5	6	79.4 ± 3.5	83.8 ± 2.9
07	49.7	13.7	134	65	50	6.3 ± 3.3	2.1 ± 0.7
13	55.7	0.2	30	22	23	70.4 ± 2.5	1.3 ± 0.4
05	69.5	1	116	74	74	23.8 ± 6.9	0.3 ± 0.3
02	69.8	0.2	42	27	4	80.9 ± 3.6	4.6 ± 2.1
04	79.3	0.5	94	62	44	24.1 ± 4.0	0.7 ± 0.8
03	81.9	1.1	117	87	63	13.1 ± 3.6	0.0 ± 0.5
06	86.3	0.4	39	21	48	45.7 ± 6.4	1.4 ± 0.2
01	94.2	0.6	92	91	89	8.0 ± 1.6	0.4 ± 0.4
23	97.2	0.4	41	17	37	73.7 ± 2.6	1.5 ± 0.3
20	143.8	4.1	98	75	38	31.2 ± 3.9	1.1 ± 0.3

¹Тандемные диатела (TandAbs) перечислены в порядке увеличения аффинности в отношении CD3.

²Индукцию CD25 и CD69 измеряли через 24 ч в нефракционированных культурах РВМС.

³Пролиферация Т-клеток, индуцированная CD33/CD3-тандемными диателами, в нефракционированных РВМС с присутствующими CD33+-клетками.

⁴Цитотоксичность (%) через 48 ч DAPI+-клеток при концентрации тандемных диател 25 нМ в присутствии Т-клеток от здоровых доноров при соотношении Е:Т 5:1, по результатам 3 независимых экспериментов, выполненных в двоянных лунках.

ND: отсутствие обнаруживаемой активации CD25.

Пример 6.

Дополнительная характеристика тандемных диател в образцах первичного AML человека.

Для сравнительной характеристики цитотоксических свойств этих кандидатов образцы от пациентов с AML получали для исследований из хранилища образцов FHCRC.

Замороженные аликвоты Ficoll-выделенных мононуклеарных клеток из предварительно обработанных ("диагностических") образцов периферической крови или костного мозга от взрослых пациентов с AML получали из хранилищ образцов FHCRC. Использовали критерии Всемирной организации здравоохранения (WHO) 2008 года для определения AML (Vardiman et al.; Blood. 2009; 114(5):937-951) и уточненный критерий United Kingdom Medical Research Council (MRC) для оценки цитогенетического риска (Grimwalde et al.; Blood. 2010; 116(3):354-365). Пациенты давали письменное информированное согласие на сбор и использование их биологических образцов в исследовательских целях согласно протоколам, утвержденным FHCRC Institutional Review Board. Клинические данные деидентифицировали в соответствии с требованиями Закона о преемственности и подотчетности медицинского страхования (Health Insurance Portability and Accountability Act). После оттаивания клетки окрашивали напрямую мечеными антителами, распознающими CD33 (клон P67.6; PE-Cy7-конъюгированное), CD3 (клон SK7; PerCP-конъюгированное), CD34 (клон 8G12; APC-конъюгированное; все от BD Biosciences, San Jose, CA) и

CD45 (клон HI30; APC-eFluor®780-конъюгированное; eBioscience). Для идентификации нежизнеспособных клеток образцы окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). По меньшей мере 10000 событий собирали на проточном цитометре Canto II (BD Biosciences) и DAPI-клетки анализировали с использованием программы FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

После оттаивания образцы содержали >58% бластных клеток AML по данным проточной цитометрии на основании свойств CD45/бокового светорассеяния. Образцы содержали >50% жизнеспособных клеток сразу же после оттаивания и >50% жизнеспособных клеток через 48 ч в цитокин-содержащей жидкой культуре (фиг. 7). Средний возраст пациентов составлял 58,1 лет (диапазон: 23,9-76,2 года); риск цитогенетического заболевания был благоприятным у 2 пациентов, средний у 18 пациентов и серьезный у 7 пациентов. Информация по мутационному статусу NPM1, FLT3 и CEBPA была неполной; однако было известно, что один образец содержал двойную мутацию CEBPA^{double-mutant}, а другой образец являлся NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}. Средний процент миелоидных бластов и CD3⁺-Т-клеток в исследуемых образцах составил 86,1% (диапазон: 58,4-97,0%) и 2,0% (диапазон: 0-11,9%) соответственно, и средняя жизнеспособность образца в культуре через 48 ч составила 80,1% (диапазон: 53,6-93,6%). На момент сбора образцов пятнадцать пациентов имели впервые диагностированный AML, тогда как 12 имели рецидивирующее (n=7) или рефрактерное (n=5) заболевание. Как указано в табл. 11, основные характеристики образцов от пациентов, имеющих впервые диагностированный AML, и пациентов, имеющих рецидивирующее/рефрактерное заболевание, были схожими в отношении экспрессии CD33 на миелоидных бластах, количества аутологичных Т-клеток, доли миелоидных бластов и жизнеспособности культуры.

Добавление молекул тандемных диател в культуры образцов AML привело к умеренной дозозависимой цитотоксичности (фиг. 8А), что свидетельствует о том, что аутологичные Т-клетки, содержащиеся в образцах от пациентов с активным AML, могут быть захвачены для лизиса лейкозных клеток. В присутствии Т-клеток от здоровых доноров цитотоксическая активность индивидуальных тандемных диател находилась в строгой зависимости от дозы лекарственного средства и клеточного соотношения Е:Т (фигура 8В/С). Однако высокая активность тандемных диател наблюдалась даже в некоторых образцах с очень низкой экспрессией CD33 на бластах AML. Из числа молекул тандемных диател 12 оказались наиболее активными, поскольку имели самую высокую цитотоксичность при низких концентрациях (2,5 пМ (приблизительно 250 нг/мл) и, в менее выраженной степени, также 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл)) при обоих соотношениях Е:Т=1:3 и Е:Т=1:1.

CD33/CD3-тандемные диатела подвергали скринингу в репрезентативных образцах крови от пациентов с AML, которые различались по возрасту, полу пациента, стадии заболевания (впервые диагностированное, рецидивирующее, рефрактерное), уровню экспрессии CD33 и цитогенетическому риску (табл. 11). Примечательно, что ряд подвергнутых исследованию тандемных диател (например, 02, 08, 09, 11, 12, 14, 16, 19, 22 и 23) были высокоактивными почти во всех образцах от пациентов с различными заболеваниями, показанными на фиг. 15. Кроме того, степень и масштаб активности являются схожими на всех стадиях AML, включая впервые диагностированных, рецидивирующих и рефрактерных пациентов.

Таблица 11. Характеристики образцов первичного AML

	Все пациенты (n=27)	Впервые диагностирован- ные AML (n=15)	Рецидивирую- щие/ рефрактерные AML (n=12)
Средний возраст (диапазон), лет	58,1 (23,9-76,2)	64,0 (40,2-76,2)	44,4 (23,9-67,4)
Цитогенетический/молекулярный риск			
Благоприятный	2	2	--
Средний	18	10	8
CEBPA ^{double-mutant}	1	1	--
NPM1 ^{pos} /FLT3-ITD ^{neg}	1	--	1
NPM1 ^{pos} /FLT3-ITD ^{pos} or NPM1 ^{neg} /FLT3-ITD ^{pos}	10	5	5
Серьезный	7	3	4
Источник образцов			
Костный мозг	11	4	7
Периферическая кровь	16	11	5
Средний % бластов (диапазон)	86,1 (58,4-97,0)	86,1 (66,7-95,5)	86,7 (58,4-97,0)
Средняя экспрессия CD33 на бластах (диапазон)	849 (5-5356)	849 (5-5356)	788 (7-2242)
Средний % Т-клеток (диапазон)	2,0 (0-11,9)	1,6 (0-11,9)	2,1 (0,7-8,7)
Средний % жизнеспособности через 48 часов (диапазон)	80,1 (53,6-93,6)	76,0 (53,6-93,6)	83,5 (63,9-93,1)

Пример 7.

