



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.05.26

(21) Номер заявки
201590640

(22) Дата подачи заявки
2013.09.27

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(54) БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА КЛАССА IgG В КАЧЕСТВЕ РЕКРУТЕРОВ Т-КЛЕТОК

(31) 61/706,543; 61/834,915

(32) 2012.09.27; 2013.06.14

(33) US

(43) 2015.11.30

(86) PCT/NL2013/050693

(87) WO 2014/051433 2014.04.03

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРЮС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Баккер Бертольд Хендрик, Ван Ло
Питер Фокко, Логтенберг Тон (NL)**

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

(56) BAEUERLE PATRICK A ET AL: "Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 69, no. 12, 15 June 2009 (2009-06-15), pages 4941-4944, XP002665118, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0547 [retrieved on 2009-06-09] page 4941 - right-hand column

X. ZHAO ET AL: "Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia", HAEMATOLOGICA, vol. 95, no. 1, 31 July 2009 (2009-07-31), pages 71-78, XP055094666, ISSN: 0390-6078, DOI:

10.3324/haematol.2009.009811 page 74 - left-hand column table 1

WO-A2-2004009618

WO-A2-2005118635

WO-A1-2009051974

WO-A1-2011028952

N.N.: "Press Release Merus Presents Preclinical Data on its Novel Bispecific Antibody MCLA---117 at EHA 2013 --- Clinical Candidate Designed for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML) ---", 17 June 2013 (2013-06-17), XP055094670, Retrieved from the Internet: URL: http://www.merus.nl/uploads/docs/Merus_PR_EHA_17_June_2013_final_clean.pdf [retrieved on 2014-01-02] the whole document

N.N.: "Merus Press release", Merus B.V., 7 January 2013 (2013-01-07), XP055094673, DOI: 10.1093/annonc/mdq179 Retrieved from the Internet: URL: http://www.merus.nl/uploads/images/archive/20130107_Merus_PR_first_candidate_FINAL.pdf [retrieved on 2014-01-02] the whole document

ANNA VAN RHENEN ET AL: "The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 110, no. 7, 1 October 2007 (2007-10-01), pages 2659-2666, XP002632479, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2007-03-083048 [retrieved on 2007-07-03] the whole document

(57) Настоящим изобретением обеспечиваются биспецифические антитела класса IgG человека, одно плечо которых связывается с эпитопом иммунокомпетентных клеток-эффекторов, в то время как мишенью другого плеча является CLEC12A или его функциональный эквивалент. Также обеспечиваются фармацевтические применения этих антител против злокачественных новообразований, таких как MDS (миелодиспластический синдром), CML (хронический миелолейкоз) или AML (острый миелоидный лейкоз).

Область техники

Настоящее изобретение относится к области инженерии антител. В частности, изобретение относится к области терапевтических (человеческих) антител для лечения заболеваний, связанных с аномальными клетками. Конкретнее, изобретение относится к биспецифическим антителам для лечения опухолей.

Предпосылки создания изобретения

В лабораториях биспецифические антитела широко использовались для перенацеливания иммунокомпетентных клеток-эффекторов на опухолевые клетки. В этом случае один сайт связывания направлен против связанного с опухолью антигена (ТАА), а второй сайт - против молекулы-триггера на эффекторных клетках, такой как, например, CD3 на Т-клетках (Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames and Batty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551). Первые биспецифические антитела, мишенями которых являются CD3 и связанный с опухолевыми клетками антиген, получали у грызунов и они были созданы, используя гибридные гибридомы (Liu et al. 1985 PNAS 82: 8648, Staerz et al. 1986 PNAS 83: 1453, Lanzavecchia et al. 1987, Eur.J.Imm. 17: 105). В случае этих гибридных гибридом рекомбинация тяжелых и легких цепей Ig приводила к созданию молекул биспецифических функциональных антител внутри гораздо большего пула моноклональных и нефункциональных биспецифических антител, являющихся результатом ошибочного спаривания тяжелой и легкой цепей. Из-за своей двойной специфичности, эти функциональные биспецифические антитела были способны соединять цитотоксические Т-лимфоциты (CTL) мыши и человека с клетками-мишенями и включают цитотоксическую функцию, приводящую к лизису опухолевых клеток, представляющих на своей поверхности соответствующий антиген. Однако опосредуемой CD3xТАА биспецифическим IgG индукции лизиса опухолевых клеток с помощью поликлональных покоящихся Т-клеток человека нельзя было достичь, если не была обеспечена костимуляция с помощью добавленного экзогенного IL-2 или mAb (mAb) против CD28. Это можно проиллюстрировать на примере гибридной IgG2b крысы/IgG1 мыши CD3xCD19 биспецифической молекулы, которая была способна индуцировать лизис линии CD19-позитивных клеток опухоли REN B-ALL с помощью покоящихся Т-лимфоцитов человека только после совместного введения IL-2 (Naagen et al. 1995 Blood 85: 3208). Zeidler и др. продемонстрировали, используя схожую гибридную IgG2b крысы/IgG2a мыши биспецифическую CD3xEрсат молекулу, что индуцируемый биспецифическим IgG лизис Ерсат-позитивных опухолевых клеток может быть достигнут в смешанных клеточных культурах, включающих как моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), так и опухолевые клетки, без добавления экзогенного IL-2 (Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163: 1246). Авторы утверждали, что "третье" плечо антитела, Fc-область, вызывает такой эффект благодаря взаимодействию с позитивными по Fcγ-рецептору вспомогательными клетками, присутствующими во фракции PBMC. В частности, способность к сильной активации коррелировала с гибридной комбинацией подклассов IgG2a мыши/IgG2b крысы, которая, в отличие от других известных комбинаций (например, IgG2a мыши/IgG1 мыши или IgG2b крысы/IgG1 мыши), не только связывает, но также активирует позитивные по Fcγ-рецептору вспомогательные клетки. Это так называемое триомАт CD3xEрсат биспецифическое антитело, также известное как катумаксомаб, прошло клиническое испытание и было зарегистрировано в Европе для паллиативного лечения брюшных опухолей эпителиального происхождения. Хотя это биспецифическое антитело, несомненно, показало клиническую эффективность, его происхождение от грызунов вызывает иммунные ответы против продукта после повторного введения дозы и по этой причине мешает широкому применению этого формата.

Были изучены альтернативные CD3xТАА форматы для решения как имеющих отношение к лечению проблем, так и проблем иммуногенности, связанных с форматом гибридного триомАт грызунов. Такие форматы часто представляют собой подобные иммуноглобулинам молекулы, которые отличаются от полноразмерных молекул IgG человека, и включают такие молекулы, как перенацеливающие молекулы с двойной аффинностью (DART™), которые разрабатываются MacroGenics, во всемирной сети на macrogenics.com/Platforms-DART.html, биспецифические рекрутеры Т-клеток (BiTE®), которые были разработаны Micromet, теперь Amgen (Sheridan C, Nat Biotechnol. 2012 (30): 300-1), молекулы двойной вариативный домен-иммуноглобулин (DVD-Ig™), которые разрабатываются Abbott, и молекулы TandAb® RECRUIT, которые разрабатываются Affimed, во всемирной сети на affimed.com/tandab-recruit. Было установлено в случае одного из этих форматов, что для успешного перенацеливания лимфоцитов периферической крови для лизиса CD19-позитивных опухолевых клеток, используя CD3xCD19 диатело, требовалась предварительная активация Т-лимфоцитов периферической крови, теперь с использованием антитела против CD3 плюс IL-2 человека (Kipriyanov et al. 1998 Int. J. Can 77: 763). В случае других форматов, таких как формат CD3xТАА двухвалентной одноцепочечной Fv-молекулы BiTE® (Loffler et al. 2000 Blood 95: 2098) не требуется предварительная активация покоящихся Т-клеток, и они способны индуцировать лизис антиген-положительных опухолевых клеток очень эффективным образом (Dreier et al. 2002 IntJ. Cane. 100: 690). Дополнительные исследования, используя BiTE®, мишенями которых являются различные ТАА, показали, что большая эффективность формата BiTE® коррелировала с размером антигена и, в частности, с расстоянием от эпитопа ТАА до мембраны опухолевой клетки (Blumel et al.

2010 Cancer Immunol. Immunother 59: 1197). В случае молекул BiTE® было установлено эффективное образование цитолитических синапсов с Т-клетками, которое, как объясняется, образует структурную основу их эффективности (Offner et al. Molecular Immunology 2006 (43) 763-771), которая, как полагают, также связана с небольшим размером формата BiTE®. Если размер имеет значение, это может означать, что более крупные молекулы, такие как интактный IgG, будут слишком большими для образования эффективных цитолитических синапсов. CD3хCD19 BiTE®, блинатумомаб, продемонстрировал замечательную клиническую эффективность у пациентов с резистентной неходжкинской лимфомой и с острым лимфолейкозом (Bargou et al. 2008 Science 321: 974). Хотя CD3хCD19 BiTE® демонстрирует очень эффективный лизис опухолевых клеток при низких уровнях in vitro, введение этого биспецифического формата пациентам связано со значительными проблемами. Из-за их небольшого размера, BiTE® быстро выводятся из кровотока, и для введения дозы пациентам, таким образом, требуется непрерывная инфузия. Поскольку общая продолжительность схемы введения доз составляет более 2 месяцев, это лечение оказывает значительное влияние на качество жизни пациентов.

Таким образом, сохраняется потребность в полноразмерных, биспецифических, привлекающих Т-клетки молекулах класса IgG, эффективных в уничтожении аномальных клеток, в которых сочетаются длительный полупериод существования в кровотоке после внутривенного введения без необходимости в непрерывной инфузии, при этом не будучи иммуногенными, с только ограниченными побочными эффектами.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - CLEC12A и родственные последовательности.

Фиг. 2 - активация Т-клеток с помощью различных антител: моноклонального двухвалентного IgG против CD3, CD3XCLEC12 биспецифического IgG, CD3хконтроль изотипа биспецифического IgG, моноклонального двухвалентного IgG против CLEC12A, моноклонального двухвалентного, подобранного по изотипу контрольного IgG.

Фиг. 3 - специфический лизис клеток HL60 с помощью CD3XCLEC12A биспецифического IgG и контрольных антител.

Фиг. 4 - специфический лизис клеток HL60 с помощью CD3XCLEC12A биспецифического IgG и контрольных антител (соотношения Е:Т).

Фиг. 5 - специфический лизис клеток HL60 с помощью нескольких CD3XCLEC12A биспецифических молекул IgG, состоящих из различных CLEC12A-специфических плеч и неизменного CD3-специфического плеча, и контрольных антител.

Фиг. 6 - специфический лизис клеток HL60 с помощью CD3XCLEC12A биспецифического IgG в сочетании с Fc-подавлением (DM=двойной мутант; ТМ=тройной мутант; WT=дикий тип, отсутствие Fc-подавления).

Фиг. 7 - Fc-подавление на оказывает влияние на связывание с FcRn.

Фиг. 8 - специфическая для мишени CD3хCLEC12A bsAb индукция пролиферации Т-клеток.

Фиг. 9 - фракция CD8+ Т-клеток пациентов с AML по сравнению со здоровыми донорами.

Фиг. 10 - специфическая активация Т-клеток, индуцированная CD3хCLEC12A DM-Fc, и лизис опухолевых клеток HL60 Т-клетками пациентов с AML.

Фиг. 11 - специфический лизис AML бластных клеток аутологичными Т-клетками пациентов с AML.

Фиг. 12 - специфический лизис моноцитов Т-клетками пациентов.

Фиг. 13 - Fc-подавление значительно устраняет выброс цитокинов клетками-наблюдателями.

Фиг. 14А - определяемое с помощью FACS окрашивание, антитела против CD3 на клетках НРВ-ALL.

Фиг. 14В - связанный с планшетом IgG, Т-клетки, меченные CFSE, считывание данных на 5-й день с помощью FACS.

Фиг. 15 - анализ цитотоксичности по отношению к HL60.

Фиг. 16 - определяемое с помощью FACS окрашивание, антитела против CLEC12A на клетках HL60.

Фиг. 17 - анализ цитотоксичности по отношению к HL60.

Фиг. 18 - анализ с использованием FACS.

Фиг. 19 - анализ цитотоксичности по отношению к HL60.

Фиг. 20 - последовательности VH CD3-специфических и CLEC12A-специфических Fab-плеч. Последовательность VL общей легкой цепи человека. Последовательности CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение описывает полностью человеческое, биспецифическое полноразмерное антитело класса IgG для лечения AML. Одно плечо антитела связывается с эпитопом иммунокомпетентных клеток-эффекторов, предпочтительно CD3, в то время как мишенью другого плеча является CLEC12A, специфическая для миелоидных клеток мишень на поверхности, которая представлена у 90-95% па-

циентов с *de novo* AML и рецидивом AML. CLEC12A представлен на лейкозных стволовых клетках AML, но не на нормальных гемопоэтических клетках. В отличие от CD33, CLEC12A не представлен на эритроидных предшественниках или мегакариоцитах, а значит CD3xCLEC12A биспецифическое антитело подкласса IgG1 настоящего изобретения не должно вызывать истощение тромбоцитов или эритроцитов. Эксперименты с колониями клеток костного мозга показали, что истощение CLEC12A⁺ клеток в нормальном костном мозге не влияет на миелоидные линии, которые порождают тромбоциты и эритроциты. CD3xCLEC12A биспецифическое антитело класса IgG1 в соответствии с настоящим изобретением в предпочтительном варианте осуществления содержит модифицированную Fc-область для уменьшения неспецифической активации иммунной системы в результате привлечения Т-клеток и FcγR-экспрессирующих клеток внутри РВМС. Основываясь на данных, представленных для биспецифического антитела триомАТ в предшествующем уровне техники, было крайне сомнительно, что CD3хТАА биспецифический IgG формата полностью человеческого IgG1 будет способен индуцировать литическую противоопухолевую активность в покоящихся лимфоцитах периферической крови без необходимости в предварительной активации Т-клеток. Кроме того, имеющиеся для формата BiTE® данные предполагали, что полноразмерная молекула IgG будет слишком большой для создания эффективных цитолитических синапсов между опухолевыми клетками и эффекторными клетками. Удивительно, но авторы настоящего изобретения показали, что полностью человеческий, CD3xCLEC12A биспецифический, полноразмерный IgG1 способен индуцировать очень эффективный, опосредуемый Т-клетками лизис CLEC12A-позитивных опухолевых клеток HL60 AML *in vitro*. В действительности, эффективный лизис опосредовался покоящимися Т-лимфоцитами, очищенными из РВМС, без необходимости в предварительной активации Т-клеток. Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что эта литическая активность необязательно зависит от взаимодействий с FcγR, представленным на клетках HL60, поскольку на эту литическую активность не оказывает влияние присутствие избыточного количества IgG человека, когда анализ проводили в средах, содержащих сыворотку человека. Это первый случай, когда биспецифическое, привлекающее Т-клетки антитело формата полноразмерного IgG1 вызывает эффективный лизис опухолевых клеток без необходимости в предварительной активации Т-клеток или необходимость активных взаимодействий с FcγR. Эффективный лизис достигается несмотря на относительно большой размер IgG1 по сравнению с молекулами BiTE®. Примечательно, что, если мутации в СН2/нижней части шарнирной области были введены в CD3xCLEC12A биспецифическую молекулу IgG1 для дополнительного уменьшения взаимодействий с Fc-рецептором, то это по-прежнему приводило к эффективному лизису опухолевых клеток иммунокомпетентными клетками-эффекторами. Биспецифическое, привлекающее Т-клетки антитело подкласса IgG1 человека имеет преимущества по сравнению с существующим IgG, в котором применяется гибридная комбинация подклассов IgG2a мыши/IgG2b крысы, поскольку IgG1 человека будет менее иммуногенным и может, таким образом, использоваться для повторного лечения. Кроме того, полноразмерное биспецифическое, привлекающее Т-клетки антитело подкласса IgG1 человека имеет преимущества по сравнению с подобными иммуноглобулинами молекулами, такими как DART™, TandAb® или BiTE®, поскольку полноразмерный IgG1 человека не выводится быстро из кровотока, и для введения дозы пациентам, таким образом, не будет требоваться непрерывная инфузия, что более полезно для пациентов.

Варианты осуществления

Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу класса IgG, причем указанное биспецифическое антитело класса IgG включает одно плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, и второе плечо, которое специфически распознает антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов, способное к привлечению таких клеток к аномальным клеткам, экспрессирующим CLEC12A или указанный функциональный эквивалент.

Используемый в настоящем описании термин "специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент" означает, что указанное плечо обладает способностью специфически распознавать CLEC12A или указанный функциональный эквивалент, в случае, когда CLEC12A или указанный функциональный эквивалент присутствует вблизи указанного антитела. Аналогично, термин "специфически распознает антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов" означает, что указанное плечо обладает способностью специфически распознавать указанный антиген, когда указанный антиген присутствует вблизи указанного антитела. Такое распознавание антигена антителом, как правило, опосредуют области комплементарности антитела и специфическая трехмерная структура и антигена, и плеча антител, что позволяет этим двум структурам точно связаться вместе (взаимодействие, похожее на замок и ключ), в отличие от случайного, неспецифического прилипания антител. Поскольку антитело типично распознает эпитоп антигена, и поскольку такой эпитоп может также присутствовать в других соединениях, антитела в соответствии с настоящим изобретением, которые "специфически распознают CLEC12A или его функциональный эквивалент" и "специфически распознают антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов", могут также распознавать другие соединения, если такие другие соединения содержат тот же вид эпитопа. Следовательно, термины "специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент", "специфически распознает антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов" и

"специфически распознает CD3" не исключают связывание антител с другими соединениями, которые содержат тот же (вид) эпитоп(а). Вместо этого, допускается перекрестная реактивность. Антитело по настоящему изобретению, как правило, способно связываться с CLEC12A (или его функциональным эквивалентом) и антигеном иммунокомпетентных клеток-эффекторов, предпочтительно CD3, с аффинностью, составляющей по крайней мере 1×10^{-5} М, как описано подробнее ниже.