Сила и эффективность CD33/CD3-тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16 на различных CD33⁺-клеточных линиях различного происхождения, экспрессирующих на разных уровнях CD33.

Для оценки зависимости силы и эффективности CD33/CD3-тандемных диател от плотности CD33 на клетках-мишенях различные человеческие CD33⁺-опухолевые клеточные линии и клетки СНО, экс-

прессирующие рекомбинантный человеческий CD33, тестировали на их уровни экспрессии CD33 с использованием набора QIFIKIT quantification kit и анти-CD33 mAb WM53. Результаты в табл. 12 показывают, что плотности CD33 на опухолевых клеточных линиях находятся в диапазоне между ~1300 SABC (стандартизированная антитело-связывающая способность) и ~46000 SABC. Экспрессия на клетках CHO-CD33 составила ~197000 SABC, значительно выше, чем на опухолевых клеточных линиях. Все тестированные CD33⁺-клеточные линии использовали в качестве клеток-мишеней по меньшей мере в 3 независимых анализах цитотоксичности на основе FACS с человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении эффектора к мишени 5:1 в присутствии серийных разведений CD33/CD3-тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16. В каждом анализе значения EC₅₀ и опосредованного тандемным диателом лизиса рассчитывали с помощью нелинейной регрессии. Результаты показывают, что ни сила (значения EC₅₀), ни эффективность (% лизиса) 12 и 16 не коррелируют с плотностью CD33 на поверхности клеток-мишеней.

Примечательно, что по меньшей мере 12 и 16 проявляют свою цитотоксическую активность также против клеток, подобных SEM, с очень низкими плотностями CD33 ниже 1500 SABC.

Таблица 12. Экспрессия CD33 на поверхности клеток-мишеней и цитотоксическая активность CD33/CD3-тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16

Линия клеток	Плотность CD33 [SABC]		12		16	
			EC ₅₀ [пМ]		EC ₅₀ [пМ]	
	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
CHO-CD33	196990	28053	11,8	11,2	24,0	19,5
HL-60	45948	4478	1,4	0,5	1,6	0,4
KG-1	42828	6923	1,0	0,6	1,9	2,0
KASUMI-1	25922	6484	1,3	0,6	2,4	1,4
THP-1	22065	415	1,9	0,2	6,0	1,2
RPMI-8226	19931	2604	14,0	17,8	2,8	2,0
U-937	17669	4593	0,9	0,1	1,3	0,6
K562	13789	2156	4,5	1,3	4,8	2,7
BV-173	8518	1231	1,4	0,6	3,2	1,6
SEM	1306	144,2	2,2	0,5	5,1	3,0

Стандартизированную антитело-связывающую способность (SABC) на CD33⁺-клеточных линиях определяли с использованием QIFIKIT и анти-CD33 mAb WM53. Значения EC₅₀ для тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16, перенаправляющих лизис клеток-мишеней, определяли в анализах цитотоксичности на основе FACS с человеческими первичными Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношениях Е:Т 5:1 и инкубации в течение 20-24 ч; пробы с CD33-экспрессирующими клетками CHO инкубировали в течение 40-48 ч. Показаны средние значения и стандартное отклонение (SD) по меньшей мере из 3 независимых экспериментов.

Пример 8.

TandAb-активация Т-клеток и *in vitro* уничтожение клеток AML.

TandAbs инкубировали с очищенными человеческими Т-клетками и VPD-450-меченной CD33⁺-клеточной линией лейкоза человека KG-1 или CD33⁻-клеточной линией ALL человека G2 (Е:Т 5:1). Проточную цитометрию использовали для оценки лизиса клеток-мишеней TandAbs (от 10⁻¹⁵ до 10⁻⁸М; 24 ч, 37°C).

При инкубации TandAbs 12, 16 и 19 с человеческими Т-клетками происходил эффективный лизис клеток KG-1 (IC₅₀ ~0,01, 0,5 и 5 пМ, соответственно). Происходила активация до 40% Т-клеток (CD25⁺), которая повышалась одновременно с цитотоксической активностью. Контрольное TandAb с нерелевантной мишенью, 00 (>10⁻⁷ М), не вызывало значительного уничтожения KG-1 *in vitro*. Отдельно взятое 16 индуцировало лизис клеток KG-1 (IC₅₀ = 5 × 10⁻¹²М), тогда как при 1 × 10⁻⁸М эффект на CD33⁻-клетки G2 отсутствовал. Результаты указывают на то, что Т-клетки становятся активированными и эффективно лизируют опухолевые клетки при нацеливании на CD33⁺-лейкозные клетки (KG-1) и первичные CD33⁺-бласты AML с помощью CD33/CD3 TandAbs.

Пример 9.

Картирование эпитопов.

Тандемные диатела, содержащие различные CD33-связывающие фрагменты, подвергали картированию эпитопов с использованием технологии CLIPS Technology (Pepscan) для идентификации CD33-связывающих эпитопов.

Технология CLIPS содействует структурированию пептидов на единичные петли, двойные петли, тройные петли, сворачивания в виде листов, сворачивания в виде спиралей и их комбинации, обеспечивая возможность картирования непрерывных эпитопов целевой молекулы.

Синтезировали массив из более чем 7000 независимых пептидов и связывание каждого антитела с

пептидами тестировали методом ELISA.

Тандемные диатела 12, 14, 16 и 22 связываются с участком ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) в первом Ig-подобном домене человеческого CD33. Соответствующие участки аминокислот не подчеркнуты и выделены жирным шрифтом на фиг. 9А. Предполагается, что тандемные диатела 01, 02, 04, 06, 08, 09, 13 и 23 также связываются с этим эпитопом, поскольку содержат такие же CD33-связывающие домены (SEQ ID NO: 2 и 12, 3 и 13, 5 и 15, 9 и 19), как тандемные диатела 12, 14 16 и 12.

Пример 10.

Дозозависимый эффект в профилактической модели опухоли *in vivo*.

Тандемные диатела 12 и 16 сравнивали при различных уровнях доз в профилактической модели ксенотрансплантата опухоли HL-60 у мышей NOD/scid, восстановленной с помощью человеческих Т-клеток. Для достижения дозозависимого эффекта выбирали три уровня доз при 10, 1 и 0,1 мкг (0,5, 0,05 и 0,005 мг/кг).

Восемь экспериментальных групп иммунодефицитных мышей NOD/scid ксенотрансплантировали путем подкожной инъекции суспензии 4×10^6 клеток HL-60. Перед инъекцией клетки смешивали с 3×10^6 Т-клеток, выделенных из лейкоцитарных пленок (здоровых доноров), используя негативную селекцию. Для учета потенциальной донорной вариативности по Т-клеткам каждая из экспериментальных групп была разделена на три когорты, каждая из которых получала Т-клетки только одного индивидуального донора. Все животные экспериментальных групп, трансплантированные опухолевыми клетками и Т-клетками, получали внутривенный болюс на дни 0, 1, 2, 3 и 4 (qdx5) носителя (контроля) или же 16 или 12 при трех различных уровнях доз, как указано (0,1, 1 и 10 мкг). Одна группа без обработки эффекторными клетками и носителем служила в качестве дополнительного контроля. В табл. 13 приведено в обобщенном виде распределение по группам и схема дозирования.

Таблица 13

Группа	Лечение	Доза	Концентрация клеток / животное	Когорта	Схема введения (iv)	n
1	Носитель	---	4x10 ⁶ HL-60			4
2	Носитель	---	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3
3	16	10 мкг	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3
4	16	1 мкг	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3
5	16	0,1 мкг	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3
6	12	10 мкг	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3
7	12	1 мкг	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3
8	12	0,1 мкг	4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток 4x10 ⁶ HL-60 + 3x10 ⁶ Т-клеток	Когорта 1 Когорта 2 Когорта 3	День 0, 1, 2, 3, 4	3 3 3

Лечебные группы для исследования дозозависимого эффекта *in vivo* в модели ксенотрансплантата HL-60. Все животные в контрольных группах надежно развивали опухоль и проявили однородный рост опухолей. Присутствие Т-клеток не влияло на развитие опухолей. Различия в росте HL-60 не наблюдались в присутствии или отсутствии Т-клеток в контрольных группах, получавших носитель.

Лечение обоими тестируемыми тандемными диателами выявило четкий дозозависимый противоопухолевый эффект (фиг. 10). Значительного различия между двумя тандемными диателами не было обнаружено. Нанесение на график средних объемов опухолей на фиг. 10 ограничивалось днем 29, когда лечение большинства лечебных групп было завершено. Исследование продолжалось до дня 45 и животных наблюдали на безопухолевую выживаемость. В группах, подвергнутых лечению 10 мкг или 1 мкг 16, 6 из 9 животных не имели опухоли в конце периода наблюдения и 5 из 9 животных, получавших 10 мкг 12, не имели опухоли на день 45. Одно животное, которое получало 1 мкг 12, оставалось без опухоли.

Все животные в контрольных группах надежно развивали опухоль и проявили однородный рост опухолей. Лечение любым из тандемных диател выявило дозозависимый противоопухолевый эффект и отсутствие значительного различия между двумя тандемными диателами до дня 29.

Детектируемые различия присутствовали только после продолжительного наблюдения (день 45), которое прекращали для групп, получавших низкую дозу, и контрольных групп вследствие роста боль-

ших опухолей. В группах, получавших 16, имелось большее количество животных, не имеющих опухоль. Пример 11.

Модель развившейся опухоли.

Для доказательства правильности концепции разработали модель ксенотрансплантата у мышей NOD/scid с предварительно развившимися опухолями HL-60 с использованием 16.

Вкратце, иммунодефицитных мышинных самок NOD/scid сублетально облучали (2 Гр) и подкожно инокулировали 4×10^6 клеток HL-60. На день 9 животные получали однократную болюсную инъекцию анти-asialo GM1 кроличьего антитела (Wako, Neuss, Germany) для деплеции мышинных естественных клеток-киллеров (NK). На день 10, когда опухоль достигла объема в пределах 50-150 мм³ (среднее значение 73 ± 11 мм³), животных распределяли на 3 лечебные группы. Группам 2 и 3 (8 животных в каждой группе) интраперитонеально инъецировали $1,5 \times 10^7$ активированных человеческих Т-клеток. Перед инъекцией Т-клетки выделяли из лейкоцитарных пленок (здоровых доноров), используя негативную селекцию. Т-клетки размножали и активировали с помощью набора T-Cell Activation/Expansion Kit согласно инструкциям изготовителя (Miltenyi Biotec). Для оценки потенциальной донорной вариабельности группы 2 и 3 дополнительно разделяли на две когорты, каждая из которых получала размноженные и активированные Т-клетки от индивидуального донора. Каждая когорта получала Т-клетки только от одного индивидуального донора Т-клеток.

Таблица 14. Лечебные группы для модели ксенотрансплантата развившейся опухоли HL-60

Группа	Животные (n)	Инокулированные клетки		Когорта	Лечение
		День 0, подкожно	День 10,		
		(sc.)	интраперитонеально (ip.)		раз в день
1	5	4×10^6 HL-60			Носитель (iv)
2	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клеток (Донор 1)	1	Носитель (iv)
	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клеток (Донор 2)	2	
3	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клеток (Донор 1)	1	TandAb 16 (iv) 50 мкг
	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клеток (Донор 2)	2	

Начиная с дня 13, животные в группе 3 показали средний объем опухоли 105 мм³ и подвергались лечению в общей сложности 9 внутривенными дозами по 50 мкг тандемного диатела 16 (qdx9d). В табл. 14 показано распределение по группам и схема дозирования. Группы 1 и 2 получали только носитель. Массу тела и объем опухоли измеряли до дня 27.

Все животные надежно развивали опухоль, которая пальпировалась на день 6. Средний объем опухоли у животных группы 1 и 2 (HL-60), которые получали носитель, непрерывно увеличивался до завершения исследования на день 27 (фиг. 11). В группе 2 животные, которые получали первичные активированные человеческие Т-клетки дополнительно к опухолевым клеткам HL-60, средний объем опухоли увеличивался быстрее по сравнению с группой 1 (только HL-60).

Повторное внутривенное лечение с 13 по 21 день (qdx9d) тандемным диателом 16 (50 мкг/животное; 2,5 мг/кг) в присутствии человеческих Т-клеток (группа 3) быстро задерживало рост опухоли по сравнению с группой 1 и группой 2. Тандемное диатело 16 задерживало рост опухоли в группе 3 приблизительно на 4-5 дней по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем (группа 2). Статистически значимые различия в период с 6 по 27 день были выявлены между группой 2 (HL-60, Т-клетки, носитель) и группой 3 (HL-60, Т-клетки, 16) на день 22 ($p < 0,05$), день 23 ($p < 0,01$) и день 27 ($p < 0,01$) (двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями ANOVA с поправками Бонферрони, применяемыми после проведения такого анализа (post-tests)). Статистически значимых различий не было обнаружено между группой 1 и группой 2 по причине необычно медленного роста опухоли в группе 1.

Донорная вариабельность в отношении Т-клеточной активности не наблюдалась при сравнении развития опухоли в когорте 1 и когорте 2 в группе, которая получала Т-клетки от различных доноров (смотри табл. 14).

Пример 10 показывает, что модель ксенотрансплантата у мышей NOD/scid с предварительно развившейся опухолью HL-60 (AML) и интраперитонеально привитыми человеческими Т-клетками успешно развивалась. Повторное дозирование тандемного диатела 16 на уровне однократной дозы привело к статистически значимой задержке роста опухоли по сравнению с соответствующей контрольной группой, обработанной носителем. Полученные данные сравнимы с результатами, опубликованными для аналогичного исследования с использованием CD33/CD3 BiTE™ (Aigner et al., 2012; Leukemia, 2013, Apr;27(5):1107-15).

Пример 12.

Эффективность CD33/CD3-тандемных диател в модели PDX AML у мышей NSG.

Криоконсервированные клетки от пациента с AML, чей CD33⁺-лейкоз содержал 2-4% CD3⁺ Т-клеток, использовали для развития модели PDX AML у мышей NSG. Через час после инъекции опухолевых клеток облученным (250 сГр) мышам NSG инъецировали CD33/CD3-тандемные диатела 16 или 12 в одной из двух внутривенных (i.v.) доз (50 мкг или 5 мкг; n=8 мышей/группа) в виде болюса 200 мкл. Дополнительные инъекции тандемных диател выполняли через каждые 4 дня. Мышей взвешивали один раз в неделю, а затем умерщвляли на день 38 для сбора периферической крови, костного мозга и селезенки для анализа с помощью проточной цитометрии (huCD33, huCD34, huCD45, muCD45, huCD14, huCD3, huCD4, huCD8 и 7AAD). Результаты показаны на фиг. 12.

На фиг. 12 показано, что у не подвергнутых лечению мышей имелось значительное количество человеческих бластов в костном мозге и селезенке через 38 дней. Напротив, у мышей, подвергнутых лечению путем ежедневных внутривенных инъекций тандемными диателами 12 и 16, наблюдались значительно более низкие уровни человеческих бластов AML в костном мозге и в селезенке. Сильный анти-AML эффект CD33/CD3-тандемного диатела наблюдался при обоих уровнях доз (5 и 50 мкг/инъекция).