Используемый в настоящем описании термин "антитело" означает белковую молекулу, относящуюся к классу белков иммуноглобулины, содержащую один или более доменов, которые связываются с эпитопом антигена, причем такие домены происходят от вариабельной области антитела или обладают гомологией с ней. Предпочтительно, когда антитела для терапевтического применения как можно ближе к природным антителам субъекта, подвергаемого лечению, (например, антитела человека для являющихся людьми субъектов). Связывание антитела можно представить в терминах специфичности и аффинности. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп будет специфически связан связывающим доменом. Аффинность является показателем силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Специфическое связывание, или "специфически распознающее", определяется как связывание с аффинностями (KD), составляющими по крайней мере 1×10^{-5} М, более предпочтительно 1×10^{-7} М, более предпочтительно больше 1×10^{-9} М. Как правило, антитела для терапевтических применений обладают аффинностями, составляющими вплоть до 1×10^{-10} М или даже больше. Антитела настоящего изобретения типично представляют собой биспецифические полноразмерные антитела подкласса IgG человека. Предпочтительно антитела настоящего изобретения являются антителами подкласса IgG1 человека.

Термин "полноразмерный IgG" по настоящему изобретению определяется как включающий по существу целый IgG, который, однако, необязательно обладает всеми функциями интактного IgG. Во избежание сомнений, полноразмерный IgG содержит две тяжелые и две легкие цепи. Каждая цепь содержит константную (C) и вариабельную (V) области, которые можно разбить на домены, названные CH1, CH2, CH3, VH, и CL, VL. Антитело класса IgG связывается с антигеном посредством доменов вариабельных областей, содержащихся в Fab-части, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы через константные домены, в основном через Fc-часть. Термины "домен вариабельной области", "вариабельная область", "вариабельный домен", "пара VH/VL", "VH/VL", "Fab-часть", "Fab-плечо", "Fab" или "плечо" используются в настоящем описании взаимозаменяемо. Полноразмерные антитела по настоящему изобретению включают молекулы IgG, причем могут присутствовать мутации, которые обеспечивают желаемые характеристики. Такие мутации не должны быть делециями существенных частей какой-либо из областей. Однако молекулы IgG, в которых один или несколько аминокислотных остатков делетированы, без существенного изменения характеристик связывания результирующей молекулы IgG, включены в термин "полноразмерный IgG". Например, такие молекулы IgG могут иметь одну или более делеций 1-10 аминокислотных остатков, предпочтительно в не-CDR участках, причем делетированные аминокислоты не являются важными для специфичности связывания IgG.

Полноразмерные антитела класса IgG являются предпочтительными из-за их подходящего полупериода существования и необходимости остаться как можно ближе к полностью аутологичным молекулам (человека) по причинам иммуногенности. По настоящему изобретению используются биспецифические антитела класса IgG. В предпочтительном варианте осуществления используются биспецифические полноразмерные антитела подкласса IgG1. IgG1 является предпочитаемым на основе его длительного полупериода существования в кровотоке у человека. Для предотвращения какой-либо иммуногенности у людей предпочтительно, чтобы биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению представляло собой IgG1 человека. Термин "биспецифическое" (bs) означает, что одно плечо антитела связывается с первым антигеном, тогда как второе плечо связывается со вторым антигеном, причем указанные первый и второй антигены не являются идентичными. По настоящему изобретению указанные первый и второй антигены являются, фактически, двумя различными молекулами, которые расположены на двух различных типах клеток. Термин "одно плечо [антитела]" предпочтительно означает одну Fab-часть полноразмерного антитела класса IgG. Биспецифические антитела, которые опосредуют цитотоксичность путем привлечения и активизации эндогенных иммунокомпетентных клеток, представляют собой новый класс терапевтических средств на основе антител нового поколения. Это может быть достигнуто путем объединения специфичности связывания с антигенами клеток-мишеней (т.е. опухолевых клеток) и эффекторных клеток (т.е. Т-клеток, NK-клеток и макрофагов) в одной молекуле (Cui et al. JBC 2012 (287) 28206-28214; Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames and Baty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551; Loffler et al. 2000 Blood 95:2098; Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163: 1246). По настоящему изобретению обеспечиваются биспецифические антитела, в случае которых одно плечо связывается с антигеном CLEC12A аномальных (опухолевых) клеток, тогда как второе плечо связывается с антигеном иммунокомпетентных клеток-эффекторов.

Также изобретение относится к антителам, в которых VH способен специфически распознавать первый антиген, а VL, спаренный с VH в вариабельной области иммуноглобулина, способен специфически распознавать второй антиген. Результирующая пара VH/VL будет связывать или антиген 1, или анти-

ген 2. Такие так называемые "два-в-одном антитела", описанные, например, в WO 2008/027236, WO 2010/108127 и Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472-486, October 2011), также охватываются термином "биспецифическое антитело", поскольку они также обладают способностью к связыванию двух различных антигенов. В одном варианте осуществления используется VH, который специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, и используется VL, который специфически распознает антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов. Альтернативно, антитело по настоящему изобретению содержит VH, который специфически распознает антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов, и VL, который специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент. В любом случае, результирующее антитело обычно содержит две пары VH/VL, причем каждая пара VH/VL будет связывать или CLEC12A (или его функциональный эквивалент), или антиген иммунокомпетентных клеток-эффекторов. Два-в-одном антитела будут, как правило, или связывать два подобных антигена (AA или BB; моноспецифические двухвалентные), или связывать два различных антигена (AB; биспецифические). Следовательно, если два-в-одном антитела используются для терапевтических применений по настоящему изобретению, часть этих антител не будет оказывать желаемый эффект из-за их связывания или с двумя молекулами CLEC12A (или их функциональными эквивалентами), или двумя антигенами иммунокомпетентных клеток-эффекторов, такими как CD3. Поскольку терапевтическая цель еще может быть достигнута с помощью части вводимых антител, два-в-одном антитела являются, тем не менее, подходящими.

Используемый в настоящем описании термин "CLEC12A" относится к члену А семейства 12 доменов лектинов С-типа, также известному как подобная лектину С-типа молекула-1 (CLL-1), антигену, который представлен на лейкобластных клетках и на лейкозных стволовых клетках при остром миелоидном лейкозе (AML), в том числе CD34-негативных или с низким уровнем экспрессии CD34 лейкозных стволовых клетках (боковой популяции) (A.B. Bakker et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50; Van Rhenen et al. 2007 Blood 110:2659; Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26:3059). Иначе, экспрессия CLEC12A ограничивается линией гемопоэтических клеток, в частности миелоидными клетками в периферической крови и костном мозге, т.е. гранулоцитами, моноцитами и предшественниками дендритных клеток. Что еще более важно, CLEC12A отсутствует на гемопоэтических стволовых клетках. Этот профиль экспрессии делает CLEC12A особенно подходящей мишенью при AML. Альтернативные названия CLEC12A включают связанный с дендритными клетками лектин-2 С-типа (DCAL-2), рецептор вроде обладающего ингибирующим действием в отношении клеток миелоидной линии лектина С-типа (M1CL) и член 1 подсемейства L рецепторов вроде лектина клеток-киллеров 1 (KLRL1) (Zhang W. et al. номер доступа в GenBankTM: AF247788; A.S. Marshall, et al. J Biol Chem 2004, 279, p14792-802; номер доступа GenBankTM: AY498550; Y.Nan et al. Blood 2004, 104, p2858-66; H.Floyd, et al. номер доступа в GenBankTM: AY426759; C.H.Chen, et al. Blood 2006, 107, p 1459-67). Совмещение этих последовательностей представлено на фиг. 1. Полноразмерная форма CLEC12A включает 275 аминокислотных остатков, в том числе дополнительный внутриклеточный участок из 10 аминокислот, который отсутствует в большинстве других изоформ, и демонстрирует строго миелоидный профиль экспрессии (на уровне представленности на поверхности и на уровне мРНК). Термин "CLEC12A или его функциональный эквивалент" означает все варианты, на которые ссылаются выше, и их изоформы, которые характеризуются сохранением строго миелоидного профиля экспрессии (как на уровне представленности на поверхности, так и на уровне мРНК), как описано в Bakker et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50. Следовательно, настоящее изобретение включает биспецифические антитела класса IgG, в которых одно плечо специфически распознает функциональные эквиваленты CLEC12A, в том числе те функциональные эквиваленты, у которых отсутствует вышеуказанный дополнительный внутриклеточный участок из 10 аминокислот. Однако предпочтительными являются биспецифические антитела класса IgG по настоящему изобретению, в которых одно плечо специфически распознает полноразмерную форму CLEC12A.

Используемый в настоящем описании термин "аномальные клетки" включает опухолевые клетки, конкретнее, опухолевые клетки гематологического происхождения, включая также предлейкозные клетки, такие как клетки, которые вызывают миелодиспластические синдромы (MDS), и лейкозные клетки, такие как опухолевые клетки острого миелоидного лейкоза (AML) или клетки хронического миелолейкоза (CML).

Используемый в настоящем описании термин "иммунокомпетентная клетка-эффектор" или "эффекторная клетка" относится к клетке в природном репертуаре клеток в иммунной системе млекопитающих, которая может быть активирована и оказывать влияние на жизнеспособность клетки-мишени.

Иммунокомпетентные клетки-эффекторы включают клетки лимфоидной линии, такие как природные киллеры (NK), Т-клетки, включая цитотоксические Т-клетки, или В-клетки, но также клетки миелоидной линии, такие как моноциты или макрофаги, дендритные клетки и нейтрофильные гранулоциты могут рассматриваться в качестве иммунокомпетентных клеток-эффекторов. Следовательно, указанной эффекторной клеткой является предпочтительно NK-клетка, Т-клетка, В-клетка, моноцит, макрофаг, дендритная клетка или нейтрофильный гранулоцит. По настоящему изобретению привлечение эффекторных клеток к аномальным клеткам означает, что иммунокомпетентные клетки-эффекторы приводятся в непосредственную близость от аномальных клеток-мишеней, так что эффекторные клетки могут

непосредственно уничтожить, или косвенно инициировать уничтожение аномальных клеток, к которым они привлекаются. Во избежание неспецифических взаимодействий, предпочтительно, когда биспецифические антитела настоящего изобретения специфически распознают антигены иммуннокомпетентных клеток-эффекторов, которые, по крайней мере, сверхэкспрессированы в этих иммуннокомпетентных клетках-эффекторах по сравнению с другими клетками в организме. Антигены-мишени, присутствующие на иммуннокомпетентных клетках-эффекторах, могут включать CD3, CD16, CD25, CD28, CD64, CD89, NKG2D и NKp46. Предпочтительно, когда антигеном иммуннокомпетентных клеток-эффекторов является CD3, представленный на Т-клетках, или его функциональный эквивалент (функциональным эквивалентом будет молекула вроде CD3 с аналогичным распределением на Т-клетках и аналогичной функцией (по типу, а не обязательно в количественном отношении)). Используемый в настоящем описании термин "CD3" также охватывает функциональные эквиваленты CD3. Наиболее предпочтительным антигеном иммуннокомпетентной клетки-эффектора является цепь CD3ε. Было установлено, что этот антиген является очень эффективным в привлечении Т-клеток к аномальным клеткам. Следовательно, биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению предпочтительно содержит одно плечо, которое специфически распознает CD3ε.

Таким образом, настоящее изобретение относится к биспецифическому полноразмерному антителу класса IgG, причем указанное биспецифическое антитело включает одно плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, и второе плечо, которое специфически распознает антиген иммуннокомпетентных клеток-эффекторов, способное к привлечению таких клеток к аномальной клетке, экспрессирующей CLEC12A или указанный функциональный эквивалент, причем указанные иммуннокомпетентные клетки-эффекторы включают Т-клетки. В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу класса IgG по настоящему изобретению, причем указанным антигеном указанных иммуннокомпетентных клеток-эффекторов является CD3 или его функциональный эквивалент, предпочтительно CD3ε человека. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к F(ab)₂-фрагментам такого биспецифического CLEC12AxCD3 антитела класса IgG.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу класса IgG по настоящему изобретению, в котором оба плеча включают общую легкую цепь. Термин "общая легкая цепь" по настоящему изобретению относится к легким цепям, которые могут быть одинаковыми или имеют некоторые отличия по аминокислотным последовательностям, сохраняя при этом специфичность связывания антитела. Например, можно в пределах объема определения общих легких цепей, как они используются в настоящем описании, получить или найти легкие цепи, которые не являются идентичными, но все еще являются функционально эквивалентными, например, путем введения и проверки консервативных аминокислотных замен, замен аминокислот в участках, которые не вносят вклад или лишь отчасти вносят вклад в специфичность связывания после спаривания с тяжелой цепью, и т.п. Все из терминов "общая легкая цепь", "общая VL", "отдельная легкая цепь", "отдельная VL", с добавлением или без добавления термина "реаранжированная", используются в настоящем описании взаимозаменяемо. В одном из аспектов настоящее изобретение относится к применению в качестве общей легкой цепи легкой цепи человека, которую можно объединить с различными тяжелыми цепями с получением антител с функциональными антигенсвязывающими доменами (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al. 1998, Nissim et al., 1994). Предпочтительно, если общая легкая цепь имеет последовательность зародышевой линии. Предпочтительной последовательностью зародышевой линии является вариационная область легкой цепи, которая часто используется в человеческом репертуаре и обладает превосходной способностью к спариванию со многими различными VH-областями, и характеризуется хорошей термодинамической стабильностью, выходом и растворимостью. Наиболее предпочтительной легкой цепью зародышевой линии является O12, предпочтительно реаранжированная легкая цепь каппа зародышевой линии IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 (номенклатура в соответствии с базой данных IMGT, во всемирной сети на imgt.org) или его фрагмент или его функциональное производное. Термины реаранжированная легкая цепь каппа зародышевой линии IgVκ1-39*01/IGJκ1*01, IGKV1-39/IGKJ1, легкая цепь huVκ1-39 или кратко huVκ1-39 используются взаимозаменяемо на протяжении всей заявки. Очевидно, что специалисту в данной области будет понятно, что "общая" также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, аминокислотная последовательность которых не является идентичной. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, в случае которых присутствуют мутации (делеции, замены, дополнения), которые не оказывают существенное влияние на образование функциональных связывающих областей.

Особенно предпочтительный вариант осуществления относится к биспецифическому антителу класса IgG по настоящему изобретению, в котором плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична SGYTFTSY, и последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична IINPSGGS, и последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична GTTGDWFD. Предпочтительно, когда указанные последовательности

CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи состоят из последовательности, которая идентична по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% приведенным последовательностям CDR. Как правило, допускаются отклонения 1, 2 или 3 аминокислотных остатков от приведенных последовательностей CDR при сохранении того же типа активности связывания (по типу, необязательно в количественном отношении). Следовательно, указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи предпочтительно содержат последовательности, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от приведенных последовательностей CDR. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи идентичны приведенным последовательностям CDR. Приведенными последовательностями CDR являются последовательности CDR Fab-плеча 4327, которое, как показано в примерах, обладает хорошими способностями к связыванию с CLEC12A. Последовательность тяжелой цепи Fab-плеча 4327, следовательно, VH из CLEC12A-специфического антитела 4327, представлена на фиг. 20. В одном предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению включает последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), которая по крайней мере на 90% идентична этой VH антитела 4327. Следовательно, обеспечивается, кроме того, биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению, в котором плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, включает последовательность VH, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90%, предпочтительно по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% или даже на 100% идентична последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQK
FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCAKGTGDFWFDYWGQGLTVTS.

Как показано в примерах, биспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие упомянутую выше последовательность VH, вместе с последовательностью VH Fab-плеча, распознающего CD3 (и вместе с общей легкой цепью), обладают превосходной способностью вызывать опосредуемый Т-клетками лизис CLEC12A-позитивных клеток опухоли AML.

Еще один предпочтительный вариант осуществления относится к биспецифическому антителу класса IgG по настоящему изобретению, в котором плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична SGYTFTSY, и последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична IINPSGGGS, и последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична GNYGDEFDY. Предпочтительно, если указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи состоят из последовательности, которая идентична по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% приведенным последовательностям CDR. Как указано выше, как правило, допускаются отклонения 1, 2 или 3 аминокислотных остатков от приведенных последовательностей CDR при сохранении такого же типа активности связывания (по типу, необязательно в количественном отношении). Следовательно, указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи предпочтительно содержат последовательности, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от приведенных последовательностей CDR. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи идентичны приведенным последовательностям CDR.

Приведенными последовательностями CDR являются последовательности CDR VH-области антитела 4331, которая, как показано в примерах, обладает хорошими способностями к связыванию с CLEC12A. Последовательность VH Fab-плеча 4331 также представлена на фиг. 20. В одном предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению включает последовательность VH, которая по крайней мере на 90% идентична этой VH Fab-плеча 4331. Следовательно, обеспечивается, кроме того, биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению, в котором плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, включает последовательность VH, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90%, предпочтительно по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% или даже на 100% идентична последовательности

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQK
FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGNYGDEFDYWGQGLTVTVSS.

Как показано в примерах, биспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие последовательность VH Fab-плеча 4331, вместе с последовательностью VH Fab-плеча, распознающего CD3 (и вместе с общей легкой цепью), обладают превосходной способностью индуцировать опосредуемый Т-клетками лизис CLEC12A-позитивных клеток опухоли AML.

Тем не менее, другой предпочтительный вариант осуществления относится к биспецифическому

антителу класса IgG по настоящему изобретению, в котором плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична SGYTFTGY, и последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична WINPNSGG, и последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична DGYFADAFDY. Предпочтительно, если указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи состоят из последовательности, которая идентична по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере 97%, более предпочтительно по крайней мере 98%, более предпочтительно по крайней мере 99% приведенным последовательностям CDR. Снова, как правило, допускаются отклонения 1, 2 или 3 аминокислотных остатков от приведенных последовательностей CDR при сохранении такого же типа активности связывания (по типу, необязательно в количественном отношении). Следовательно, указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи предпочтительно содержат последовательности, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от приведенных последовательностей CDR. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 тяжелой цепи идентичны приведенным последовательностям CDR.