Наблюдаемый анти-AML эффект для обоих CD33/CD3-тандемных диател 12 и 16 был гораздо сильнее, чем эффект CD123/CD3 DART® антитела, нацеленного на AML в идентичной мышинной модели (Hussaini et al.: Targeting CD123 In Leukemic Stem Cells Using Dual Affinity Re-Targeting Molecules (DARTs®) November 15, 2013; Blood: 122 (21)). В противоположность CD33/CD3-тандемным диателам, которые уничтожали почти все бласты AML в костном мозге и селезенке, в работе Hussaini et al. описывается, что CD123/CD3 DART® снижают количество бластов AML в костном мозге и селезенке в модели PDX только в 50-1000 раз при 2,5 и 0,25 мг/кг, и авторы также сообщают, что CD123/CD3 DARTTM снижают количество бластов AML в костном мозге и селезенке в модели PDX только на 40-78% при 0.5 мг/кг.

Пример 13.

Быстрое начало лизиса клеток-мишеней, опосредованного CD33/CD3-тандемным диателом 16.

Для оценки кинетики лизиса клеток-мишеней, опосредованного CD33/CD3-тандемным диателом, проводили анализы цитотоксичности путем детектирования высвобождения кальцеина при различных значениях времени инкубации. Меченные кальцеином CD33⁺-клетки-мишени HL-60 инкубировали с серийными разведениями тандемного диатела 16 в присутствии первичных человеческих Т-клеток в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 25:1 в течение 30 мин, 1, 2, 3, 4 или 5 ч. В каждый момент времени кальцеин, который высвобождался из лизированных клеток-мишеней, использовали для расчета значения ЕС₅₀ и лизиса клеток-мишеней, опосредованного тандемным диателом 16, с использованием нелинейной регрессии/сигмоидальной кривой доза-ответ. На фиг. 13 показано неожиданно быстрое начало лизиса клеток-мишеней, опосредованного тандемным диателом, с более чем 40% лизисом через 30 мин инкубации при насыщающих концентрациях тандемного диатела. Через 4 ч инкубации был достигнут более чем 90% лизис клеток-мишеней. В табл. 15 и на фиг. 14 приведены значения ЕС₅₀ и величины специфического лизиса, определенные для тандемного диатела 16 при значениях времени инкубации в пределах от 30 мин до 5 ч. Кроме того, результаты демонстрируют, что в используемых аналитических условиях максимальная сила (самое низкое значение ЕС₅₀) достигалась через 2 ч инкубации и что через 5 ч инкубации почти все клетки-мишени были лизированы. В целом, эти результаты демонстрируют очень быстрый, сильный и эффективный лизис клеток-мишеней, опосредованный CD33/CD3-тандемными диателами.

Таблица 15. Кинетика ЕС₅₀ и величины лизиса, определенные для тандемного диатела 16

Время инкубации [мин]	ЕС ₅₀ [пМ]	Лизис, опосредованный тандемным диателом [%]
30	4,8	44,1
60	2,5	59,8
120	1,6	75,1
180	1,6	88,8
240	1,5	93,7
300	1,6	97,4

Пример 14.

Протокол пилотного клинического исследования по введению CD33/CD3-тандемных диател пациентам с AML.

Эта фаза I/II клинического исследования направлена на изучение CD33/CD3-тандемного диатела 16 с точки зрения его применения для лечения острого миелоидного лейкоза (AML).

Результаты исследования.

Первичные. Максимально переносимая доза CD33/CD3-тандемного диатела 16.

Вторичные. Определение, связан ли ответ in vitro CD33/CD3-тандемного диатела 16 с клиническим

ответом.

Фаза I.

Максимально переносимая доза (MTD) будет определена в разделе фазы I исследования.

1.1. Максимально переносимая доза (MTD) будет определена в разделе фазы I исследования.

1.2. Пациенты, удовлетворяющие критериям отбора, будут включены в исследование с применением CD33/CD3-тандемного диатела 16.

1.3. Целью является идентификация самой высокой дозы CD33/CD3-тандемного диатела 16, которую можно вводить безопасно без возникновения тяжелых или неуправляемых побочных эффектов у участников. Вводимая доза будет зависеть от количества участников, которые были включены в исследование, и от того, насколько хорошо переносится доза. Не все участники будут получать одинаковую дозу.

Фаза II.

2.1. Следующий раздел фазы II будет осуществляться при MTD с целью определения, приводит ли терапия CD33/CD3-тандемным диателом 16 по меньшей мере к 20% положительного клинического ответа.

Первичный результат для фазы II. Определение, приводит ли терапия CD33/CD3-тандемным диателом 16 к достижению клинического ответа по меньшей мере у 20% пациентов (ответ бластных клеток, незначительный ответ, частичный ответ или полный ответ).

Отбор.

AML, документально подтвержденный анализами периферической крови и костного мозга согласно критериям WHO, исключая пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом (APL).

Пациенты с AML, рефрактерным к первичной индукционной химиотерапии, рецидивирующим заболеванием или в возрасте ≥ 60 лет и не подходящие для проведения стандартной цитотоксической терапии из-за возраста, общего состояния и/или побочных факторов риска по мнению лечащего врача.

Возраст ≥ 18 лет.

Общее состояние по Карнофски $\geq 50\%$ или общее состояние по шкале ECOG 0-2.

Продолжительность жизни ≥ 6 недель.

Несмотря на то что в настоящем документе описаны и показаны некоторые варианты осуществления, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены будут возникать для специалистов в данной области без отступления от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы описанным здесь вариантам осуществления могут быть использованы при реализации указанных вариантов осуществления на практике. Предполагается, что следующие пункты формулы изобретения определяют объем изобретения и что тем самым охватываются способы и структуры, попадающие в пределы объема этих пунктов формулы изобретения, и их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антигенсвязывающее тандемное диатело, специфическое к человеческому CD33 и человеческому CD3, при этом указанное тандемное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре последовательно связанных друг с другом переменных домена цепи, при этом каждый полипептид содержит:

- (i) переменный домен тяжелой цепи (VH), специфический в отношении человеческого CD33;
- (ii) переменный домен легкой цепи (VL), специфический в отношении человеческого CD33;
- (iii) VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3; и
- (iv) VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3,

при этом каждый полипептид содержит четыре переменных домена цепи, выбранных из группы, состоящей из:

- (a) SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68;
- (b) SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68;
- (c) SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68;
- (d) SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68;
- (e) SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68; или
- (f) SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68,

и при этом в каждом полипептиде четыре переменных домена цепи последовательно связаны друг с другом посредством пептидных линкеров L1, L2 и L3 в следующем порядке:

VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3);
 VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3);
 VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); или
 VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).

2. Биспецифическое тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что линкеры L1, L2 и L3 состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков.

3. Биспецифическое тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что линкеры L1, L2 и L3 каждый независимо выбраны из GSGSGS (SEQ ID NO: 95), GSGS (SEQ ID NO: 96) или GSGG (SEQ ID NO: 97).

4. Биспецифическое тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что линкеры L1 и L3 представляют собой GSGSGS (SEQ ID NO: 95), а линкер L2 представляет собой GSGS (SEQ ID NO: 96) или GSGG (SEQ ID NO: 97).

5. Биспецифическое тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что четыре переменных домена цепи последовательно связаны друг с другом посредством пептидных линкеров L1, L2 и L3 в порядке VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); и в котором линкеры L1 и L3 представляют собой GSGSGS (SEQ ID NO: 95) и линкер L2 представляет собой GSGS (SEQ ID NO: 96) или GSGG (SEQ ID NO: 97).

6. Биспецифическое тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что тандемное диатело представляет собой тандемное диатело 12 (SEQ ID NO: 109), 14 (SEQ ID NO: 111), 15 (SEQ ID NO: 112), 16 (SEQ ID NO: 113), 19 (SEQ ID NO: 116) или 22 (SEQ ID NO: 119).

7. Биспецифическое антиген-связывающее тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что тандемное диатело обладает связыванием с константой диссоциации K_D , равной 10 нМ или менее, с CD33 на CD33⁺-опухолевых клетках, выбранных из HL-60, KG-1 и U-937.

8. Биспецифическое антиген-связывающее тандемное диатело по п.1, отличающееся тем, что тандемное диатело специфически связывается с эпитопом человеческого CD33, который находится в пределах ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 SEQ ID NO: 93) человеческого CD33.

9. Композиция для лечения CD33⁺ рака, содержащая биспецифическое антиген-связывающее тандемное диатело по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

10. Композиция по п.9, причем CD33⁺ рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), лимфобластный лейкоз из В-клеток-предшественников, миелоидную саркому, множественную миелому, острую лимфому, острую лимфобластную лимфому или хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), причем необязательно CD33⁺ рак представляет собой AML с рецидивирующими генетическими аномалиями, AML с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные новообразования, связанные с терапией; миелоидную саркому; миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна; или новообразование из бластных плазмцитоидных дендритных клеток.

11. Композиция по п.9, в которой AML является впервые диагностированным, рецидивирующим или рефрактерным.

12. Композиция по п.9, дополнительно содержащая цитарабин, азациитидин, децитабин, антрациклин, флударабин, клофарабин, кладрибин, неларабин, метотрексат, бортезомиб, карфилзомиб, мелфалан, ибрутиниб, талидомид, леналидомид, помалидомид, апремиласт, эписодофиллотоксин, антрацендион, агент анти-CD20 или их комбинации.

13. Композиция для лечения миелоидного диспластического синдрома (MDS), содержащая биспецифическое антиген-связывающее тандемное диатело по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

14. Композиция по п.13, дополнительно содержащая цитарабин, азациитидин, децитабин, антрациклин, амсакрин, флударабин, клофарабин, кладрибин, неларабин, метотрексат, бортезомиб, карфилзомиб, мелфалан, ибрутиниб, талидомид, леналидомид, помалидомид, апремиласт, эписодофиллотоксин, антрацендион, агент анти-CD20 или их комбинации.

15. Композиция для лечения подавления иммунитета супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSCs), содержащая биспецифическое антиген-связывающее тандемное диатело по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Применение биспецифического тандемного диатела по любому из пп.1-8 для лечения острого миелоидного лейкоза (AML).

17. Применение по п.16, дополнительно включающее введение цитарабина, азациитидина, децитабина, антрациклина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эписодофиллотоксина, антрацендиона, агента анти-CD20 или их комбинаций.

18. Применение по п.16, отличающееся тем, что AML представляет собой AML с рецидивирующими генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; миелоидные неоплазии, связанные с терапией; миелоидную саркому; миелоидные пролиферации, связанные с синдромом Дауна; новообразование из бластных плазмцитоидных дендритных клеток; или AML, не классифицируемый другим образом.

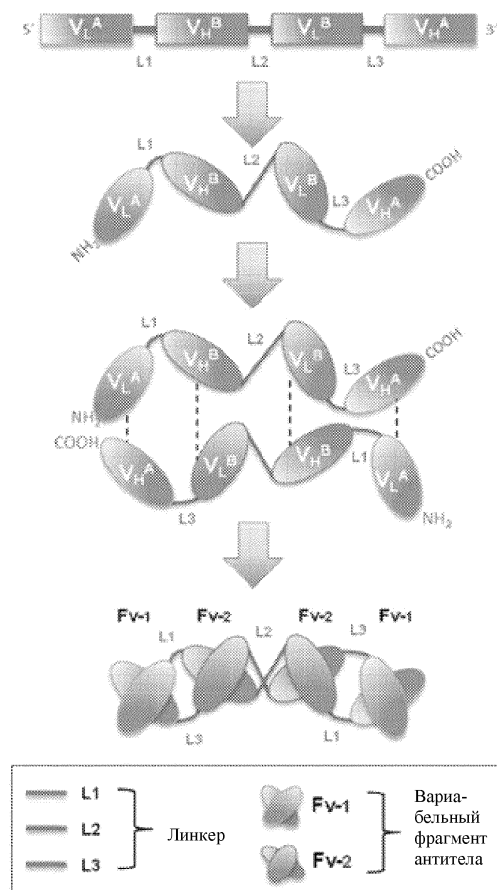
19. Применение по п.16, отличающееся тем, что AML представляет собой AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7.

20. Применение по п.16, отличающееся тем, что AML является впервые диагностированным, рецидивирующим или рефрактерным.

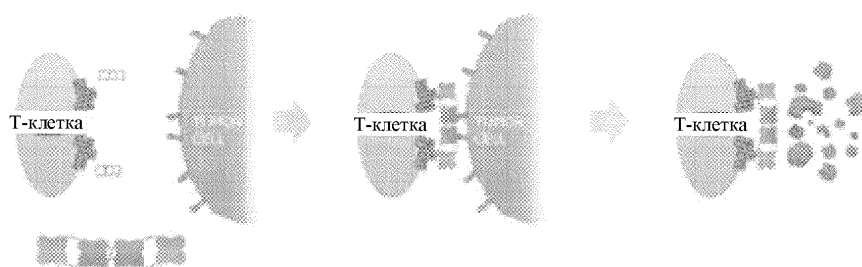
21. Применение по п.16, дополнительно включающее введение цитарабина, азациитидина, децитабина, антрациклина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эписодофиллотоксина, антрацендиона, агента анти-CD20 или их комбинаций.

22. Применение биспецифического тандемного диатела по любому из пп.1-8 для лечения CD33⁺-миелоидного диспластического синдрома (MDS).

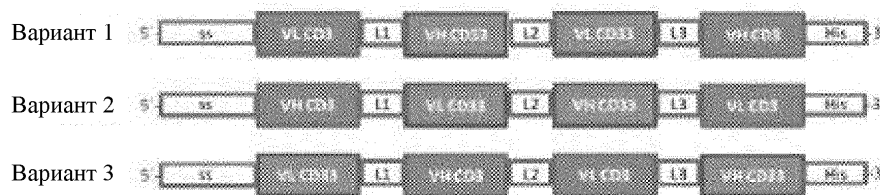
23. Применение по п.22, дополнительно включающее введение цитарабина, азацитидина, децитабина, антрациклина, амсакрина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эпитодофиллотоксина, антрацендиона, агента анти-CD20 или их комбинаций.