Приведенными последовательностями CDR являются последовательности CDR в VH антитела 3918, которая, как показано в примерах, также обладает хорошими способностями к связыванию с CLEC12A. Последовательность VH антитела 3918 также представлена на фиг. 20. В одном из предпочтительных вариантов осуществления биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению включает последовательность VH, которая по крайней мере на 90% идентична этой VH антитела 3918. Следовательно, обеспечивается, кроме того, биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению, в котором плечо, которое специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, включает последовательность VH, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90%, предпочтительно по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% или даже на 100% идентична последовательности

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTGYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQK
FQGRVTMTDRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDGYFADAFDYWGQGTTLTVSS.

Как показано в примерах, биспецифические антитела по настоящему изобретению, содержащие последовательность VH Fab-плеча 3918, вместе с последовательностью VH Fab-плеча, распознающего CD3 (и вместе с общей легкой цепью), обладают превосходной способностью индуцировать опосредуемый Т-клетками лизис CLEC12A-позитивных клеток опухоли AML.

Еще один предпочтительный вариант осуществления относится к биспецифическому антителу класса IgG по настоящему изобретению, в котором второе плечо специфически распознает CD3 и включает последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности SYGMH, и последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности IIWYSGSKKNYADSVKG, и последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности GTGYNWFDP. Предпочтительно, когда указанное CD3-специфическое плечо включает последовательность VH, состоящую из последовательности

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFRSYGMHVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYADS
VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGTTLTVSS.

Приведенными последовательностями CDR и последовательностью VH являются последовательности антитела 3896. Эти последовательности также представлены на фиг. 20. Тяжелая цепь, включающая эти CD3-специфические CDR-последовательности и/или приведенную VH-последовательность Fab-плеча 3896, является предпочтительной в случае биспецифического антитела класса IgG по настоящему изобретению, поскольку эти последовательности придают биспецифическому антителу оптимальную аффинность к CD3-экспрессирующим иммунокомпетентным клеткам, при одновременном допуске достаточного связывания с CLEC12A-позитивными клетками опухоли AML. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, полагают, что общий эффект биспецифического антитела определяется совместным эффектом аффинности одного плеча к антигену 1 и аффинности другого плеча к антигену 2. В случае антитела настоящего изобретения, обладающего специфичностью в отношении CLEC12A (или его функционального эквивалента) и антигена иммунокомпетентных клеток-эффекторов (предпочтительно CD3), оптимизированная синхронизация связывания с CD3-позитивными иммунокомпетентными клетками и CLEC12A-экспрессирующими опухолевыми клетками является предпочтительной для эффективной индукции опосредуемого Т-клетками лизиса CLEC12A-позитивных опухолевых клеток. Предполагается, что баланс между аффинностями CLEC12A/CD3 биспецифического антитела имеет первостепенное значение. Считается, что значительно большая аффинность к CD3 по сравнению с гораздо меньшей аффинностью к CLEC12A (т.е. слишком большая аффинность к CD3) приведет к ситуации, когда антитела будут в основном связываться с CD3-экспрессирующими Т-клетками. Такие "нагруженные биспецифическими антителами" Т-клетки или могут поглотить свой CD3, или могут внедриться в ткани, оставляя таким образом кровотоку, прежде чем они уже столкнутся с CLEC12A-позитивными опухолевыми клетками. Это приведет к снижению терапевтического эффекта биспецифического антитела.

В случае более подходящего механизма действия, CLEC12A-позитивные опухолевые клетки сначала связываются с одним или более биспецифических антител по настоящему изобретению, причем после привлечения Т-клеток с помощью свободного CD3-специфического плеча биспецифического антитела происходит последующая активация Т-клеток. Альтернативно, CD3-позитивные Т-клетки и CLEC12A-позитивные опухолевые клетки связываются по существу одновременно с биспецифическим антителом.

Следовательно, аффинности и к CLEC12A (или его функциональному эквиваленту), и к антигену иммунокомпетентных клеток-эффекторов (CD3) предпочтительно выбирают или модулируют из условия, чтобы достигался правильный баланс, т.е., чтобы результирующие биспецифические антитела также связывались с CLEC12A и CD3 по существу одновременно, или чтобы биспецифические антитела имели тенденцию к связыванию с CLEC12A-позитивными опухолевыми клетками в достаточной степени, причем после того как происходит активация Т-клеток, опухолевые клетки лизируются. По настоящему изобретению, такой превосходный баланс между аффинностями к CD3 и CLEC12A предпочтительно достигается путем объединения VH, имеющей последовательности CDR (или всю последовательность VH) из Fab-плеча 3896 (которое является специфическим в отношении CD3), с VH, имеющей последовательности CDR (или всю последовательность VH) того или другого Fab-плеча 4327 или 4331 или 3918 или 3116 (которые являются специфическими в отношении CLEC12A). Такие результирующие биспецифические антитела демонстрируют подходящий баланс между аффинностями к CD3 и CLEC12A, так что Т-клетки и CLEC12A-позитивные клетки опухоли AML эффективно собираются вместе, и опосредуемый Т-клетками лизис CLEC12A-позитивных клеток опухоли AML оптимально индуцируется.

Как описано в настоящем описании ранее, предпочтительно обеспечивается биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению, в котором оба плеча включают вариабельный домен общей легкой цепи. Особенно предпочтительной общей легкой цепью является реаранжированная легкая цепь каппа человека IgVκ1-39*01/IgJκ1*01, также называемая 012.

Нуклеотидная и аминокислотная последовательность VL 012 также представлены на фиг. 20. Последовательности CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Биспецифическое антитело по настоящему изобретению, содержащее общую легкую цепь, которая, по крайней мере, включает последовательности CDR 012, является, следовательно, предпочтительным. Поэтому один аспект настоящего изобретения относится к биспецифическому антителу класса IgG по настоящему изобретению, в котором первое и второе плечи, кроме того, включают последовательность CDR1 легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична RASQSISSYLN, и последовательность CDR2 легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична AAS-SLQS, и последовательность CDR3 легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична QQSYSTPPT. Предпочтительно, когда указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи состоят из последовательности, которая по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% идентична приведенным последовательностям CDR. Снова, как правило, допускаются отклонения 1, 2 или 3 аминокислотных остатков от приведенных последовательностей CDR. Следовательно, указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи предпочтительно содержат последовательности, которые отличаются не более чем тремя, предпочтительно не более чем двумя, более предпочтительно не более чем одной аминокислотой от приведенных последовательностей CDR. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанные последовательности CDR 1, 2 и 3 легкой цепи идентичны приведенным последовательностям CDR. В одном предпочтительном варианте осуществления биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению включает последовательность VL, которая по крайней мере на 90% идентична VL-цепи 012. Следовательно, кроме того, обеспечивается биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению, в котором первое и второе плечо включают последовательность VL, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90%, предпочтительно по крайней мере на 95%, более предпочтительно по крайней мере на 97%, более предпочтительно по крайней мере на 98%, более предпочтительно по крайней мере на 99% или даже на 100%, идентична последовательности

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK.

Термин "% идентичности с" определяется в настоящем описании как процент остатков в аминокислотной последовательности-кандидате, которые совпадают с остатками в контрольной последовательности после совмещения двух последовательностей и введения пропусков, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности. Методы и компьютерные программы для совмещения хорошо известны в данной области техники. Одной компьютерной программой, которая может быть использована или приспособлена для целей определения, попадает ли последовательность-кандидат в это определение, является "Align 2", автором которой является Genentech, Inc., которая была подана вместе с документацией пользователя в Ведомство по охране авторских прав в Соединенных Штатах, Washington, DC 20559, 10 декабря 1991.

Биспецифическое полноразмерное антитело класса IgG по настоящему изобретению по определению имеет два различных антигенсвязывающих сайта, но Fc-область IgG также включает третий сайт

связывания с Fc-рецептором. Если клетка имеет как Fc-рецептор, так и одну из мишеней биспецифического антитела, может происходить сшивание Fc-рецептора и указанной мишени на поверхности указанной клетки, которое может приводить к нежелательным эффектам. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к биспецифическому полноразмерному антителу класса IgG по настоящему изобретению, причем указанное биспецифическое антитело класса IgG имеет мутированные нижнюю часть шарнирной области и/или CH2-домен, так что взаимодействие указанного биспецифического антитела класса IgG с Fc-гамма (Fcγ)-рецепторами значительно уменьшается. Как в настоящем описании используется, выражение "так что взаимодействие указанного биспецифического антитела класса IgG с Fc-гамма-рецепторами значительно уменьшается" означает, что уменьшается способность указанного биспецифического антитела класса IgG к взаимодействию с Fc-гамма-рецепторами, если такие Fc-гамма-рецепторы присутствуют вблизи указанного антитела. Таким образом, по настоящему изобретению область антитела, предпочтительно нижнюю часть шарнирной области и/или CH2-домен антитела, мутируют (как правило, путем экспрессии мутированной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей его), в результате чего способность к взаимодействию с Fc-рецептором уменьшается. Предпочтительно, если взаимодействие с Fc-рецептором по существу прекращается. Аминокислотные остатки в IgG1 человека, которые участвуют в связывании с Fcγ-рецепторами, были картированы ранее. В дополнение к остаткам, которые после изменения увеличивали связывание только со специфическими рецепторами или одновременно увеличивали связывание с одним типом рецептора и уменьшали связывание с другим типом, было обнаружено несколько остатков, которые аннулировали связывание с одним или более из рецепторов (Shields RL et al. JBC 2001 (276) 6591-6604; Armour et al. Mol. Immunol 2003 (40) 585-593). В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления указанные мутированные нижняя часть шарнирной области и/или CH2-домен содержат по крайней мере одну замену в положениях аминокислот 235 и/или 236 (нумерация согласно Kabat). Предпочтительно, когда аминокислоты в обоих положениях 235 и 236 замещены. В примерах показано, что замены в этих сайтах могут по существу предотвратить взаимодействие между биспецифическим антителом и Fc-рецептором, присутствующим на опухолевых клетках. В частности, показано, что замены L235G и/или G236R очень подходят для этой цели. Следовательно, в настоящем описании также обеспечивается биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению, в котором указанные мутированные CH2-домен и/или нижняя часть шарнирной области содержат замену L235G и/или G236R. Предпочтительно, когда как L235G, так и G236R замещены. Альтернативно, квалифицированный в данной области техники специалист может ввести мутации в нижнюю часть шарнирной области и/или CH2-домен, которые включают замены 234F, 235E и/или 331S (Oganessian et al. Biol. Crystall. 2008 (D64) 700). Предпочтительно, когда все три замены введены в случае этой альтернативы.

В предварительной заявке на патент США 61/635935, поданной авторами настоящего изобретения, за которой последовала обыкновенная заявка на патент США с № 13/866747 и РСТ-заявка с № РСТ/NL2013/050294 (которые включены сюда посредством ссылки), раскрыты способы и средства для продуцирования биспецифических антител, исходя из одной клетки, в результате чего предусмотрены средства, которые способствуют образованию биспецифических антител вместо образования моноспецифических антител. Эти способы также могут быть эффективно использованы в настоящем изобретении. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения биспецифического полноразмерного антитела класса IgG в соответствии с изобретением, исходя из одной клетки, причем указанное биспецифическое полноразмерное антитело класса IgG включает два CH3-домена, которые способны состыковаться, причем указанный способ включает доставку в указанную клетку а) первой молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей включающую первый CH3-домен полипептидную цепь, б) второй молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей включающую второй CH3-домен полипептидную цепь, причем указанные молекулы нуклеиновых кислот снабжены средствами для преимущественного спаривания указанных включающих первый и второй CH3-домены полипептидов, при этом указанный способ, кроме того, включает стадию культивирования указанной клетки-хозяина и позволяет экспрессировать указанные две молекулы нуклеиновых кислот и получить указанное биспецифическое полноразмерное антитело класса IgG из культуры. Указанные первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот могут быть частью одного и того же вектора или средства доставки гена и могут быть интегрированы в один и тот же сайт генома клетки-хозяина. Альтернативно, указанные первая и вторая молекулы нуклеиновых кислот доставляются по отдельности в указанную клетку.

Предпочтительный вариант осуществления предусматривает способ продуцирования полноразмерного биспецифического антитела класса IgG по настоящему изобретению, исходя из одной клетки, причем указанное биспецифическое антитело класса IgG включает два CH3-домена, которые способны состыковываться, при этом указанный способ включает обеспечение: - клетки, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь IgG, которая специфически распознает CLEC12A и которая содержит первый CH3-домен, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь IgG, которая специфически распознает антиген иммуннокомпетентных клеток-эффекторов, предпочтительно CD3, и которая содержит второй CH3-домен, причем ука-

занные последовательности нуклеиновых кислот снабжены средствами для преимущественного спаривания указанных первого и второго СНЗ-доменов, при этом указанный способ, кроме того, включает стадию культивирования указанной клетки и позволяет экспрессировать указанные две последовательности нуклеиновых кислот и получить указанное биспецифическое антитело класса IgG из культуры. В особенно предпочтительном варианте осуществления указанная клетка также содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую общую легкую цепь. Предпочтительной общей легкой цепью является 012, предпочтительно реаранжированная легкая цепь каппа зародышевой линии человека IgV κ 1-39*01/IgJ κ 1*01, как описано выше. Предпочтительными мутациями для продуцирования по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация согласно Kabat) в первом СНЗ-доме и аминокислотные замены L351D и L368E во втором СНЗ-доме, или наоборот. Следовательно, обеспечивается, кроме того, способ по настоящему изобретению для продуцирования биспецифического антитела подкласса IgG1, причем указанный первый СНЗ-дом включает аминокислотные замены L351K и T366K (нумерация согласно Kabat), и причем указанный второй СНЗ-дом включает аминокислотные замены L351D и L368E, при этом указанный способ, кроме того, включает стадию культивирования указанной клетки и допуска экспрессии указанных последовательностей нуклеиновых кислот и получение указанного биспецифического антитела из культуры. Также обеспечивается способ по настоящему изобретению для продуцирования биспецифического антитела подкласса IgG1, причем указанный первый СНЗ-дом включает аминокислотные замены L351D и L368E (нумерация согласно Kabat), и причем указанный второй СНЗ-дом включает аминокислотные замены L351R и T366K, при этом указанный способ, кроме того, включает стадию культивирования указанной клетки и допуска экспрессии указанных последовательностей нуклеиновых кислот и получение указанного биспецифического антитела из культуры. Антитела, которые могут быть продуцированы с помощью этих методов, также являются частью настоящего изобретения.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к фармацевтической композиции, содержащей биспецифическое антитело класса IgG по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Как в настоящем описании используется, такой "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и всякие растворители, соли, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, агенты для придания изотоничности и задерживающие всасывание агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. В зависимости от пути введения (например, внутривенно, подкожно, внутрисуставно и т.п.) активное соединение может быть заключено в материал оболочки для защиты соединения от действия кислот и других природных условий, которые могут инактивировать соединение.

Антитела и фармацевтические композиции по настоящему изобретению находят свое применение при лечении различных лейкозов и предлейкозных заболеваний миелоидного происхождения, а также В-клеточных лимфом. Болезни, лечение которых можно осуществлять по настоящему изобретению, включают миелоидные лейкозы или предлейкозные заболевания, такие как AML, MDS и CML и лимфомы Ходжкина и большинство неходжкинских лимфом. Таким образом, настоящее изобретение относится к биспецифическому полноразмерному антителу класса IgG по настоящему изобретению для применения в качестве фармацевтического средства для лечения миелодиспластического синдрома (MDS), хронического миелолейкоза (CML) или предпочтительно острого миелоидного лейкоза (AML). Также обеспечивается применение биспецифического антитела класса IgG по настоящему изобретению для приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики миелодиспластического синдрома (MDS), хронического миелолейкоза (CML) или предпочтительно острого миелоидного лейкоза (AML).

Количество антитела по настоящему изобретению, вводимое пациенту, находится, как правило, в терапевтическом окне, что означает, что используется количество, достаточное для получения терапевтического эффекта, при этом количество не превышает пороговое значение, приводящее к неприемлемой степени побочных эффектов. Чем меньше количество антитела, необходимое для получения желаемого терапевтического эффекта, тем больше будет обычно терапевтическое окно. Следовательно, предпочтительным является антитело по настоящему изобретению, оказывающее достаточные терапевтические эффекты в низкой дозе.

У приблизительно 30000 пациентов ежегодно диагностируется острый миелоидный лейкоз (AML) в Европе и США. Большинство этих пациентов в возрасте 60 лет и старше. Пожилой возраст является основным отрицательным фактором, определяющим исход AML, и длительное (в течение 5 лет) выживание подвергнутых интенсивному лечению пациентов пожилого возраста с AML отмечается у приблизительно 10%. У почти всех пациентов, которые достигли ремиссии после индукционной химиотерапии, прогрессирование заболевания отмечается в пределах 3 лет. Современное лечение после ремиссии показало ограниченную, если таковая имеется, полезность у пожилых пациентов с AML. Таким образом, остается значительная масса остающегося устойчивого лейкоза, и выживающая субпопуляция устойчивых к лекарственному средству лейкозных клеток быстро порождает рецидив. Новые типы лекарственных средств с совершенно разными механизмами действия необходимы для воздействия на эти не отвечающие на химиотерапию клетки опухоли AML в попытках индуцировать и поддержать полные ремиссии. Хотя полная ремиссия (CR) может быть достигнута с помощью ряда комбинаций интенсивных химиотерапии у более чем 50%

пожилых пациентов с AML и приблизительно 80% более молодых пациентов, успехи ответной реакции или выживание оставались основной исследовательской проблемой. В недавно опубликованном сетевом мета-анализе 65 рандомизированных клинических испытаний (15110 пациентов) на пожилых пациентах с AML большинство измененных исследовательских схем индукции имеют схожие или даже ухудшенные профили эффективности по сравнению с обычной схемой индукции 3+7 с использованием даунорубицина и цитарабина. Это стандартное лечение AML связано с высоким уровнем распространенности болезни и даже смертности. Большинство пациентов в CR переносят рецидив из-за лейкозных стволовых клеток, остающихся после химиотерапии. Дальнейшее усиление дозы ограничено из-за неприемлемой токсичности. Таким образом, особенно в случае пожилых пациентов с AML, появляется насущная необходимость в новых методах лечения предпочтительно с меньшей токсичностью.

Лечение не отвечающих на химиотерапию AML могло быть достигнуто в результате привлечения Т-клетки собственной иммунной системы пациента и клеток опухоли AML, используя биспецифическое антитело. Таким образом, иммунная система пациентов усиливается и перенацеливается на атаку и уничтожение клеток опухоли AML. Настоящим изобретением обеспечиваются CD3xCLEC12A биспецифические антитела класса IgG, которые эффективно индуцируют лизис клеток опухоли AML. CD3xCLEC12A биспецифические антитела, таким образом, представляют собой целенаправленную терапию с меньшим количеством побочных эффектов, которые специфически уничтожают лейкозные стволовые клетки, для улучшения прогноза для пациентов с AML. Поскольку CLEC12A экспрессируется в лейкозных стволовых клетках (LSC), но не в нормальных гемопоэтических стволовых клетках, терапия, направленная против этого антигена, (как было показано *in vitro*) будет искоренять LSC, резервируя нормальные стволовые клетки. Это, скорее всего, будет иметь наибольший эффект в случае минимальной остаточной болезни (MRD). Существует вероятность, что процент рецидива снизится из-за ликвидации MRD. Таким образом, эффектом на пациента с AML этого нового метода лечения будет менее токсичное лечение с меньшим процентом рецидивов, что приведет к улучшению результата, связанного с лучшим качеством жизни. Эти полноразмерные биспецифические антитела класса IgG проходят клинические испытания на пациентах с рецидивирующим AML. Клиническую эффективность анализируют, используя уменьшение AML бластных клеток в костном мозге в качестве объективного критерия ответа. Эффективный биспецифический IgG для AML обеспечивает новый терапевтический вариант для большей части пациентов, для которых в настоящее время нет в наличии какого-либо лечения. В дополнение к предоставлению средства для достижения длительных ремиссий, этот вариант лечения также обладает лечебным потенциалом в случае AML при применении в период ремиссии.

Примеры

Пример 1. Создание и функциональные характеристики CD3xCLEC12 биспецифического IgG1-кандидата.

Для проверки концепции нацеливания иммуннокомпетентной клетки-эффектора на аномальную клетку с помощью биспецифического полноразмерного IgG был создан CD3xCLEC12A биспецифический IgG1-кандидат, в случае которого CD3- и CLEC12A-специфические Fab-плечи происходили от ранее описанных антител. В CD3-специфическом Fab-плече использовалась VH-область из антитела против CD3 15C3, одного из CD3-специфических антител, описанных в WO2005/118635, и эту VH называют "3056". В CLEC12A-специфическом Fab-плече использовалась VH-область из scFv SC02-357, одного из CLEC12A-специфических антител, описанных в WO2005/000894, (в дальнейшем называемом CLEC12A-специфическим эталонным [Fab-плечом или антителом]); альтернативно, эту VH называют "3116"). Нуклеотидная и аминокислотная последовательности VH CD3-специфического плеча (3056), а также нуклеотидная и аминокислотная последовательность VH CLEC12A-специфического плеча (3116) этой молекулы-кандидата, которая упоминается как кандидат 3056x3116, приведены в фиг. 20. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности общей VL (huVκ1-39; 012), также приведены на фиг. 20.

Соответствующие VH-области клонировали в экспрессионные векторы, используя способы, известные в данной области техники для продукции биспецифического IgG1 (Gunasekaran et al. JBC 2010 (285) 19637-19646; WO2009/089004), в сочетании с реаранжированной легкой цепью человека IGKV1-39/IGKJ1 (huVκ1-39). HuVκ1-39, как ранее было установлено, способна спариваться с более чем одной тяжелой цепью, таким образом приводя к антителам с различными специфичностями, что облегчает создание биспецифических молекул (De Wildt RM et al., J. Mol. Biol. 1999 (285) 895-901; De Kruif et al. J. Mol Biol 2009 (387) 548-58; WO2009/157771).

Во-первых, связывание 3056x3116 CD3xCLEC12A биспецифического IgG1-кандидата с CD3ε на клетках НРВ-ALL было продемонстрировано с помощью проточной цитометрии, которую выполняли в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники (табл. 1). Связывание с представленным на клетках CD3ε подтверждают, используя клетки CHO, трансфицированные CD3δ/ε или CD3γ/ε. Связывание 3056x3116 биспецифического IgG1-кандидата с CLEC12A определяли, используя клетки CHO, трансфицированные конструкцией для экспрессии CLEC12A; моноспецифическое антитело против CD3 (3056x3056) и моноспецифическое антитело против CLEC12A (3116x3116), а также нерелевантное контрольное мАт изотипа IgG1 были взяты в качестве контроля.

Таблица 1. Связывание с представленными на клетках CD3 и CLEC12A в соответствии с проточной цитометрией

IgG	Клетки HPB-ALL*	Клетки СНО, трансфицированные CLEC12A*
3056x3116 CD3xCLEC12A- кандидат	6216	5299
CD3	6899	282
CLEC12A	199	4147
Подобранный по изотипу контроль	34	289

*результаты представлены в виде средней интенсивности флуоресценции.

Определения аффинности 3056x3116 биспецифического IgG1-кандидата к CD3 δ / ϵ и экстраклеточному домену CLEC12A осуществляют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore). Вкратце, очищенные рекомбинантные антигены ковалентно связывают с поверхностью сенсорного чипа CM5, используя химическую реакцию со свободными аминами: антигены разбавляют в KAc буфере до 10 мкг/мл и связывают с поверхностью, которую активируют с помощью NHS/EDC (в соответствии с рекомендациями производителя). Для определения аффинностей Fab-плеч, присутствующих в биспецифических антителах, их последовательно разводят до 100, 50, 20, 10, 1 и 0,1 нМ в забуференном HEPES солевом растворе (HBS) и пропускают по поверхности со связанным антигеном сенсорного чипа CM5 с высокой (30 мкл/мин) скоростью потока (для предотвращения повторного связывания). Проточную кювету 1 (FC1) используют в качестве контрольной поверхности, и ответы (граммы на сенсоре), полученные в результате на этой поверхности, вычитают из ответов, определенных в других проточных кюветах (FC). FC2 и FC3 используют для двух различных антигенов, распознаваемых биспецифическим антителом, чтобы иметь возможность измерить аффинности обоих Fab-плеч в одном кинетическом анализе на всех трех поверхностях. Поскольку концентрация антитела не изменяется значительно при протекании по поверхности со связанным антигеном, скорости ассоциации (которые зависят от концентрации) биспецифических антител определяют одновременно для двух различных антигенов, которые они распознают. Таким образом получают сенсограммы для фаз ассоциации и диссоциации различных биспецифических белков. Используя программное обеспечение для оценки BIA и построение кривой с использованием модели 1:1 взаимодействия (для одновалентного взаимодействия), определяют аффинности Fab-плеч. В случае если связывание биспецифического белка с покрытой антигеном поверхностью сенсорного чипа ослабляется (т.е., когда очень маленькое количество белка связывается, что приводит к низким ответам и/или очень быстрым скоростям диссоциации), постановку эксперимента изменяют на противоположную: биспецифическое антитело ковалентно связывают с поверхностью сенсорного чипа, используя химическую реакцию со свободными аминами, и рекомбинантный очищенный антиген пропускают по поверхности с высокой (30 мкл/мин) скоростью потока для измерения аффинности Fab-плеча, направленного против этого антигена.

Затем проверяли функциональные возможности 3056x3116 CD3xCLEC12A биспецифического Ig-кандидата. Во-первых, исследовали способность к стимуляции Т-клеток с использованием покоящихся Т-клеток здорового донора. Вкратце, периферическую кровь получали от здоровых доноров после информированного согласия. Т-клетки выделяли с помощью стандартного выделения с использованием градиента плотности для обогащения в отношении мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), с последующей негативной селекцией, используя магнитные шарики (набор для выделения Rap Т-клеток, каталожный номер Miltenyi Biotec, 130-091-155). Используя эту стратегию очистки, Т-клетки были так называемыми "нетронутыми" (т.е. не окрашиваемыми антителами, так называемыми "покоящимися Т-клетками") для ограничения возможности предварительной активации. Очищенные покоящиеся Т-клетки впоследствии инкубировали с клетками линии клеток HL60 лейкозного происхождения в 10% фетальной телячьей сыворотке (FBS) или 10% нормальной человеческой сыворотке (HS) при соотношении эффектор:клетка-мишень=10:1 в течение двух дней. Результаты представляли в виде процента CD69-позитивных или CD25-позитивных клеток в популяции CD4-позитивных или CD8-позитивных Т-клеток.

Как двухвалентный IgG против CD3, так и CD3xCLEC12A биспецифический IgG эффективно вызывал увеличение количества маркеров активации Т-клеток CD69 и CD25 на CD4-позитивных и CD8-позитивных Т-клетках (фиг. 2). В присутствии FBS, которая не блокировала Fc-рецепторы, присутствующие на клетках HL60 (Liesveld et al. 1988, J. Immunol. 140 (5), pages 1527-1533), также контрольная биспецифическая молекула - CD3Xконтроль изотипа IgG, как было установлено, вызывала активацию Т-клеток. Этот эффект был уменьшенным в присутствии HS, предполагая, что отмечаемая активация Т-

клеток в результате одновалентного связывания с CD3 CD3Xконтроль изотипа IgG зависела от сшивки с Fc. Однако активации Т-клеток, вызванная 3056x3116 CD3xCLEC12A биспецифическим IgG-кандидатом, лишь частично зависела от Fc-взаимодействий, поскольку потенциальная возможность увеличения CD69 и CD25 почти совершенно сохранялась в присутствии HS (фиг. 2). Это указывало на то, что внутренняя сила одновалентного связывания с CD3 была достаточной для активации Т-клеток, когда связывающая молекула связывалась с антигеном CLEC12A на клетках-мишенях HL60 после связывания с другим Fab-плечом.

Для исследования, является ли степень активации Т-клеток с помощью 3056x3116 CD3XCLEC12A биспецифического IgG-кандидата достаточной для индукции лизиса клеток-мишеней, клетки HL60 в этом анализе метили сукцинимидным эфиром диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE) и сокультивировали с Т-клетками при различных соотношениях эффектор:клетка-мишень. Спустя один, два или три дня количество оставшихся в живых CFSE-позитивных клеток HL60 определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты представляли в виде процента специфического лизиса, отнесенного к PBS.

Как и ожидалось, CD3-моноспецифический двухвалентный IgG индуцировал опосредуемое Т-клетками уничтожение клеток HL60 (фиг. 3). Удивительно, но CD3XCLEC12A биспецифический одновалентный IgG и CD3Xконтроль изотипа IgG также индуцировали опосредуемое покоящимися Т-клетками уничтожение клеток HL60. Эти эффекты были наиболее заметными, когда анализ выполняли в отсутствие избыточного количества IgG человека, т.е., когда Fc-рецепторы на клетках-мишенях HL60 не были заблокированы (условие использования FBS; фиг. 3). Удивительно, но даже в присутствии избыточного количества IgG человека (условие использования 10% HS) CD3XCLEC12A биспецифический IgG был очень эффективным в уничтожении клеток HL60, что означает, что индукция лизиса HL60 не зависит от взаимодействий с Fcγ-рецепторами. На 3-й день также отмечался лизис HL60, индуцированный с помощью CD3Xконтроль изотипа IgG, вероятно, из-за неполной блокировки Fc-гамма-рецепторов после длительных периодов инкубации. Уничтожение клеток-мишеней HL60 менялось при использовании различных соотношений эффектор:клетка-мишень (фиг. 4).

В заключение, этот пример показывает, что CD3xCLEC12A биспецифическая молекула является мощным индуктором опосредуемого Т-клетками лизиса опухолевых клеток, и подтверждает выдвинутую авторами настоящего изобретения гипотезу, что привлечение Т-клеток к эффективному уничтожению аномальных клеток может опосредоваться CD3xCLEC12A биспецифическим полноразмерным антителом подкласса IgG1. Неожиданно оказалось, что активность, индуцированная с помощью CD3XCLEC12A биспецифического IgG, не зависит от взаимодействий с Fcγ-рецепторами. Для расширения панели CD3XCLEC12A биспецифических полноразмерных IgG для того, чтобы прийти к конечному клиническому кандидату, были созданы панели CD3-специфических Fab-плеч и CLEC12A-специфических Fab-плеч. Оценку специфичности и функциональности CD3-специфических и CLEC12A-специфических Fab-плеч осуществляют без изменения другого плеча, используя соответствующий Fab из 3056x3116 CD3XCLEC12A биспецифического IgG-кандидата, как показано в данном примере.

Пример 2. Создание и характеристика CD3-специфических Fab-плеч для CD3xCLEC12 bsAb.

Пример 1 показал, что CD3xCLEC12A биспецифические молекулы могут быть сильными индукторами опосредуемого Т-клетками лизиса опухолевых клеток. По этой причине для создания более широких панелей таких биспецифических молекул были созданы отдельные панели CD3-связующих молекул, а также CLEC12A-связующих молекул.

Для создания панели CD3-связующих молекул, CD3ε-специфические VH-области создают путем иммунизации мышей, трансгенных по легкой цепи huVκ1-39 (WO2009/157771) и минилокусу тяжелой цепи (HC) человека, CD3ε в различных форматах: (1) выделенным CD3δ/ε или CD3γ/ε, который может быть слит или связан с молекулой носителя (такой как Fc IgG человека или His-метка), как известно в данной области техники, с или без использования адъюванта, (2) клетками, экспрессирующими CD3δ/ε или CD3γ/ε, или (3) ДНК-конструкцией, кодирующей CD3δ/ε или CD3γ/ε, или комбинацией этих стратегий. От иммунизированных мышей, демонстрирующих достаточный титр антиген-специфических антител, как определено с помощью ELISA и/или проточной цитометрии, получают селезенки и/или лимфатические узлы, на основе которых создают библиотеки Fab в фагах. Альтернативно, последовательности VH-областей получают непосредственно из материала селезенки и лимфатических узлов с помощью глубокого секвенирования (находящаяся в процессе одновременного рассмотрения предварительная заявка на патент США с № 61/539116).

Антиген-специфические Fab-плечи отбирают из фаговых библиотек, происходящих от иммунизированных мышей, или из синтетических библиотек фагового дисплея, которые содержат VL-область легкой цепи huVκ1-39 и набор VH-областей человека. Для создания синтетических библиотек рандомизированные праймеры для CDR3 использовали, как описано в De Kruif et al. 1995, J Mol Biol 248 (1), pages 97-105. Бактериофаги из этих библиотек отбирают в течение нескольких циклов в отношении связывания с выделенным белком CD3δ/ε, который может быть связан с молекулой носителя (смотрите выше) или с клетками, экспрессирующими CD3ε, такими как HPB-ALL, или клетками, трансфицированными для экспрессии CD3δ/ε или CD3γ/ε, или комбинацией этих стратегий. Не связывающиеся фаги удаляют, а свя-

зываются фаги элюируют с использованием кислого буфера или, с целью ориентации репертуара отбираемых Fab на желаемую специфичность, с использованием антител против конкретного эпитопа, например с использованием антител, которые обладают перекрестной реактивностью с CD3ε яванского макака. Эти фаги затем трансфицируют в компетентные бактерии, которые выращивали под давлением отбора в отношении содержащих фаги бактерий. После отбора ряд остающихся в живых бактериальных колоний, фаги высвобождают и подвергают следующему циклу отбора.

После завершения отбора, остальные фаги подвергают скринингу на связывание с представленным на клетках антигеном с помощью проточной цитометрии и с выделенным антигеном с помощью ELISA. В качестве положительного контроля для связывания используют эталонные антитела против CD3, такие как те, которые известны в данной области техники, например ОКТ-3. Нуклеотидный материал из практически всех фагов, которые продемонстрировали специфическое связывание с антиген-экспрессирующими клетками, подвергают ПЦР колоний для амплификации VH-областей и ПЦР с секвенированием для определения последовательности VH-области. Полученные последовательности группируют на основе уникальности их HCDR3. В случае последовательностей, происходящих от иммунизированных мышей, в которых может возникнуть (ограниченная) соматическая гипермутация, последовательности VH далее группируют на основе вероятности уникального VDJ (т.е., если HCDR3 в различных кластерах содержат разницу в <2 аминокислоты, они считаются частью одного и того же кластера и группируются вместе). Из каждого кластера отбирают одну или несколько VH-областей на кластер для клонирования в векторы для экспрессии в формате двухвалентного моноспецифического IgG в сочетании с легкой цепью huVκ1-39. VH-области, для которой специфическое связывание с выделенным антигеном и представленным на клетках антигеном подтверждено, впоследствии клонируют в векторы для экспрессии в CD3xCLEC12A биспецифическом формате. Затем определяют их характеристики для отбора кандидата с терапевтическим потенциалом (смотрите следующие примеры).

Пример 3. Создание и характеристика CLEC12-специфических Fab-плеч для CD3xCLEC12 bsAb.

Поскольку было показано в примере 1, что CD3xCLEC12A биспецифические молекулы обладают способностью к индукции опосредуемого Т-клетками лизиса опухолевых клеток, авторы настоящего изобретения затем пожелали установить более широкие панели таких биспецифических молекул. В дополнение к панели CD3-связующих молекул, описанных в примере 2, авторы настоящего изобретения также создали панель CLEC12A-связующих веществ.

Вкратце, CLEC12A-специфические Fab-плечи отбирали из синтетических библиотек фагового дисплея Fab, которые содержали реаранжированную VL-область человека IGKV1-39/IGKJ1 и набор VH-областей человека (De Kruif et al. *Biotechnol Bioeng.* 2010 (106) 741-50). Бактериофаги из этих банков отбирали в течение двух циклов в отношении связывания с CLEC12A. Это было сделано путем инкубации с экстраклеточным доменом CLEC12A (аминокислотами 75-275), соединенным с His-меткой (Sino Biological, каталожный номер 11896-H07H), который был нанесен слоем на поверхность. Не связывающиеся фаги удаляли, связывающиеся фаги химически элюировали и использовали для инфицирования бактерий, которые выращивали под давлением отбора в отношении содержащих фаги бактерий. После выбора ряда остающихся в живых бактериальных колоний фаги высвобождали и подвергали следующему циклу отбора и размножения.