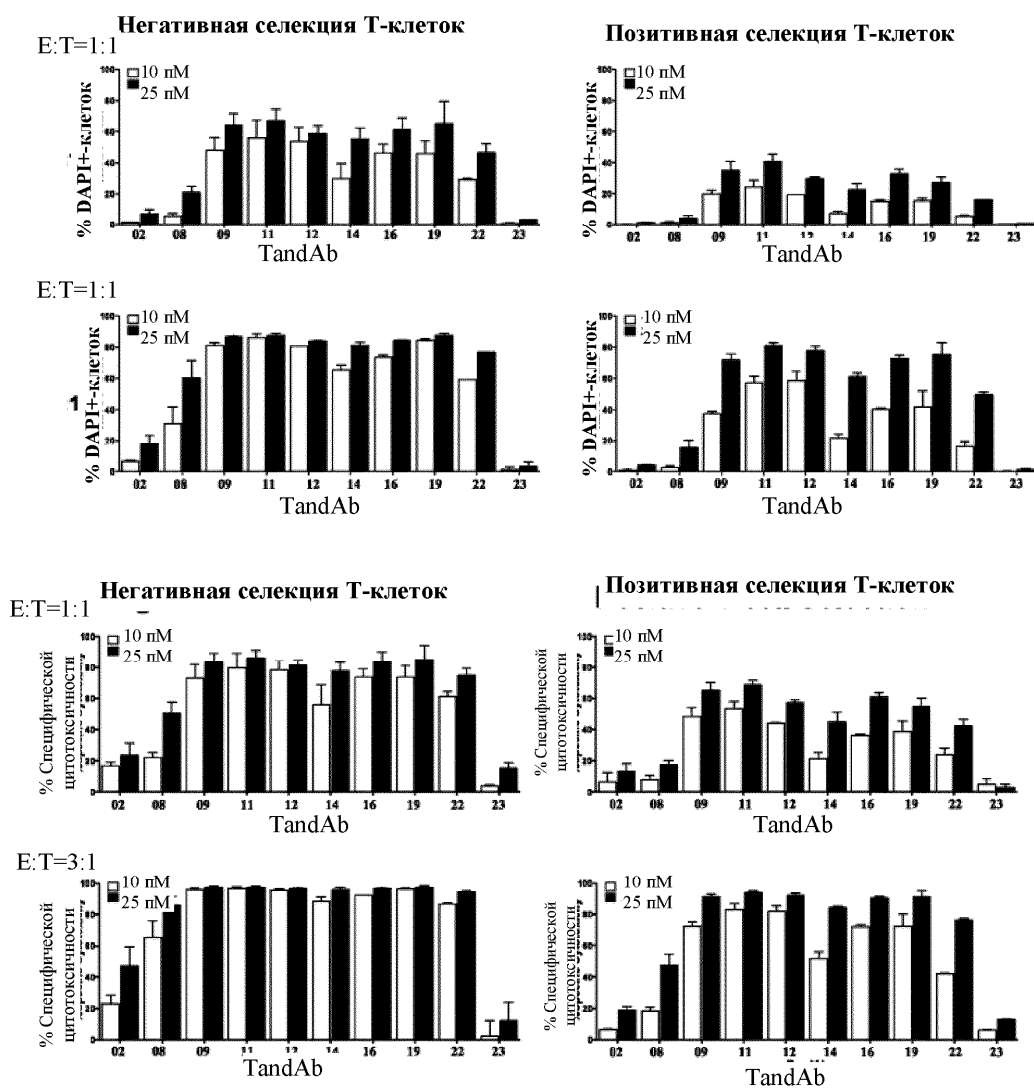
Фиг. 1



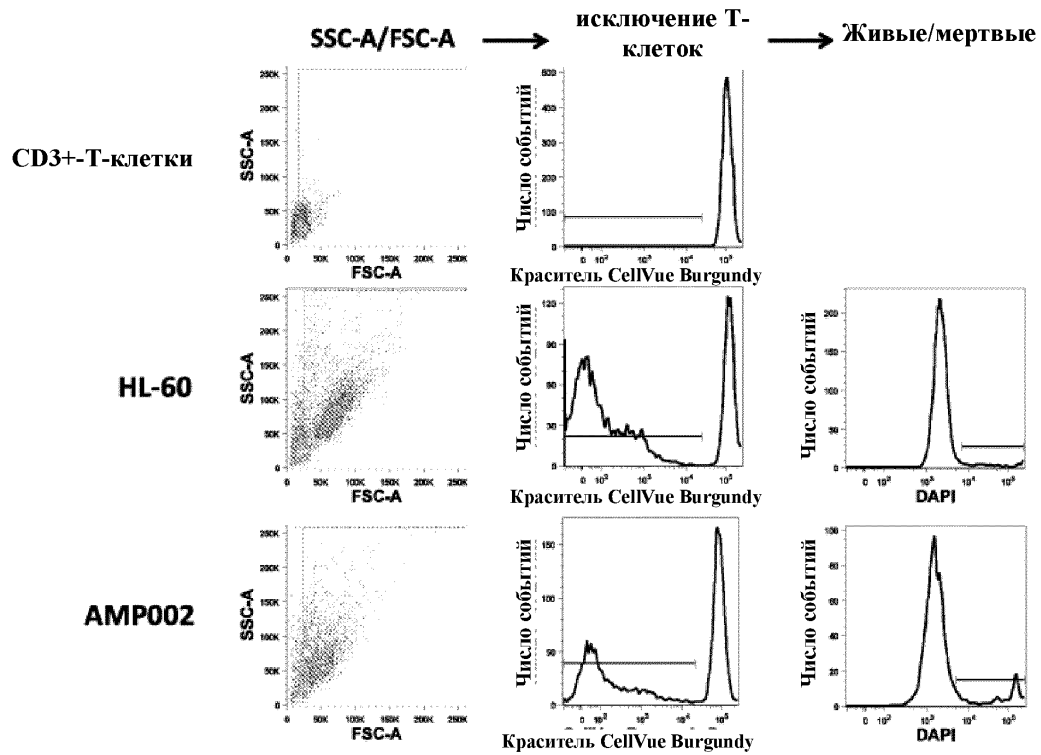
Фиг. 2



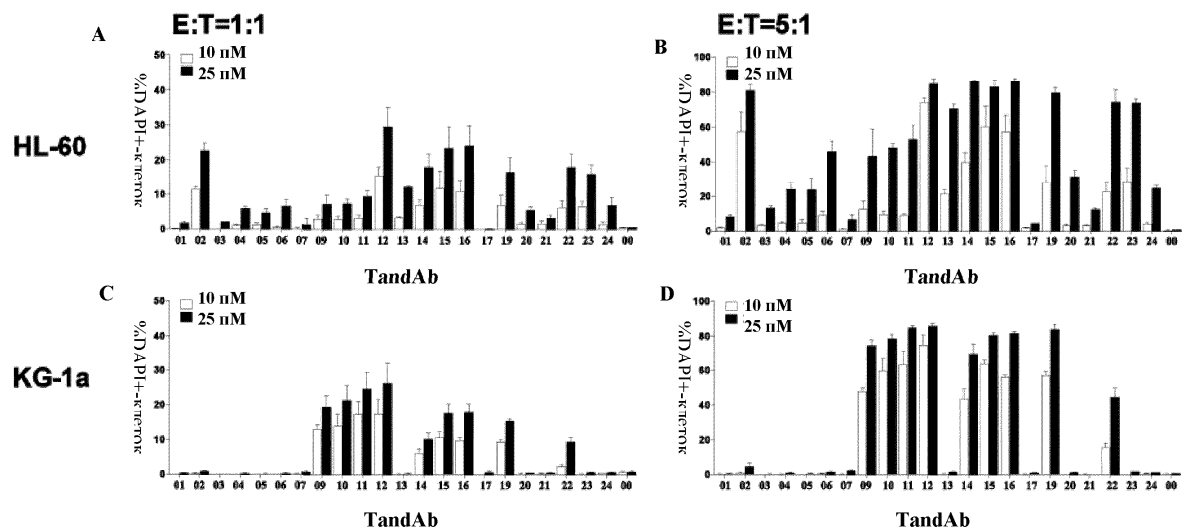
Фиг. 3



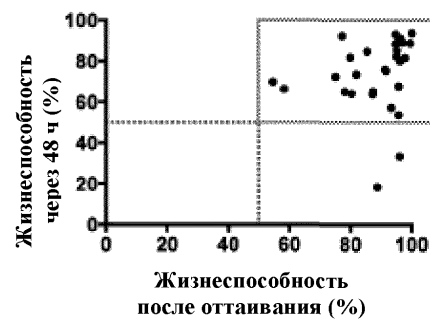
Фиг. 4



Фиг. 5

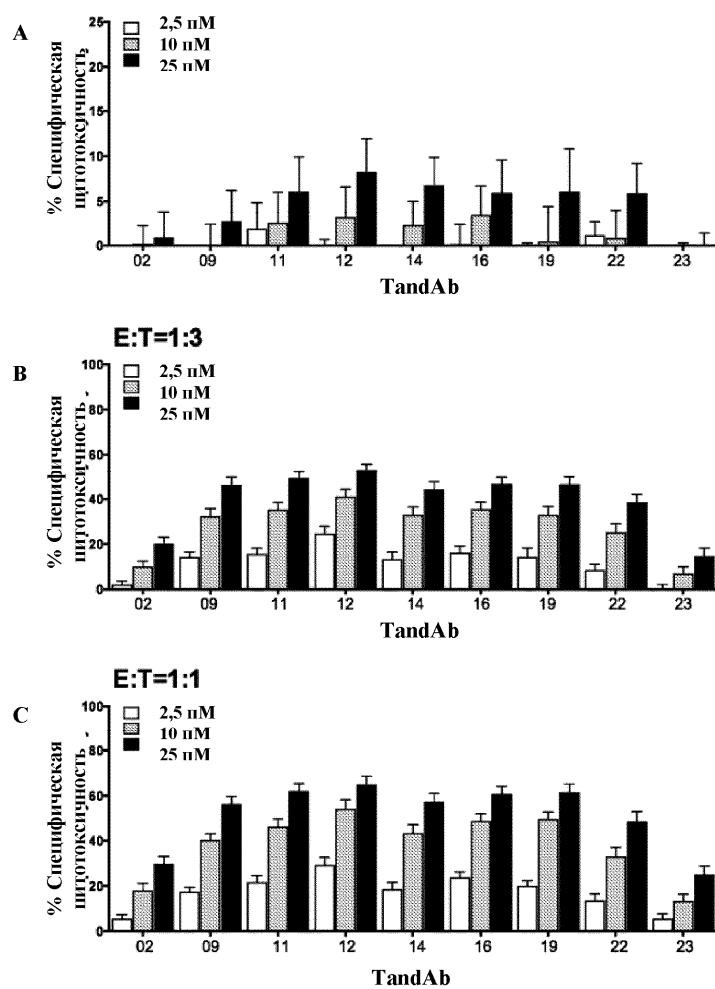


Фиг. 6



Фиг. 7

Без добавления Т-клеток от здоровых доноров



Фиг. 8

A

DENFWLQVQE SVTVQEGLCV LVPCTFFHPI PYYDKNSPVH GYWFREGAII SRDSPVATNK 60
LDQEVQEEETQ GRFRLLGDPS RNNCSLSIVD ARRRDNGSYF FRMERGSTKY SYKSPQLSVH 120
 VTDLTHREPKI LIPGTLEPGH SKNLTCVSW ACEQGTFFIF SWLSAAPTSL GPRTHSSVL 180
 IITPRPQDHG TNLTCQVKFA GAGVTTERTI QLNVTYVPQN PTTGIFFPGDG SGKQETRAGV 240
 VH 242

SEQ ID NO:93

B

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDRANTDFSFGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVDPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:98

C

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:99

D

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGGRVTMTTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSGRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:100

E

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLV
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:101

F

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGGQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAP
 GKGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLV
 TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:102

G

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGGQSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAP
 GKGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLV
 TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:103

H

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTIS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLQESGGGVVQPGRSRLSCAASGFSSNYGIHWVRQAPGKG
 LEWVALISYDGNKKFYADSVKGRFAISRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAKDRLESAAFDYWGQGTTLTVSSGGSGG
SSYELTQPPSVSVAPGQTAMITCGGNIGSTTVHWYQQKPGQAPVLVVYDDNERPSGIPERFSGSNNGSTATLTINRVEA
 GDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGTKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPGKGL
 EWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTLTVSS
 AAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:104

I

QSVLTQPPSASGTPGQRTITSCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISGLQ
 SEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPGKG
 LEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWQGQGLTVTS
SGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDK
 ATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPG
 RQAPGQGLEWMGMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDRANTDFS YGMDVWGQGLT
 VTSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:105

J

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
 LEWVGMMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDRANTDFS YGMDVWGQGLTIVTSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTITSCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWQGQGLVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:106

K

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
 LEWVGMMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDRANTDFS YGMDVWGQGLTIVTSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTITSCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWQGQGLVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:107

L

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
 LEWVGMMNPNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDRANTDYS LGMDVWGQGLTIVTSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTITSCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWQGQGLVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:108

M

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDFRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGTILVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:109