После завершения отбора остальные фаги подвергали скринингу на связывание с CLEC12A, представленным на линии клеток опухоли HL60, с помощью проточной цитометрии. В качестве положительного контроля для связывания использовали эталонное антитело против CLEC12A. Нуклеотидный материал из практически всех фагов, которые продемонстрировали специфическое связывание с CLEC12A-экспрессирующими клетками, подвергали ПЦР колоний для амплификации VH-областей и ПЦР с секвенированием для определения последовательности VH-области. Полученные последовательности группировали на основе уникальности их HCDR3. VH-области из каждого уникального кластера HCDR3 клонировали в векторы для экспрессии в формате моноспецифического или биспецифического IgG в сочетании с реаранжированной LC человека IGKV1-39/IGKJ1.

Три отобранные CLEC12A-связывающие молекулы с уникальной последовательностью HCDR3 продемонстрировали желаемый профиль в формате IgG, который имел следующие характеристики (табл. 2 и не представленные данные).

Специфическое связывание с выделенным экстраклеточным доменом CLEC12A.

Специфическое связывание CLEC12A, экспрессируемым в линии опухолевых клеток.

Подтверждение специфического для миелоидной линии профиля экспрессии в PBMC человека.

Таблица 2. Характеристика CLEC12A-специфических Fab-плеч

	Длина CDR3	Связывание с нанесенным слоем CLEC12A*	Связывание с CLEC12A- экспрессирующими клетками**	Конкуренция за эпитоп с эталонным Fab против CLEC12A***
Эталонный Fab	9	1,422	1467	–
против CLEC12A				
	10	1,253	899	Да
	9	1,307	1559	Нет
	9	1,328	1106	Да

* проверено в ELISA, экстраклеточный домен CLEC12A (Sino Biological), нанесенный слоем в концентрации=2 мкг/мл, результаты приведены в виде оптической плотности (подобранный по изотипу контроль в качестве фонового сигнала: 0,127).

** проверено с помощью проточной цитометрии на клетках HL60 с использованием оптимизированной концентрации IgG, результаты приведены в виде средней интенсивности флуоресценции (подобранный по изотипу контроль в качестве фонового сигнала: 116).

*** проверено в ELISA в формате Fab, по сравнению с эталонным IgG в концентрации=20 мкг/мл.

Пример 4. Выбор функционального CLEC12-специфического Fab-плеча для CD3xCLEC12 bsAb.

Отобранные CLEC12A-специфические Fab-плечи, как описано в примере 3, были впоследствии экспрессированы в формате биспецифического IgG с новым CD3-специфическим Fab-плечом в качестве неизменного плеча. В этом новом CD3-специфическом Fab-плече, называемом "направленным против CD3 IgG3896" или кратко "3896", также используется легкая цепь huVκ1-39. Нуклеотидная и аминокислотная последовательности этой CD3-специфической VH-кандидата 3896 представлены на фиг. 20. Следовательно, были экспрессированы различные CD3XCLEC12A биспецифические молекулы, все из которых имели одно и то же направленное против CD3 плечо 3896, но которые отличались CLEC12A-специфическим плечом (содержали или направленное против CLEC12A эталонное плечо, или какое-либо одно из CLEC12A-специфических Fab-плеч-кандидатов 4327, 4331 или 3918). Эти CD3XCLEC12A биспецифические молекулы затем функционально проверяли в анализе лизиса клеток-мишеней, как описано в примере 1. Результаты представляли в виде процента специфического лизиса, отнесенного к подобранному по изотипу контролю. Все CLEC12A-специфические Fab-плечи-кандидаты продемонстрировали зависимый от дозы специфический лизис клеток-мишеней HL60 в биспецифическом формате, с кинетикой, которая была схожей со случаем, когда использовалось CLEC12A-специфическое эталонное Fab-плечо, или лучше него (фиг. 5).

Также CD3хконтроль изотипа bsAb продемонстрировало зависимый от дозы лизис клеток-мишеней, хотя более высокие логарифмы концентраций были необходимы для вызова той же степени специфического лизиса. Несмотря на присутствие избыточного количества IgG человека через добавление HS, активность уничтожения этого одновалентного CD3-специфического IgG была все еще видимой, вероятно, в результате Fc-опосредованного сшивания. Как будет видно из примера 7, этот неспецифический лизис мишени может быть, в самом деле, полностью отменен с помощью подавления взаимодействия с Fc-рецептором путем инженерии CH2.

Пример 5. Эффективность CD3xCLEC12 продуктов-кандидатов, используя AML Т-клетки и/или AML опухолевые клетки.

Примеры 1 и 4 продемонстрировали способность CD3XCLEC12A биспецифического IgG, в котором используется или CD3-специфическое Fab-плечо 3056 или 3896 и в котором используются CLEC12A-специфические Fab-плечи - кандидаты 4327, 4331 или 3918 или CLEC12A-специфическое эталонное Fab-плечо 3116, к индукции лизиса клеток-мишеней HL60, опосредуемого покоящимися Т-клетками здорового донора. В данном примере исследуется, могут ли Т-клетки, полученные от пациентов с AML, одного из основных показаний для терапевтического применения CD3XCLEC12A биспецифического лекарственного препарата, быть простимулированы для уничтожения опухолей-мишеней после стимуляции CD3XCLEC12A биспецифическим полноразмерным IgG. Затем определяется, могут ли Т-клетки, полученные от пациентов, уничтожать аутологичные AML опухолевые бластные клетки после стимуляции CD3XCLEC12A биспецифическим полноразмерным IgG.

Т-клетки выделяют из периферической крови пациентов с AML в соответствии с процедурами, описанными в примере 1. Очищенные, полученные от пациентов Т-клетки затем инкубируют с CFSE-меченными клетками HL60 и контролируют в отношении лизиса клеток, как описано в примере 1.

Кроме того, анализ опосредуемого Т-клетками лизиса клеток-мишеней выполняют с использованием AML опухолевых бластных клеток, выделенных из того же пациента (Norde et al. Blood 2009 (113) 2312). Выделенные бластные клетки затем метят CFSE и сокультивируют с аутологичными, полученными от пациентов Т-клетками в присутствии смеси цитокинов, как описано в Norde et al. и в присутствии CD3XCLEC12A биспецифического IgG или контролей. Лизис клеток-мишеней контролируется, как описано в примере 1.

Пример 6. Выброс цитокинов Т-клетками после контактирования с CD3XCLEC12A биспецифическим IgG.

Используя стимулирующие Т-клетки биологические препараты, суперстимуляция Т-клеток представляет собой серьезную опасность, поскольку она может привести к синдрому выброса цитокинов (Suntharalingam et al. 2006, New England J Med 355 (10), pages 1018-1028; Chatenoud et al. 1990, Transplantation 49(4), pages 697-702). Для исследования степени стимуляции Т-клеток, индуцированной CD3XCLEC12A биспецифическим IgG, индукцию выброса цитокинов Т-клетками исследовали в сокультуре Т-клеток и экспрессирующих Fc-рецептор клеток-мишеней.

Вкратце, покоящиеся Т-клетки здорового донора сокультивировали с клетками-мишенями HL60 в присутствии 3056x3116 CD3XCLEC12A биспецифического IgG-кандидата (1 мг/мл) или контрольного IgG, как описано в примере 1. Спустя два дня супернатант отбирали, и уровни продукции цитокинов определяли в анализе Luminex, как известно в данной области техники, используя панель 10-Plex цитокинов человека (Invitrogen, каталожный номер LHC0001). Эта панель охватывает десять основных цитокинов Th1 и Th2.

Как и ожидалось, CD3-моноспецифический двухвалентный IgG индуцировал сильную продукцию IFN γ , TNF α и IL-2 (табл. 3), которые, как полагают, в основном порождают синдром выброса цитокинов. Кроме того, продукция IL-4, IL-6, IL-8 и IL-10 была увеличенной при инкубации с CD3-специфическим IgG. В противоположность этому, только CD3XCLEC12A биспецифический IgG индуцировал продукцию IL-8 на том же уровне, что и CD3-специфический IgG; другие цитокины не были значительно индуцированы с помощью биспецифического IgG. GM-CSF был ниже предела обнаружения в любых условиях.

Таблица 3. Индуцированный антителами выброс цитокинов Т-клетками

Цитокин	CD3 IgG	CD3XCLEC12A IgG	CD3Xконтроль изотипа
IFN γ	484,3 $\pm$ 155,0	13,5 $\pm$ 19,1	0,0 $\pm$ 0,0
TNF α	85,3 $\pm$ 23,1	14,5 $\pm$ 1,4	4,6 $\pm$ 1,1
IL-2	285,6 $\pm$ 325,5	3,4 $\pm$ 0,8	1,7 $\pm$ 0,6
IL-4	23,6 $\pm$ 3,7	10,2 $\pm$ 0,2	7,3 $\pm$ 1,3
IL-6	9,0 $\pm$ 1,8	3,7 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,0
IL-8	1567,8 $\pm$ 5,2	1280,1 $\pm$ 118,4	359,6 $\pm$ 183,6
IL-10	531,5 $\pm$ 224,0	21,1 $\pm$ 3,0	3,7 $\pm$ 4,0
IL-1 β	4,4 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1
IL-5	2,1 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,1

Результаты представлены в виде средней концентрации цитокина в пг/мл двух доноров $\pm$ стандартное отклонение.

Данные, представленные в настоящем описании, предполагают подходящий терапевтический профиль в случае различных CD3XCLEC12A биспецифических молекул IgG, поскольку они сильно индуцируют лизис клеток-мишеней (примеры 1 и 4), не запуская секрецию Т-клетками потенциально вредных количеств провоспалительных цитокинов, которые отмечаются в случае CD3-специфического IgG.

Пример 7. Эффект Fc-подавления на *in vitro* эффективность CD3XCLEC12A bsAb.

Зависимый от дозы лизис клеток-мишеней с помощью CD3Xконтроль изотипа bsAb, продемонстрированный в примере 4, как было предположено, обусловлен взаимодействием Fc-части bsAb с Fc-рецепторами на клетках-мишенях HL60. Поскольку такой неспецифический лизис клеток может также происходить *in vivo*, либо при взаимодействии с Fc-рецепторами на клетках-мишенях, либо на клетках-наблюдателях, таких как NK-клетки, инженерии CH2/нижней части шарнирной области использовали для вызова подавления Fc-опосредованной активности bsAb.

Для этого были рассмотрены две стратегии мутирования Fc, используя или двойную 235G 236R мутацию (DM; DM-Fc), или тройную 234F 235E 331S мутацию (TM; TM-Fc). CD3XCLEC12A bsAb,

(3056x3116) или с DM-Fc, или с TM-Fc были созданы и, как было подтверждено с помощью проточной цитометрии, связываются с CLEC12A-экспрессирующими клетками с той же интенсивностью, что и bsAb с Fc дикого типа (не представленные данные). Затем эти bsAb, и дикий тип, варианты DM-Fc и Fc-TM CD3хконтроль изотипа bsAb были проверены в анализе лизиса клеток-мишеней HL60 (смотрите примеры 1 и 4). Результаты представляли в виде процента специфического лизиса, отнесенного к подобранному по изотипу контролю.

Fc-подавление с помощью или DM, или TM не оказывало или оказывало лишь незначительное влияние на степень специфического лизиса клеток HL60, индуцируемого CD3XCLEC12A bsAb (фиг. 6). Однако в случае CD3хконтроль изотипа bsAb способность к индукции лизиса клеток HL60 была значительно уменьшена с помощью TM и еще больше с помощью DM.

Это показывает, что Fc-подавление с помощью инженерии CH2/нижней части шарнирной области вносит дополнительный вклад в мишень-специфическое уничтожение аномальных клеток при создании формата CD3хCLEC12A биспецифического IgG1, который эффективно и специфически рекрутирует эффекторные клетки, и уменьшает потенциальную неспецифическую активацию иммунной системы, опосредуемую экспрессирующими нормальный Fcγ-рецептор вспомогательными клетками.

Пример 8. Эффект Fc-подавления на связывание с FcRn, CD16, CD32, CD64 и C1q.

Связывание 3056x3116 CD3XCLEC12A bsAb-кандидата с Fc дикого типа или Fc с подавленной с помощью DM активностью или Fc с подавленной с помощью TM активностью с FcRn человека определяли с помощью интерферометрии биослоя (BLI, Octet QK, ForteBio). Вкратце, очищенный CD3XCLEC12A IgG1 с Fc дикого типа, IgG1 с DM-Fc или IgG1 с TM-Fc был захвачен на биосенсоры с белком L (ForteBio, каталожный номер 18-5085) в концентрации=50 мкг/мл в 0,1 М фосфатном буфере/0,002% Tween 20, содержащем 1,0 мг/мл BSA pH 6,0 (буфере для связывания с FcRn) при комнатной температуре. Впоследствии растворимый FcRn человека (Sino Biological Inc., CT009-H08H) добавляли в концентрации 1 мкг/мл в буфере для связывания с FcRn) при комнатной температуре. Анализ данных с помощью программного обеспечения для анализа данных Octet QK показал, после приведения к связыванию IgG с сенсором с белком L, что последующее связывание CD3XCLEC12A bsAb с Fc с подавленной с помощью DM активностью или Fc с подавленной с помощью TM активностью с FcRn человека было сравнимо с CD3XCLEC12A bsAb с Fc-хвостом дикого типа (фиг. 7), и, таким образом, Fc-подавление не влияло на связывание с FcRn.

Связывание CD3XCLEC12A bsAb с Fc с подавленной активностью с CD16, CD32 и CD64 определяют с помощью интерферометрии биослоя (BLI, Octet QK, ForteBio). Краткий протокол: очищенный CD3XCLEC12A IgG1 с Fc дикого типа, IgG1 с DM-Fc или IgG1 с TM-Fc захватывают на биосенсоры с белком L (ForteBio, каталожный номер 18-5085) в концентрации=50 мкг/мл в 1х буфере для кинетических исследований (ForteBio 18-5032) при комнатной температуре. Впоследствии рекомбинантный белок CD16 (Sino Biological Inc, 10389-H08H1), CD32 (Sino Biological Inc, 10374-H08H) и CD64 (Sino Biological Inc, 10256-H08H) добавляют в концентрации=1,0 мкг/мл в буфере для кинетических исследований (ForteBio 18-5032) при комнатной температуре. Связывание рецепторов FcR с bsAb анализируют, используя программное обеспечение для анализа данных Octet QK.

Связывание CD3XCLEC12A bsAb с Fc с подавленной активностью с C1q определяют с помощью ELISA захвата. С этой целью очищенный CD3XCLEC12A IgG1 с Fc дикого типа, IgG1 с DM-Fc или IgG1 с TM-Fc наносят слоем в диапазоне концентраций 25-0,012 мкг/мл в PBS на планшет Nunc-Immuno MaxiSorp F96 (Nunc, 439454) в течение ночи при 4°C. Впоследствии C1q человека (Quidel, A400) добавляют в концентрации=2,0 мкг/мл в буфере для ELISA (2% молоко/PBST). Комплекс затем визуализируют с использованием овечьего поликлонального IgG против C1q человека (Meridian, K90020C) и кроличьего, противоовечьего, конъюгированного с HRP, поликлонального IgG (Southern Biotech, 6150-05). Наконец, используя субстрат TMB (BD 51-2606KC/51-2607KC), связывание проявляют, и ОП450 количественно определяют, используя считывающее устройство для микропланшетов (Multiskan EX, Thermo Electron Corporation).

Пример 9. Оценка *in vivo* эффективности CD3хCLEC12A биспецифического IgG.

Исследования с использованием ксенотрансплантатов на животных, используя экспрессирующие люциферазу клетки HL60 (HL60(-Luc) клетки), выполняют для подтверждения и расширения *in vitro* данных, используя CD3хCLEC12A биспецифический IgG1. Конкретнее, эти исследования выполняют для определения концентраций в равновесном состоянии в плазме в эффективных дозах, которые будут приняты во внимание при установке начальной дозы для клинической оценки фазы 1. С этой целью NOD/SCID мышам (или сравнимым мышам с ослабленным иммунитетом) инъецируют подкожно количество жизнеспособных HL60(-Luc) клеток, которое приводит к порождению подкожных опухолей HL60 у большинства животных в пределах двух недель после инъекции. Параллельно с инокуляцией HL60(Luc), или после первоначального получения опухоли, вводят 5×10^6 или 1×10^7 PBMC человека. CD3хCLEC12A биспецифический IgG или контрольный моноспецифический или контрольный биспецифический IgG вводят внутривенно на нескольких уровнях доз в первый день введения PBMC и спустя 3, 6 и 9 дней. Оценку размеров опухолей осуществляют через 1 неделю после первоначальной

инокуляции HL60(Luc). Среднее арифметическое размеров опухолей (или указанных как объемы опухолей, или как общая биолуминесценция) из каждой группы наносят на график в зависимости от времени.

Пример 10. Использование CD3xCLEC12A биспецифического полноразмерного антитела подкласса IgG1 в исследовании фазы Ia/Ib.

Конечный ведущий CD3xCLEC12A биспецифический полноразмерный IgG1-кандидат используют для производства материала в соответствии с GMP (надлежащей производственной практикой) и подвергают клиническому испытанию на пациентах с AML. Во-первых, выполняют формальное, не клиническое исследование безопасности продукта-кандидата для установления безопасной начальной дозы для исследований первого применения препарата для человека. Затем проводится открытое, проводимое во множестве центров, с использованием увеличения дозы испытание фазы Ia/b на пациентах с рецидивами AML и/или резистентной AML и на пациентах, непригодных для интенсивного лечения, для исследования безопасности и переносимости CD3xCLEC12A биспецифического IgG после внутривенного введения. Вторичные конечные результаты включают фармакокинетические и фармакодинамические характеристики и предварительный анализ эффективности. Степени общего ответа оцениваются с помощью оценки уменьшения AML бластных клеток в костном мозге. В фазе Ia максимально переносимую дозу (MTD) определяют после увеличения однократной/многократной дозы. После промежуточного фармакокинетического анализа, часть исследования фазы Ib предусматривает группу увеличения дозы - MTD или влечет за собой дальнейшее исследования частоты введения дозы.

Пример 11. Способность CD3xCLEC12A bsAb к индукции пролиферации Т-клеток.

У пациентов с AML количества Т-клеток являются низкими по сравнению с количеством AML бластных клеток в момент постановки диагноза. Хорошо известно, что Т-клетки подвергаются пролиферации после активации, приводящей к увеличению количества Т-клеток. Кроме того, в примере 1 авторы настоящего изобретения показали, что CD3xCLEC12A bsAb может активировать Т-клетки и обладает способностью к индукции опосредуемого Т-клетками лизиса опухолевых клеток. Авторы настоящего изобретения предположили, что пациенты с AML, подвергнутые лечению CD3xCLEC12A bsAb, выиграют от увеличения подмножеств Т-клеток после опосредуемой CD3xCLEC12A биспецифической молекулой активации Т-клеток, поскольку пролиферации Т-клеток будет приводить к увеличению числа Т-клеток-эффекторов. Для демонстрации того, что CD3xCLEC12A bsAb индуцирует *in vitro* пролиферацию Т-клеток, покоящиеся Т-клетки очищали, метили сукцинимидным эфиром диацетата карбоксифлуоресцеина (CFSE) и сокультивировали с аутологичными CLEC12A+ моноцитами в присутствии CD3xCLEC12A bsAb или контрольных Ab. Для исследования, в частности, индуцируемой CD3xCLEC12A пролиферации Т-клеток без неспецифической активации Fc-гамма использовали CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc-хвостом, описанное в примерах 7 и 8. CD3хконтроль изотипа bsAb с Fc дикого типа, CD3хконтроль изотипа bsAb с DM-Fc, моноклональное антитело против CD3 с Fc дикого типа и нерелевантный, подобранный по изотипу контроль (IgG с Fc дикого типа) были включены в качестве контролей. Моноциты и Т-клетки из периферической крови здоровых доноров выделяли путем стандартного выделения с использованием градиента плотности для обогащения в отношении мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), с последующим отбором CD14-позитивных моноцитов, используя микрошарики с CD14 (микрошарики с CD14 человека, Miltenyi Biotec, каталожный номер 130-050-201), и негативной селекцией нетронутых Т-клеток, используя магнитные шарики против других лейкоцитов (набор для выделения Pan Т-клеток, Miltenyi BioTec, каталожный номер 130-096-535). Набор для выделения Pan Т-клеток позволяет выделить покоящиеся (нетронутые) Т-клетки (т.е. не окрашиваемые антителами) во избежание возможности предварительной активации Т-клеток.

CFSE-меченные очищенные покоящиеся Т-клетки затем инкубировали с очищенными моноцитами и bsAb в среде с 10% нормальной человеческой сыворотки (HS) в соотношении эффектор:клетка-мишень=5:1 в течение семи дней. В день 7 уменьшение сигнала CFSE в качестве считывания данных, касающихся пролиферации Т-клеток, измеряли с помощью проточной цитометрии. Результаты представляли в виде сигнала CFSE для CD3+, CD3+CD4+CD3+ и CD8+ Т-клеток на гистограммах.

Положительный контроль в виде Ab против CD3 с Fc дикого типа индуцировал пролиферацию Т-клеток, тогда как подобранный по изотипу контрольный IgG с Fc дикого типа не индуцировал пролиферацию Т-клеток (фиг. 8). Как и ожидалось, CD3хконтроль изотипа bsAb с Fc дикого типа не индуцировало пролиферацию Т-клеток, но в гораздо меньшей степени по сравнению с двухвалентным моноспецифическим IgG против CD3 в качестве контроля. В отличие от этого, CD3хконтроль изотипа bsAb с DM-Fc не индуцировало пролиферацию Т-клеток из-за его Fc-хвоста с подавленной активностью. CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc также индуцировало желаемую пролиферацию Т-клеток, опосредуемую, в частности, соединением CD3 с антигеном CLEC12A.

Это показывает, что CD3xCLEC12A bsAb не только способен к мишень-специфической индукции опосредуемого Т-клетками лизиса опухоли, как показано ранее, но также может сильно индуцировать мишень-специфическую пролиферацию Т-клеток, приводящую к увеличению количества Т-клеток. Кроме того, это еще раз демонстрирует, что Fc-подавление с помощью инженерии CH2/нижней части шарнирной области не только вносит вклад в мишень-специфическое уничтожение аномальных клеток, но также в мишень-специфическую индукцию пролиферации Т-клеток с помощью CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc класса IgG.

Пример 12. Оценка индуцированного с помощью CD3xCLEC12A увеличения подмножества T_{EMRA} у пациентов с AML.

Поскольку активация пролиферации Т-клеток была продемонстрирована в случае CD3xCLEC12 bsAb с DM-Fc, авторы настоящего изобретения затем захотели исследовать, способно ли CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc индуцировать пролиферацию фракции CD8⁺ цитотоксических Т-клеток у пациентов с AML. CD8⁺ цитотоксические Т-клетки были признаны в качестве основных эффекторов, опосредующих регрессию опухолей (Sluijter et al., 2010). CD8⁺ Т-клетки могут быть разделены на четыре подмножества: необученные (CCR7+CD45RA⁺), центральные клетки памяти (T_{CM}, CCR7+CD45RA⁻), эффекторные клетки памяти (T_{EM}, CCR7-CD45RA⁻) и CD45RA⁺ эффекторные клетки памяти (T_{EMRA}, CCR7-CD45RA⁺). Исследования показали, что подмножества необученных клеток и CD8⁺ Т-клеток памяти обладают различными способностями к пролиферации и дифференциации в ответ на стимуляцию TCR (Geginat et al., 2003).

Во-первых, CD8⁺ фракция в периферической крови пациентов с AML в клинической ремиссии была проанализирована в сравнении со здоровыми донорами. С этой целью PBMC выделяли из замороженных образцов периферической крови от пациентов с AML и здоровых доноров с помощью стандартного выделения с использованием градиента плотности. Затем PBMC окрашивали антителами против CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO для анализа в отношении подмножеств CD8⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Результаты представляли в виде процента подмножества в общей фракции CD8⁺ Т-клеток.

Аналогично тому, что было описано ранее, было обнаружено, что подмножество необученных CD8⁺ Т-клеток было уменьшенным в крови пациентов с AML по сравнению с подмножеством необученных CD8⁺ Т-клеток от здоровых людей, в то время как фракция T_{EMRA} (CCR7-CD45RA⁺) была увеличенной у пациентов с AML по сравнению со здоровыми донорами (фиг. 9).

Затем проводят эксперименты для исследования специфической для опухоли-мишени пролиферации фракции Т-клеток у пациентов с AML. Конкретнее, эти эксперименты проводят для определения, может ли CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc усилить пролиферацию Т-клеток и разрастание подмножеств эффекторных Т-клеток (T_{EM} и T_{EMRA}) у пациентов с AML относительно необученных CD8⁺ Т-клеток у пациентов с AML.

Для этого покоящиеся Т-клетки от пациентов с AML в клинической ремиссии очищают в соответствии с примером 11. Состав подмножеств CD8⁺ Т-клеток в день=0 анализируют посредством окрашивания PBMC антителами против CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO, с последующим анализом с использованием проточной цитометрии. Кроме того, покоящиеся Т-клетки или метят CFSE, или не метят (мечение CFSE, как описано в примере 11) и сокультивируют с лейкозными клетками HL60 в соотношении E:T=5:1 с контрольными или исследуемыми антителами в течение 7 дней. Меченные CFSE Т-клетки используют для количественной оценки пролиферации Т-клеток, в то время как немеченные Т-клетки используют для определения процента подмножеств пролиферирующих Т-клеток. CFSE-меченные и немеченные Т-клетки инкубируют с PBS, подобранным по изотипу контрольным Ab с Fc дикого типа, CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc, CD3хконтроль изотипа bsAb с DM-Fc и моноклональным Ab против CD3 с Fc дикого типа в концентрации=1 мкг/мл. Спустя 7 дней, CFSE-меченные Т-клетки окрашивают антителами против CD3, CD4 и CD8 и подвергают анализу с использованием FACS, чтобы определить абсолютные количества Т-клеток и количество клеточных делений, в то время как немеченные CFSE Т-клетки окрашивают антителами против CCR7, CD3, CD4, CD8, CD45RA и CD45RO для определения состава подмножеств пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток с помощью проточной цитометрии. Пролиферацию Т-клеток представляют в виде сигнала CFSE в подмножестве Т-клеток на гистограммах, и размер четырех подмножеств CD8⁺ Т-клеток представляют в виде процента в общей фракции CD8⁺ Т-клеток.

Пример 13. Эффективность CD3xCLEC12A bsAb в индукции лизиса опухолевых клеток, опосредуемого Т-клетками, у пациента с AML.

В примере 1 было показано, что CD3xCLEC12A bsAb может индуцировать уничтожение CLEC12A-позитивных клеток HL60 покоящимися Т-клетками от здоровых доноров. Затем авторы настоящего изобретения исследовали способность CD3xCLEC12A bsAb к индукции мишень-специфической активации Т-клеток пациента с AML и его способность вызывать опосредуемое Т-клетками пациента с AML уничтожение клеток HL60.

Т-клетки выделяли из замороженной периферической крови пациентов с AML (AML-M1/M2, M4 или M5 в соответствии с FAB классификацией AML) в клинической ремиссии, используя набор для изоляции Pan Т-клеток, как описано в примере 11. Очищенные, покоящиеся Т-клетки, полученные от пациентов с AML, впоследствии инкубировали с CFSE-мечеными клетками HL-60 в среде, дополненной 10% нормальной HS, в соотношении эффектор:клетка-мишень=5:1 в течение двух дней, в присутствии PBS, выбранного по изотипу контрольного Ab с Fc дикого типа, CD3xCLEC12A DM-Fc, CD3хконтроль изотипа DM-Fc и Ab против CD-3 с Fc дикого типа в качестве положительного контроля (все антитела в концентрации 1 мкг/мл). После сокультивирования в течение двух дней, активацию Т-клеток определяли с помощью анализа с использованием проточной цитометрии для CD3, CD4 и CD25. Эти результаты представляли в виде процента CD25⁺ клеток в CD4⁺ Т-клетках. Кроме того, остающиеся в живых CFSE-

позитивные клетки HL60 количественно определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты представляли в виде процента специфического лизиса относительно IgG.

Эти данные показывают, что антиген-специфическая активация Т-клеток здорового донора и пациента с AML, опосредуемая CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc, была сравнимой (фиг. 10A). Как и ожидалось, CD3хконтроль изотипа bsAb с DM-Fc не индуцировало активацию ни Т-клеток здорового донора, ни Т-клеток, полученных от пациентов с AML. Было показано, что опосредуемый CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc лизис клеток HL60 Т-клетками, полученными от пациентов с AML, (68% лизиса клеток HL60) был сравним с таковым, осуществляемым Т-клетками здорового донора (69% лизиса клеток HL60, фиг. 10B). Как и ожидалось, CD3хконтроль изотипа bsAb с DM-Fc не индуцировало уничтожение клеток HL60, ни Т-клетками пациентов с AML, ни Т-клетками здоровых доноров. Таким образом, CD3xCLEC12A биспецифическая молекула является мощным индуктором опосредуемого Т-клетками лизиса опухолевых клеток, независимо от того, получены ли эти Т-клетки от пациентов с AML или от здоровых доноров.

Поскольку было показано, что CD3xCLEC12A bsAb обладает способностью индуцировать мощный лизис опухолевых клеток HL60 Т-клетками пациентов с AML, впоследствии оценивали способность CD3xCLEC12A bsAb к нацеливанию на специфическую активацию AML Т-клеток. Кроме того, определяли способность CD3xCLEC12A bsAb к индукции лизиса первичных CLEC12A-позитивных AML бластных клеток аутологичными Т-клетками, полученными от пациентов с AML. Во-первых, сохраняемые замороженными образцы костного мозга от пациентов с AML, содержащие в момент диагностирования >70% первичных AML бластных клеток, как определено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии, оттаивали, культивировали в течение ночи в среде IMDM, дополненной 10% FCS, 100 нг/мл GM-CSF, 100 нг/мл G-CSF, 50 нг/мл IL-3, 25 нг/мл SCF и 20 нг/мл Flt3L, как описано ранее (Norde et al., 2009). После культивирования в течение ночи первичные AML бластные клетки фенотипировали по представленности на поверхности CLEC12A, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD33, CD34, CD38, CD45 и CD117 с помощью проточной цитометрии и метили CFSE. Покоящиеся, аутологичные, полученные от пациентов Т-клетки, собранные в момент достижения пациентом клинической ремиссии, были выделены из периферической крови, используя набор для выделения Pan Т-клеток, как описано в примере 11. Впоследствии, AML бластные клетки сокультивировали с покоящимися аутологичными Т-клетками в соотношении Е:Т=5:1 в среде с 10% HS в течение двух дней. Тестируемые условия включали PBS, Fc дикого типа подобранного по изотипу Ab, CD3xCLEC12A DM-Fc, CD3хконтроль изотипа DM-Fc и Ab против CD3 с Fc дикого типа в качестве положительного контроля (все антитела в концентрации=1 мкг/мл). После сокультивирования в течение двух дней, активацию Т-клеток определяли с помощью анализа с использованием проточной цитометрии на CD3, CD4, CD8 и CD25. Эти результаты представляли в виде процента CD25+ клеток в CD4+ или CD8+ AML Т-клетках. Лизис AML бластных клеток определяли путем количественного определения остающихся в живых дважды позитивных CFSE⁺/CD45^{низкий уровень} AML бластных клеток с помощью проточной цитометрии. Результаты представляли в виде процента специфического лизиса бластных клеток относительно IgG.

Эти данные показывают, что CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc обладает способностью индуцировать специфическую для AML бластных клеток-мишеней активацию AML Т-клеток, сравнимую с моноклональным Ab против CD3 с Fc дикого типа в качестве положительного контроля (фиг. 11A/B). Кроме того, эти данные показывают, что индуцируемое CD3xCLEC12A bsAb мощное уничтожение аутологичных AML бластных клеток происходящими от пациентов с AML Т-клетками является настолько же мощным, как и уничтожение, индуцируемое моноклональным Ab против CD3 с Fc дикого типа в качестве положительного контроля (фиг. 11C). Как и ожидалось, не индуцировалось или индуцировалось незначительное уничтожение AML бластных клеток CD3хконтроль изотипа антителом с DM-Fc, что означает, что наблюдаемое уничтожение AML бластных клеток, опосредуемое CD3xCLEC12A bsAb, является в основном результатом антиген-специфической активации Т-клеток и специфического лизиса CLEC12A+ AML опухолевых клеток. В целом, это исследование показывает, что CD3xCLEC12A bsAb может эффективно индуцировать уничтожение CLEC12A-позитивных опухолевых клеток Т-клетками пациентов с AML.

Пример 14. Эффект Fc-подавления на неспецифический выброс цитокинов.

В примерах 7 и 8 было показано, что формат CD3xCLEC12A bsAb подкласса IgG1 с Fc-подавлением с помощью инженерии CH2/нижней части шарнирной области (DM-Fc) приводил к уменьшению аффинности к Fc-гамма-рецепторам и аннулировал неспецифическую, Fc-рецептор-опосредованную цитотоксичность по отношению к линии клеток HL60 лейкозного происхождения. Затем исследовали, аннулировал ли формат bsAb подкласса IgG1 с DM-Fc-подавлением неспецифическую Fc-рецептор-опосредованную цитотоксичность в присутствии Fc-рецептор-позитивных клеток-наблюдателей, таких как NK-клетки. В этом исследовании аутологичные покоящиеся Т-клетки, полученные от здоровых доноров, были перенаправлены на CLEC12A-позитивные моноциты в присутствии других Fc-рецептор-позитивных, врожденных эффекторных клеток-наблюдателей, таких как NK-клетки. С этой целью PBMC выделяли из гепаринизированной периферической крови здоровых доноров с помощью центрифугирования в градиенте плотности и высеивали с плотностью 1×10^6 клеток/мл. PBMC культивировали в течение двух дней в среде с 10% FBS, в присутствии или PBS, подобранного по изотипу контрольного Ab, CD3xCLEC12A bsAb с Fc дикого типа, CD3xCLEC12A bsAb с DM-Fc, CD3хконтроль

изотипа bsAb с Fc дикого типа, CD3хконтроль изотипа bsAb с DM-Fc, или моноклонального Ab против CD3 с Fc дикого типа. После культивирования в течение двух дней, остающиеся в живых моноциты количественно определяли с помощью проточной цитометрии на основе CD14-экспрессии. Результаты представляли в виде процента специфического лизиса, отнесенного к IgG.

Было установлено, что в случае CD3хCLEC12A биспецифического антитела, Fc-подавление благодаря присутствию DM-Fc-области оказывало лишь незначительный эффект на лизис моноцитов (фиг. 12). В отличие от него, в случае CD3хконтроль изотипа bsAb Fc-подавление благодаря присутствию DM-Fc-области значительно уменьшало неспецифический лизис моноцитов. Соответственно делают вывод, что Fc-подавление в CD3хCLEC12A bsAb также вносит свой вклад в мишень-специфическое уничтожение: CD3хCLEC12A bsAb с DM-Fc, в частности, рекрутирует Т-клетки и уменьшает неспецифическую активацию иммунной системы, опосредуемую экспрессирующими нормальный Fcγ-рецептор вспомогательными клетками.

Затем был поставлен вопрос, отменяет ли Fc-подавление в результате мутации DM в CD3хCLEC12A bsAb Fc-рецептор-опосредованный выброс цитокинов, который, как известно, связан с синдромом выброса цитокинов (CRS), общее клиническое явление при использовании терапий на основе антител, которое вызывают вспомогательные клетки. Для этого профиль цитокинов в супернатантах анализа уничтожения моноцитов, описанного на фиг. 13, был проанализирован с использованием панели цитокинов человека 10-Plex для платформы Luminex (Invitrogen, LHC0001) в соответствии с инструкциями производителя. В супернатанте дня 2 измеряли профиль следующих цитокинов человека: GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10 и TNF-α. Представленные результаты являются концентрацией цитокинов, определенной в пг/мл. Уровни цитокинов GM-CSF, IL-4 и IL-5 были ниже предела обнаружения этого анализа (не представленные данные).