N

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDFRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILVT
 VSS

SEQ ID NO:110

O

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDFRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGTILVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:111

P

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGTILVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDFRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTIVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFTSYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGTILVT
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:112

Q

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPQG
 LEWMGMNPNNSGNTGPAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSLGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAYWGQGTTLV
 VSAAAGSHHHHHH
 SEQ ID NO:113

R

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG
 LEWMGIIYPGDSDTTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYICARHKRGSDAFDINGQGTTLTVSSGGSGQ
 SVLTQPPSVSGAPGQRTVITCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ
 AEDEADYYCQSYDSSLSDVVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKG
 LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAYWGQGTTLTVS
 SAAAGSHHHHHH
 SEQ ID NO:114

S

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNS
 LYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAYWGQGTTLTVSSGGSGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRTVITCTGSSSNI
 GAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSDVVFGGGTKL
 VLGGSGQVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDSDTTRYSPSFQGGQVTISADK
 SISTAYLQWSSLKASDTAMYICARHKRGSDAFDINGQGTTLTVSSGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGA
 VTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEI
 KAAAGSHHHHHH
 SEQ ID NO:115

T

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQG
 LEWMGIINPSSGGSTSYAQKFGQGRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDVVPAAIDYYGMDVWGQGTTLTVSSG
SGQQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVDPDRFSGSKSGSSASLAIS
 GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAP
 GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAYWGQGTTLV
 TVSSAAAGSHHHHHH
 SEQ ID NO:116

U

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFGSLIGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGTTFTSYIMHWVRQAPGQG
 LEWMGIIINPSSGGSTSYAQKFPQGRVTMTTRDTSTSTVYMEISSLRSEDTAVYYCARDVVPAAIDYYGMDVWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVDPDRFSGSKSGSSASLAISG
 GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITV
 TVSS

SEQ ID NO:117

V

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFGSLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTTFTSYAISWVRQAPGQG
 LEWMGGIIPFGSANYAQKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYSSEWAFDIWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNIVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVDPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDDSLKGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITV
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:118

W

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFGSLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTTFTSYGISWVRQAPGQG
 LEWMGGIIPFGSAHYAQKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYSSEWAFDIWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVDPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITV
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:119

X

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFGSLIGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTTFTSYGISWVRQAPGQG
 LEWMGGIIPFGSAHYAQKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYSSEWAFDIWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVDPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITV
 VSS

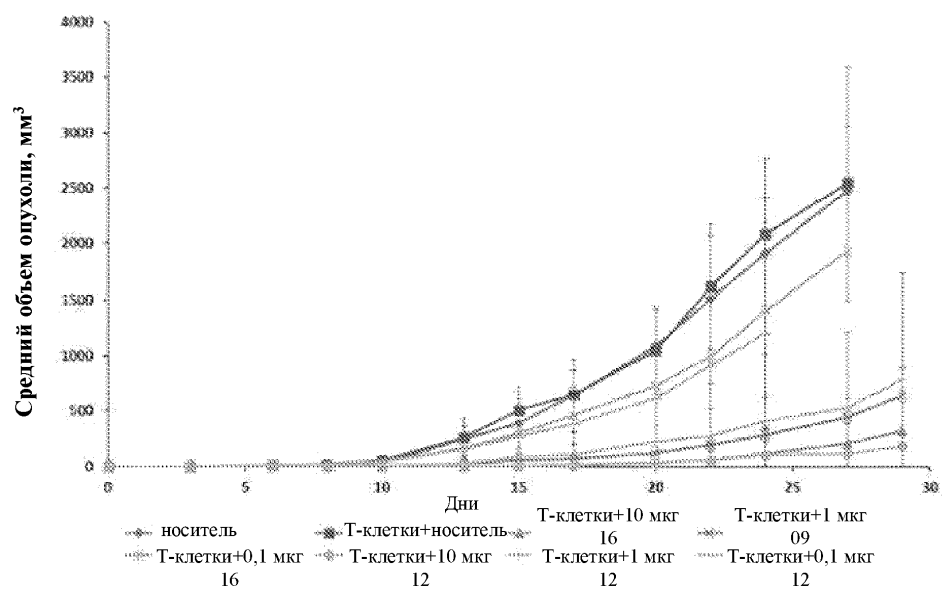
SEQ ID NO:120

Y

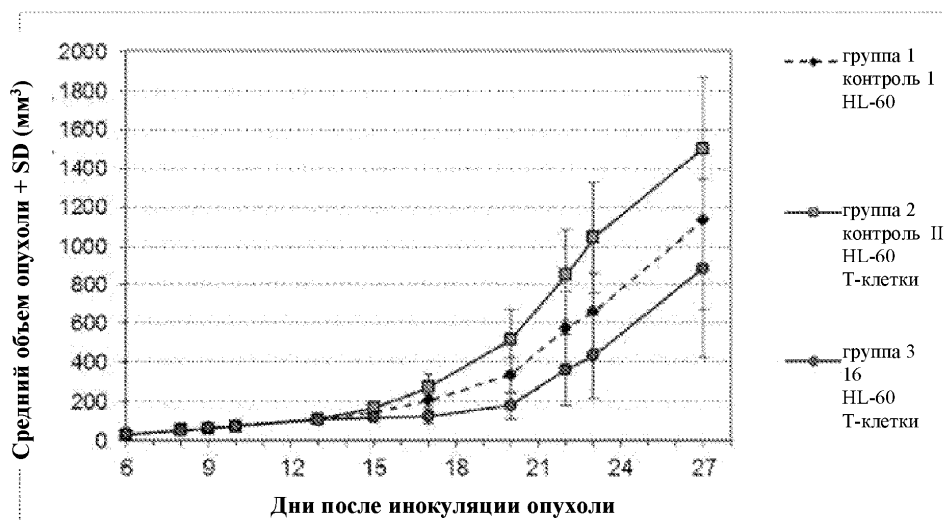
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFGSLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGTTFTSYAISWVRQAPGQG
 LEWMGGIIPFGSAHYSAKFPQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYSSEWAFDIWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGDNVNWYQQLPGTAPKLLIYSTNKRPSGVDPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDDSLSAYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITV
 VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:121

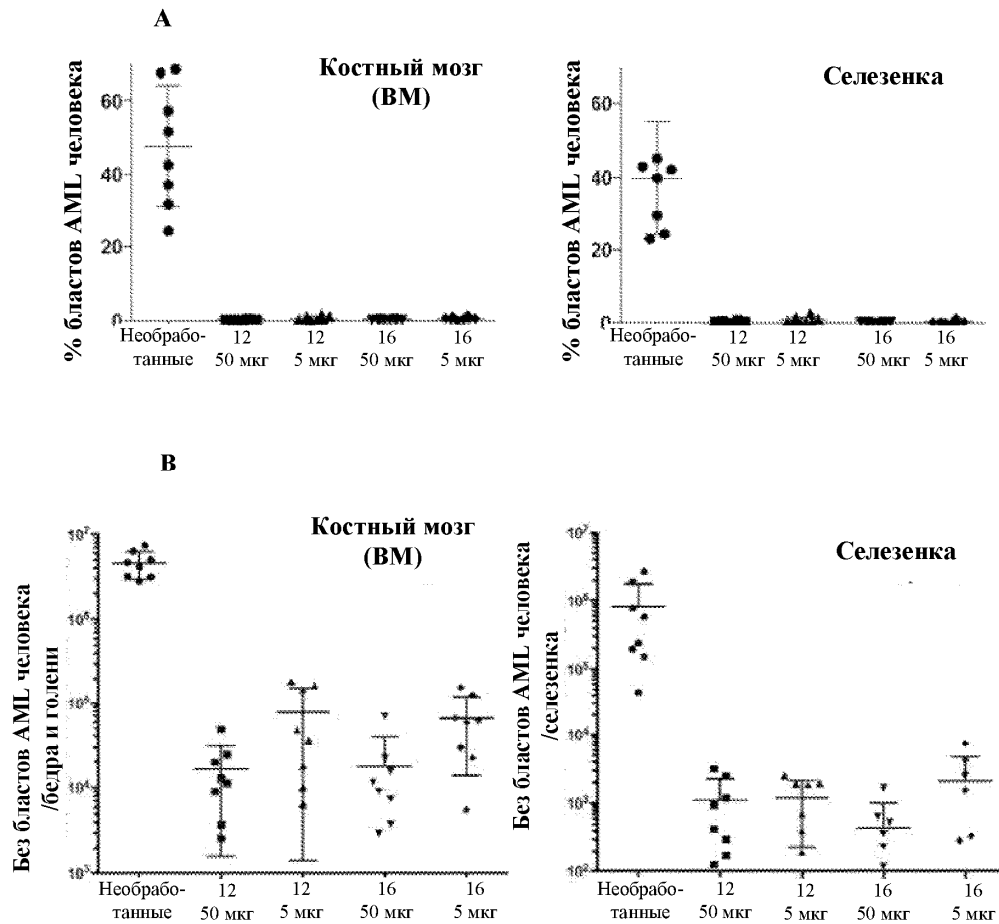
Фиг. 9



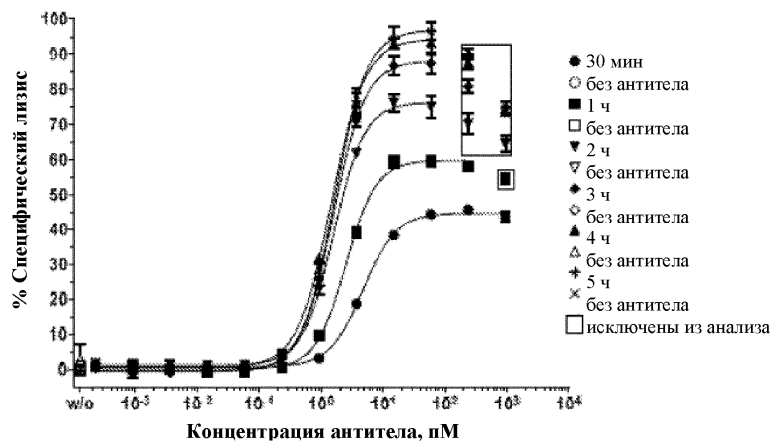
Фиг. 10



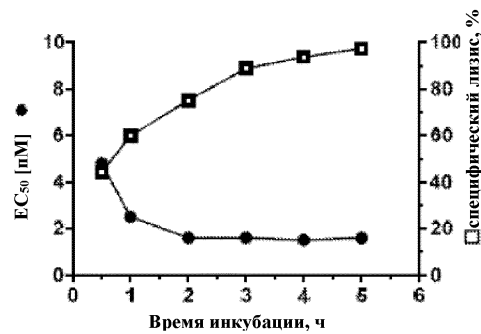
Фиг. 11



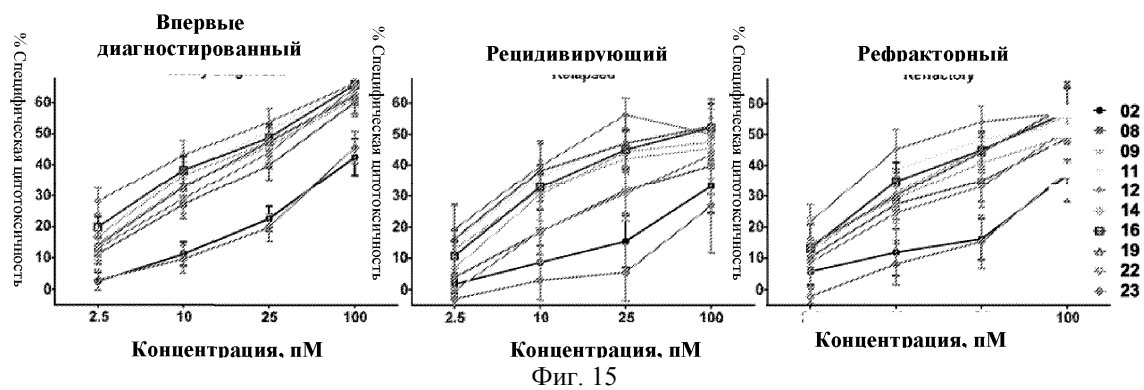
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2