Данные показывают, что CD3хCLEC12A и CD3хконтроль изотипа bsAb, оба Fc-хвостом дикого типа, вызывали выброс IL1β, IL-6, TNF-α, IL-10, IL-2 и IFN-γ (фиг. 13). Однако не были обнаружены или были обнаружены очень низкие уровни этих цитокинов в случае CD3хCLEC12A и CD3хконтроль изотипа bsAb, когда они имели DM-Fc-хвост, за исключением IL-8. Поскольку моноциты являются основным источником IL-8, высокие уровни IL-8, как предполагается, будут высвобождаться из лизированных моноцитов, а не в результате специфического FcR-опосредованного высвобождения. Делают заключение, что Fc-подавление в результате мутации DM в формате bsAb IgG в значительной степени устраняет опосредованный Fc-рецепторами выброс цитокинов IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-2 и IFN-γ, связанных с CRS. В целом, эти данные показывают, что Fc-подавление в результате мутации DM в CH2/нижней части шарнирной области вносит вклад в увеличение эффективности и специфического привлечения эффекторных клеток с помощью CD3хCLEC12A DM-bsAb за счет уменьшения потенциальной неспецифической активации иммунной системы, опосредуемой экспрессирующими нормальные Fcγ-рецепторы вспомогательными клетками, и связанного выброса провоспалительных цитокинов.

Пример 15.

Связывание кандидата 3896 в виде полноразмерного двухвалентного моноклонального IgG против CD3 с мембраносвязанным CD3 сравнивали с кандидатом 3056 в виде полноразмерного двухвалентного моноклонального IgG против CD3 с помощью анализа с использованием FACS, используя CD3-экспрессирующие клетки HPB-ALL. Нерелевантный IgG1 человека служил в качестве контрольного, подобранного по изотипу IgG. Проточную цитометрию выполняли в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. Как показано на фиг. 14A, IgG против CD3 3896 в зависимости от дозы связывался с CD3 на клетках HPB-ALL, как и IgG против CD3 3056.

Затем проверяли способность IgG против CD3 3896 индуцировать пролиферацию Т-клеток в прямом сравнении с мышиным антителом против CD3 OKT3, IgG против CD3 3056 и подобранным по изотипу контрольным IgG. Вкратце, антитела последовательно разводили и подвергали иммобилизации на 96-луночных планшетах.

После удаления несвязанного IgG, добавляли CFSE-меченные Т-клетки, и осуществляли инкубацию при 37°C. В день 5, уровень индуцированной пролиферации Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии. Результаты представляли в виде процента жизнеспособных Т-клеток, демонстрирующих, по крайней мере, двукратное уменьшение уровня экспрессии CFSE, и представлены на фиг. 14B. Было показано, что IgG против CD3 3896 в виде двухвалентного моноспецифического антитела был менее эффективным в индукции пролиферации Т-клеток, чем кандидат IgG против CD3 3056 и мышиное OKT3. Эти данные свидетельствуют о том, что уменьшение уровня пролиферации Т-клеток, индуцированной 3896, по сравнению с IgG против CD3 3056, отражают уменьшение способности к связыванию CD3, как анализировали с помощью проточной цитометрии. Это различие в связывании позволяет выбрать плечо с желаемой аффинностью, что приводит к биспецифическому антителу, которое демонстрирует подходящий баланс между аффинностями к CD3 и CLEC12A, так что Т-клетки и CLEC12A-позитивные AML опухолевые клетки эффективно сводятся вместе, и опосредуемый Т-клетками лизис CLEC12A-позитивных AML опухолевых клеток оптимально индуцируется.

Для проверки эффективности нового, направленного против CD3 плеча 3896 в сравнение с направ-

ленным против CD3 плечом 3056 в формате CD3xCLEC12A биспецифического антитела, 3896xCLEC12A-специфический эталон биспецифическое антитело примера 4 (кандидат 3896x3116) и 3056xCLEC12A-специфический эталон биспецифическое антитело примера 1 (кандидат 3056x3116) непосредственно сравнивали в анализе цитотоксичности по отношению к HL60, как описано ранее. Результаты представлены на фиг. 15. Было отмечено, что 3896xCLEC12A-специфический эталон bsAb имеет эффективность, сходную с 3056xCLEC12A-специфический эталон bsAb. Следовательно, поскольку оба биспецифических антитела отличаются только своим CD3-специфическим Fab-плечом, в то время как CLEC12A-специфическое Fab-плечо является одинаковым, можно сделать вывод, что функциональные возможности CD3-специфического Fab-плеча 3896 схожи с таковыми CD3-специфического Fab-плеча 3056 в CD3xCLEC12A биспецифическом Ab. Следует отметить, что в более низких концентрациях кандидат 3896x3116 даже лучше кандидата 3056x3116. Это выгодно, поскольку обеспечивается более широкое терапевтическое окно, как объяснялось в настоящем описании ранее.

Пример 16.

В примере 3, панель CLEC12A-специфических Fab-плеч была отобрана из библиотек фагового дисплея. Все CLEC12A-связывающие молекулы содержали легкую цепь huVk1-39. Были отобраны три CLEC12A-связывающих молекулы: Fab 3918, 4327 и 4331. Эти Fab были экспрессированы в виде полно-размерного IgG1 человека: IgG против CLEC12A 3918, IgG против CLEC12A 4327 и IgG против CLEC12A 4331. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности VH в IgG против CLEC12A 3918, VH в IgG против CLEC12A 4327, VH в IgG против CLEC12A 4331 и общей VL (IGKV1-39; O12) представлены на фиг. 20. Полноразмерные антитела против CLEC12A проверяли на связывание с CLEC12A, экспрессируемым клетками HL60.

Связывание IgG против CLEC12A 3918, IgG против CLEC12A 4327 и IgG против CLEC12A 4331 с мембраносвязанным CLEC12A сравнивали с эталонным антителом против CLEC12A (3116) с помощью анализа с использованием FACS, используя экспрессирующие CLEC12A клетки HL60. Нерелевантный IgG1 человека служил в качестве контрольного, подобранного по изотипу IgG. Проточную цитометрию выполняли в соответствии со стандартными процедурами, известными в данной области техники. Как показано на фиг. 16, IgG против CLEC12A 4327 связывался с CLEC12A схоже с эталонным антителом против CLEC12A. Два других антитела, IgG против CLEC12A 3918 и IgG против CLEC12A 4331, также продемонстрировали хорошее, зависимое от дозы связывание с CLEC12A на клетках HL60. Их связывание с CLEC12A казалось несколько меньше по сравнению с эталонным антителом против CLEC12A.

В заключение, Fab 3918, 4327 и 4331 являются хорошими CLEC12A-связывающими плечами.

Пример 17.

Проверяли, являются ли биспецифические молекулы, содержащие CD3-специфическое Fab-плечо 3896 и CLEC12A-специфическое Fab-плечо 3981, 4327 или 4331, функциональными. Для этого, последовательность VH CD3-специфического Fab-плеча 3896 и VH-область или эталонного антитела против CLEC12A, CLEC12A-специфического Fab 3918, CLEC12A-специфического Fab 4327 или CLEC12A-специфического Fab 4331 были клонированы в экспрессионные векторы, используя способы, известные в данной области для продукции биспецифического IgG1 (Gunasekaran et al. WO2009/089004) в сочетании с реаранжированной легкой цепью huVk1-39 для получения биспецифических антител; 3896xCLEC12A-специфический эталон, 3896x3918, 3896x4327 и 3896x4331. Эти биспецифические молекулы проверяли на функциональность в ранее описанном анализе цитотоксичности по отношению к HL60. Покоящиеся Т-клетки от двух здоровых доноров (HD1 и HD2) сокультивировали с CFSE-мечеными клетками HL60 в присутствии различных концентраций биспецифического антитела в соотношении Е:Т=5:1 в течение 48 часов в присутствии 10% HS. Количество выживших CFSE-позитивных клеток HL60 определяли с помощью проточной цитометрии в день 2. Результаты на фиг. 17 представлены в виде процента специфического лизиса. В случае двух отдельных экспериментов с Т-клетками от донора 1 (HD1, фиг. 17 верхняя панель) и Т-клетками от донора 2 (HD2, фиг. 17 нижняя панель), было показано, что все биспецифические молекулы были настолько же эффективными, как и 3896xCLEC12A-специфический эталон биспецифическое антитело при инкубации в высокой концентрации.

Следует отметить, что в особенности в низких концентрациях биспецифических антител было обнаружено, что 3896x4327 и 3896x4331 биспецифические антитела были более эффективными, чем 3896xCLEC12A-специфический эталон биспецифическое антитело. Следовательно, поскольку эти биспецифические антитела отличаются только своим CLEC12A-специфическим Fab-плечом, в то время как CD3-специфическое Fab-плечо является одинаковым, можно сделать вывод, что функциональные возможности CLEC12A-специфических Fab-плеч 4327 и 4331 являются более мощными по сравнению с эталонным CLEC12A-специфическим Fab-плечом. Не желая ограничиваться какой-либо теорией, наблюдаемые различия между 3896x4327 и 3896x4331 в сравнении с 3896xCLEC12A-специфический эталон биспецифическим IgG могут отражать различие в аффинности этих новых Fab-плеч против CLEC12A, или они могут быть нацелены на другой эпитоп CLEC12A, что делает возможным более эффективное сшивание опухолевых клеток с экспрессирующими CD3 Т-клетками.

Пример 18.

В примере 2 было показано, что Fab-фрагменты против CLEC12A 3918 и 4331 конкурировали за

связывание с эпитопом CLEC12A при исследовании в ELISA в формате Fab с Fab-фрагментами эталонного антитела против CLEC12A. Однако Fab против CLEC12A 4327 не конкурировал с эталонным IgG против CLEC12A за связывание в этом анализе (табл. 2). В этом эксперименте проверяли, конкурирует ли полноразмерный IgG против CLEC12A 4327 за связывание с CLEC12A с эталонным антителом против CLEC12A. Вкратце, клетки HL60 предварительно инкубировали с первым антителом в концентрации=50 мкг/мл на льду в течение 20 мин. Впоследствии добавляли меченное Oregon Green (OG) (Invitrogen, каталожный номер 10476) второе антитело в концентрации=1 мкг/мл к клеткам плюс первое антитело (концентрация первого антитела после добавления OG-меченного IgG ~45 мкг/мл). Через 20 мин клетки промывали и анализируют с помощью FACS.

Результаты представлены на фиг. 18: был сделан вывод, что IgG против CLEC12A 4327 и эталонный IgG против CLEC12A конкурируют за связывание с CLEC12A. Это говорит о том, что оба IgG связываются или с близкородственным эпитопом антигена CLEC12A, или что они связываются с различными эпитопами, которые не допускают одновременное связывание обоих IgG из-за стерического препятствия.

Пример 19.

В предыдущих примерах было показано, что CLEC12A-специфические Fab-плечи 4327, 4331, 3918, а также 3116 являются хорошими CLEC12A-связывающими веществами и сильными индукторами опосредуемого Т-клетками уничтожения в CD3xCLEC12A биспецифическом формате. До сих пор, биспецифические антитела получали с использованием известных способов стимулирования гетеродимеризации тяжелых цепей иммуноглобулина (Gunasekaran et al.). В поданных авторами настоящего изобретения, находящихся в процессе одновременного рассмотрения заявке на патент США и заявке по процедуре РСТ (обыкновенной заявке на патент США с № 13/866747 и РСТ/NL2013/050294; которые включены сюда посредством ссылки), авторы настоящего изобретения раскрыли способы и средства для продукции биспецифических антител, исходя из одной клетки, в результате чего предусмотрены средства, которые способствуют образованию биспецифических антител вместо образования моноспецифических антител. Эти способы также могут быть с выгодой использованы в настоящем изобретении. В частности, предпочтительными мутациями для продукции по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG являются аминокислотные замены L351K и T366K (нумерации согласно Kabat) в первом CH3-домене ("КК-вариант" тяжелой цепи) и аминокислотные замены L351D и L368E во втором CH3-домене ("ДЕ-вариант" тяжелой цепи), или наоборот. Ранее в находящихся в процессе одновременного рассмотрения заявке на патент США US 13/866747 и РСТ/NL2013/050294, поданных авторами настоящего изобретения, было показано, что ДЕ-вариант и КК-вариант преимущественно спариваются с образованием гетеродимеров (так называемых "ДЕКК" биспецифических молекул). Гомодимеризация ДЕ-варианта тяжелых цепей (ДЕДЕ гомодимеры) или КК-варианта тяжелых цепей (КККК гомодимеры) почти не происходила из-за сильного отталкивания между заряженными остатками на стыке CH3-CH3 между идентичными тяжелыми цепями. Для демонстрации того, что эффект CD3xCLEC12A биспецифических молекул не зависит ни от известных мутаций для гетеродимеризации (Gunasekaran), ни от мутаций ДЕКК, ДЕ-вариант и КК-вариант тяжелых цепей были использованы для стимуляции гетеродимеризации различных тяжелых цепей для получения CD3xCLEC12A биспецифических молекул. Кроме того, двойные мутации (L235G и G236R; DM) в CH2/нижней части шарнирной области были введены в эти ДЕ- и КК-варианты тяжелых цепей. Fc-хвост этих полученных биспецифических молекул называют "DM DEKK".

Вкратце, VH-области CLEC12A-специфических Fab-плеч или 3116, 4327, или 4331 были клонированы в экспрессионные векторы, содержащие ДЕ-вариант+тяжелая цепь DM, тогда как VH-область антитела против CD3 3056 была клонирована в экспрессионный вектор, содержащий КК-вариант+тяжелая цепь DM (обыкновенная заявка на патент США с № 13/866747 и РСТ/NL2013/050294), и эти экспрессионные векторы, вместе с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей реаранжированную легкую цепь человека IGKV1-39/IGKJ1 (huVκ1-39), были предоставлены клетке-хозяину, так что клетка-хозяин экспрессировала и продуцировала биспецифические антитела. Результирующие 3056x3116 DM DEKK, 3056x4327 DM DEKK и 3056x4331 DM DEKK биспецифические антитела впоследствии проверяли на эффективность в анализе цитотоксичности по отношению к HL60, как описано выше. Результаты представлены на фиг. 19: было показано, что все варианты еще способны к эффективному лизису опухолевых клеток, и, соответственно, пришли к выводу, что мутации DM и DEKK могут быть введены в Fc-область CD3xCLEC12A биспецифического антитела, при сохранении способности к индукции лизиса опухолевых клеток.

Список литературы

- Armour et al. Mol. Immunol. 2003 (40) 585-593
- Bakker A.B. et al. Cancer Res 2004, 64, p8443-50
- Bargou et al. 2008 Science 321 :974
- Bluemel et al. 2010 Cancer Immunol. Immunother. 59: 1197
- Chames and Baty, MABS 2009 (1) 539-547
- Chatenoud et al. 1990, Transplantation 49(4), pages 697-702
- Chen C.H. et al. Blood 2006, 107, p1459-67
- Cui et al. JBC 2012 (287) 28206-28214
- De Kruif et al. 1995, J Mol Biol 248(1), pages 97-105
- De Kruif et al. J. Mol. Biol. 2009 (387) 548-58
- De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 2010 (106)741-50
- De Wildt RM et al. J. Mol. Biol. 1999 (285) 895-901;
- Dreier et al. 2002 Int.J.Canc. 100:690
- Geginat, J. et al. Blood, 2003. 101(11), p. 4260-6
- Gunasekaran et al. JBC 2010 (285) 19637-19646
- Haagen et al. 1995 Blood 85:3208
- Han Y. et al. Blood 2004, 104, p2858-66
- Kipriyanov et al. 1998 Int.J.Can. 77:763
- Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197
- Lanzavecchia et al. 1987, Eur.J.Imm. 17: 105
- Liu et al. 1985 PNAS 82: 8648
- Liesveld et al. 1988, J. Immunol. 140(5), pages 1527-1533
- Loffler et al. 2000 Blood 95:2098
- Marshall A.S. et al. J Biol Chem 2004, 279, p 14792-802
- Merchant et al. Nature Biotechnology 1998 Volume 16, pp 677-681
- Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551
- Moshaver et al. 2008 Stem Cells 26:3059
- Nissim et al. The EMBO Journal vol.13 no.3 pp.692-698. 1994
- Norde WJ. et al. Blood 2009 (113) (10): p. 2312-23
- Offner et al. Molecular Immunology 2006 (43) 763-771
- Oganesyan et al. Biol. Crystall. 2008(D64)700
- Schaefer et al (Cancer Cell 20, 472-486, October 2011
- Sheridan C, Nat Biotechnol. 2012 (30):300-1
- Staerz et al. 1986 PNAS 83: 1453
- Shields RL et al. JBC 2001 (276) 6591-6604
- Sluijter, B.J., et al. Clin Immunol, 2010. 137(2), p. 221-33
- Suntharalingam et al. 2006, New England J Med 355(10), pages 1018-1028
- Van Rhenen et al. 2007 Blood 110:2659
- Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163: 1246
- WO2004/009618
- WO2005/118635
- WO2005/000894
- WO2005/000894
- WO 2008/027236
- WO2009/089004
- WO2009/ 157771
- WO 2010/108127

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое полноразмерное антитело человека класса IgG, где указанное биспецифическое антитело класса IgG содержит

первое плечо, которое специфически распознает член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A), и

второе плечо, которое специфически распознает антиген на иммуннокомпетентных эффекторных клетках, способных к привлечению таких клеток к аномальной клетке, экспрессирующей CLEC12A, где указанным антигеном на указанных иммуннокомпетентных эффекторных клетках является CD3.

2. Биспецифическое антитело класса IgG по п.1, где указанные иммуннокомпетентные эффекторные клетки включают Т-клетки.

3. Биспецифическое антитело класса IgG по п.1, где указанное антитело специфически распознает CD3ε.

4. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-3, где оба плеча содержат общую легкую цепь.

5. Биспецифическое антитело класса IgG по п.4, где указанной общей легкой цепью является легкая цепь зародышевой линии.

6. Биспецифическое антитело класса IgG по п.4 или 5, где указанной общей легкой цепью является реаранжированная легкая цепь каппа зародышевой линии человека IgVκ1-39*01/IGJκ1*01.

7. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-6, где указанное биспецифическое антитело представляет собой IgG1 человека.

8. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-7, где плечо, которое специфически распознает CLEC12A, содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична SGYTFTSY, и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична IINPSGGS, и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична GTTGDWFDY.

9. Биспецифическое антитело класса IgG по п.8, где плечо, которое специфически распознает CLEC12A, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC ASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQK FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCAKGTGDFDYWGQGLTVTVSS.

10. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-8, где плечо, которое специфически распознает CLEC12A, содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична SGYTFTSY, и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична IINPSGGS, и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична GNYGDEFDY.

11. Биспецифическое антитело класса IgG по п.10, где плечо, которое специфически распознает CLEC12A, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC ASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQK FQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGNYGDEFDYWGQGLTVTVSS.

12. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-7, где плечо, которое специфически распознает CLEC12A, содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична SGYTFTGY, и

последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична WINPNSGG, и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична DGYFADAFDY.

13. Биспецифическое антитело класса IgG по п.12, где плечо, которое специфически распознает CLEC12A, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC KASGYTF GYYMHVWRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQK FQGRVTMTRDTSISTAYMELSLRSDDTAVYY CARDGYFADAFDYWGQGLTVTVSS.

14. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-13, где второе плечо, которое специфически распознает CD3, содержит

последовательность CDR1 тяжелой цепи, состоящую из последовательности SYGMH, и последовательность CDR2 тяжелой цепи, состоящую из последовательности IIWYSGSKKN-YADSVKG, и

последовательность CDR3 тяжелой цепи, состоящую из последовательности GTGYNWFDP.

15. Биспецифическое антитело класса IgG по п.14, где второе плечо, которое специфически распознает CD3, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, состоящую из последовательности QVQLVESGGGWQPGRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYSGSKKNYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPWGQGTLVTVSS.

16. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-15, где первое и второе плечи содержат

последовательность CDR1 легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична RASQSISSYLN, и

последовательность CDR2 легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична AASSLQS, и

последовательность CDR3 легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична QQSYSTPPT.

17. Биспецифическое антитело класса IgG по п.16, где первое и второе плечи содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, состоящую из последовательности, которая по крайней мере на 90% идентична DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK.

18. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-17, где указанное биспецифическое антитело класса IgG имеет мутированные CH2-домен и/или нижнюю часть шарнирного домена, так что взаимодействие указанного биспецифического антитела класса IgG с Fcγ-рецепторами значительно уменьшается.

19. Биспецифическое антитело класса IgG по п.18, где указанные мутированные CH2-домен и/или нижняя часть шарнирной области содержат замену L235G и/или G236R.

20. Биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.18-19, где указанные мутированные CH2-домен и/или нижняя часть шарнирной области содержат замену L235G и G236R.

21. Способ получения биспецифического антитела класса IgG по любому из пп.1-20 из единственной клетки,

где указанное биспецифическое антитело класса IgG содержит два CH3-домена,

где указанный способ предусматривает:

наличие клетки, содержащей а) первую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь IgG, которая специфически распознает CLEC12A и которая содержит первый CH3-домен, и б) вторую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую тяжелую цепь IgG, которая специфически распознает CD3, и которая содержит второй CH3-домен,

где указанные последовательности нуклеиновых кислот обеспечивают аминокислотные мутации для преимущественного спаривания указанных первого и второго CH3-доменов, и

где указанная клетка содержит третью последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую общую легкую цепь,

где указанный способ предусматривает стадию культивирования указанной клетки и обеспечивает экспрессию указанных двух последовательностей нуклеиновых кислот и сбор указанного биспецифического антитела класса IgG из культуры.

22. Способ по п.21, где указанной общей легкой цепью является реаранжированная легкая цепь каппа зародышевой линии человека IgVκ1-39*01/IGJκ1*01.

23. Способ по любому из пп.21-22 для получения биспецифического антитела класса IgG,

где указанный первый CH3-домен содержит аминокислотные замены L351K и T366K, и

где указанный второй CH3-домен содержит аминокислотные замены L351D и L368E,

где указанный способ дополнительно включает стадию культивирования указанной клетки и экспрессии указанных последовательностей нуклеиновых кислот и сбор указанного биспецифического антитела из культуры.

24. Биспецифическое антитело класса IgG, содержит первое плечо, которое специфически распознает член А семейства 12 доменов лектинов С-типа (CLEC12A) и второе плечо, которое специфически распознает CD3, которое получается способом по любому из пп.21-23.

25. Фармацевтическая композиция для лечения лейкоза или предлейкозного заболевания миелоидного происхождения или В-клеточных лимфом, содержащая биспецифическое антитело класса IgG по любому из пп.1-20 или 24 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Применение биспецифического антитела класса IgG по любому из пп.1-20 или 24 в качестве фармацевтического средства для лечения лейкозов или предлейкозных заболеваний миелоидного происхождения или В-клеточной лимфомы или миелодиспластического синдрома (MDS) или хронического миелолейкоза (CML) или острого миелоидного лейкоза (AML).

27. Применение биспецифического антитела класса IgG по любому из пп.1-20 или 24 для получения лекарственного средства для лечения или профилактики лейкозов или предлейкозных заболеваний миелоидного происхождения или В-клеточной лимфомы или миелодиспластического синдрома (MDS) или хронического миелолейкоза (CML) или острого миелоидного лейкоза (AML).

CLL-1: предсказанная аминокислотная последовательность Bakker et al.2004
 KLRL1: транслированная аминокислотная последовательность Han et al.2004 (= Zhang/Cao group; депонированная под № AF247788)
 MICL: предсказанная аминокислотная последовательность Marshall et al.2004 (депонированная под № AY498550)
 DCAL-2: предсказанная аминокислотная последовательность Chen et al.2006 (= E.A. Clark group, депонированная под № AY426759)
 CLEC12B: предсказанная аминокислотная последовательность H.F. Clark et al. 2003 (депонированная под № AY358810)

```

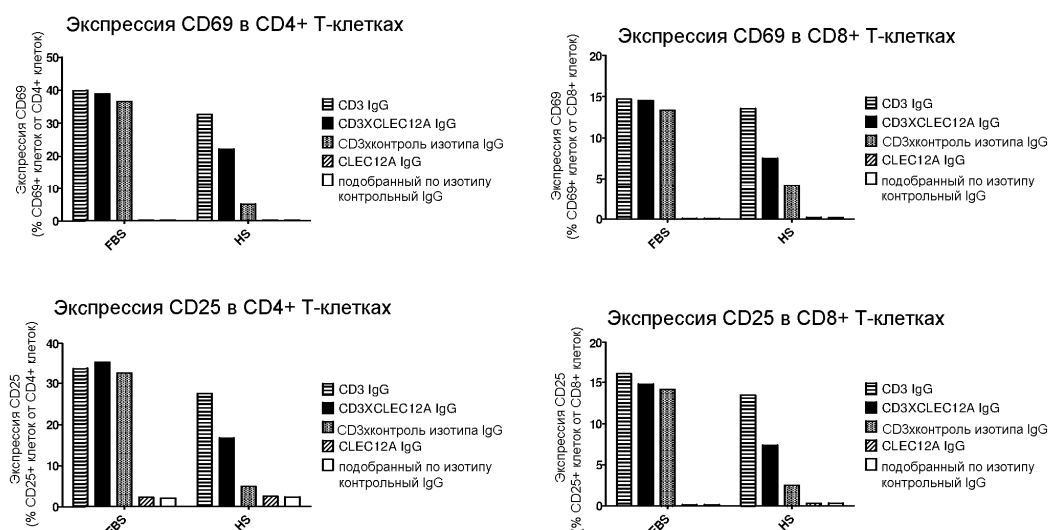
KLRL1      -----MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLLCLLLLIGLGLVSLASFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
MICL       -----MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLLCLLLLIGLGLVSLASFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
DCAL-2     -----MSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLLCLLLLIGLGLVSLASFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
CLL-1     MWIDFFTYSSMSEEVTYADLQFQNSSEMEKIPEIGKFGEKAPPAPSHVWRPAALFLLCLLLLIGLGLVSLASFHVTLK---IEMKKMNKLQNI
CLEC12B    -----MSEEVTYATLTFQDSAGARNNRDGNLNRKRGHAPSPPIWRHAALGLVTLCLMLLIGLGLVSLGMFLQISNDINSSEKLSQLQKT

KLRL1      SEELQRNLSLQMSNMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSYFSL- DDVQTWQESKMACAAQNAS
MICL       SEELQRNLSLQMSNMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSYFSL- DDVQTWQESKMACAAQNAS
DCAL-2     SEELQRNLSLQMSNMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSYFSL- DDVQTWQESKMACAAQNAS
CLL-1     SEELQRNLSLQMSNMNI-----SNKIRNLSTTLQTIATKLCRELYSKEQEHKCKPCPRRWIWHKDSYFSL- DDVQTWQESKMACAAQNAS
CLEC12B    IQQQDNLSQQLGNSNNLSMEEFLKSQISSVLKRQEQAIAKLQELIHTSDHRCNCPKMWQWYQNSCYFFTTNEEKTWANSRKDCIDKNST

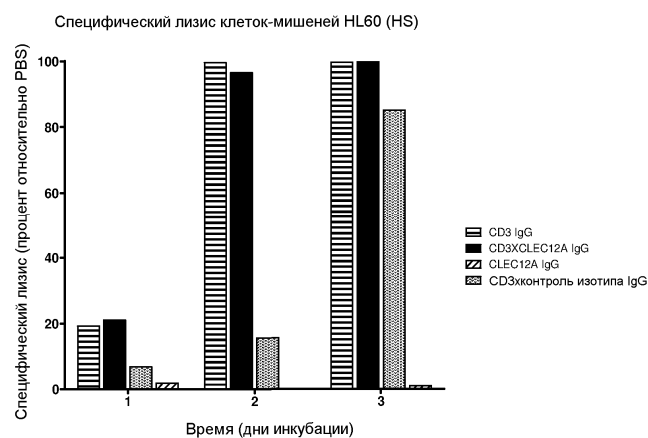
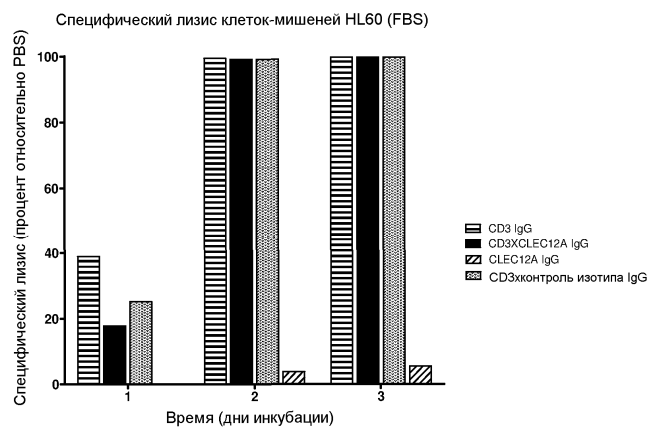
KLRL1      LLKINNKNALFEIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLVQYHYHCTYKQRMICEKMANPVQL
MICL       LLKINNKNALFEIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLVQYHYHCTYKQRMICEKMANPVQL
DCAL-2     LLKINNKNALFEIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLVQYHYHCTYKQRMICEKMANPVQL
CLL-1     LLKINNKNALFEIKSQSRS--YDYWLGLSPEEDSTRGMRVDNIINSSAW-VIRNAPDL-NNMYCGYINRLVQYHYHCTYKQRMICEKMANPVQL
CLEC12B    LVKIDSLSEKDFLMSQPLLMFSFFWLGLSWDSSGRSFWFEDGWSVPSPSLFSTKELDQINGSGKCAFYQKGNIIYSRCSAEIFWICEKTAAPVKT

KLRL1      GSTYFREA
MICL       GSTYFREA
DCAL-2     GSTYFREA
CLL-1     GSTYFREA
CLEC12B    EDLD----
```

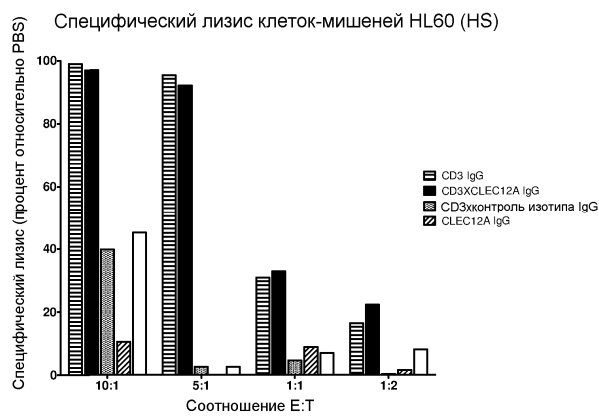
Фиг. 1



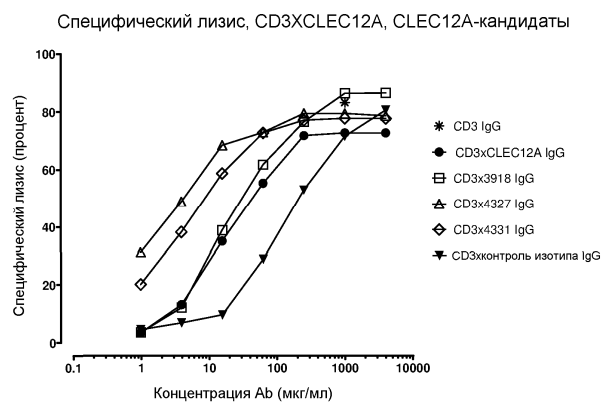
Фиг. 2



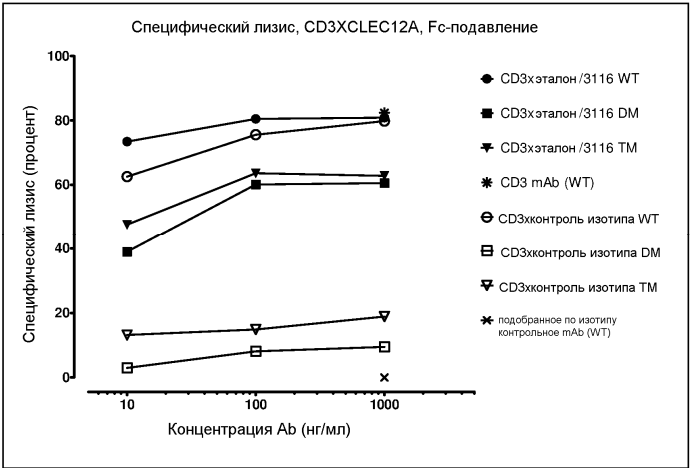
Фиг. 3



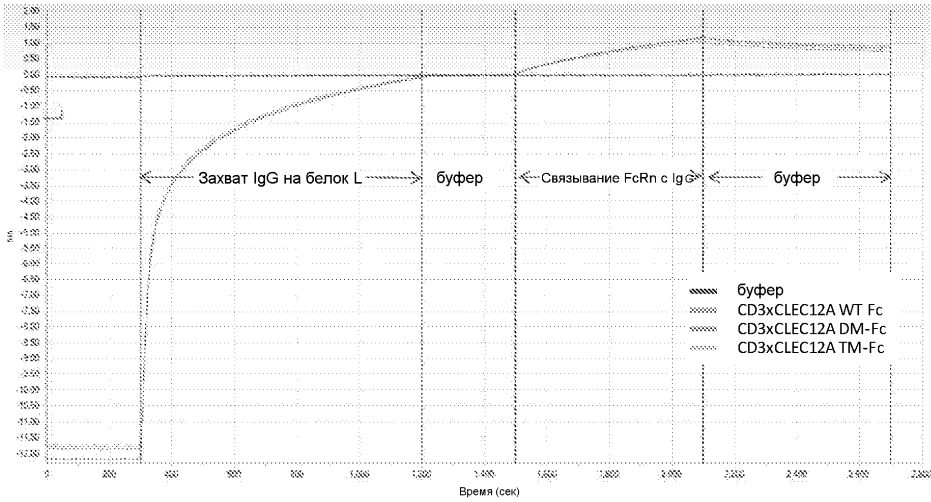
Фиг. 4



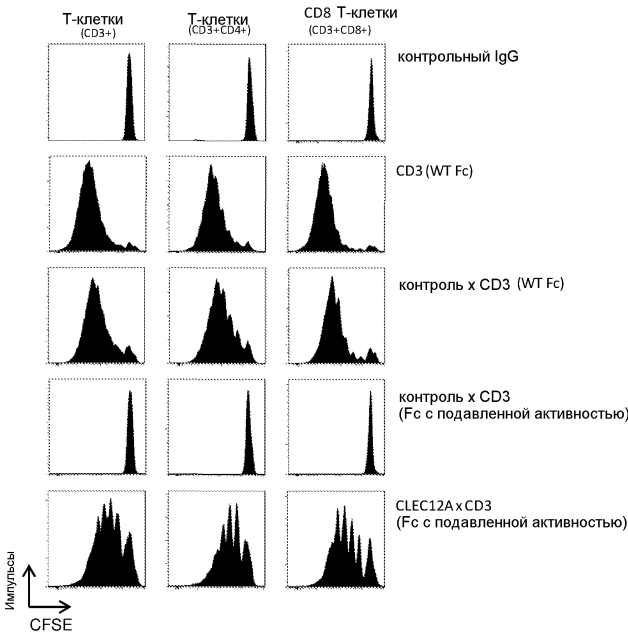
Фиг. 5



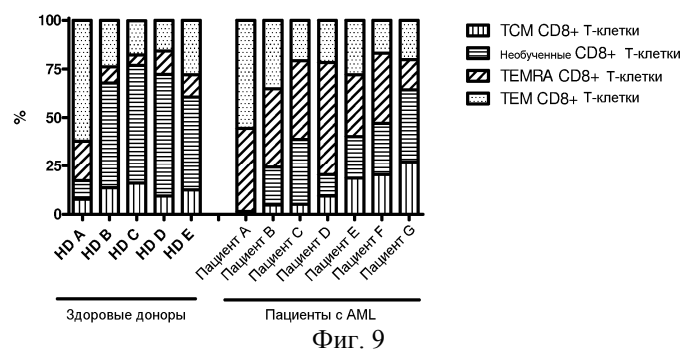
Фиг. 6



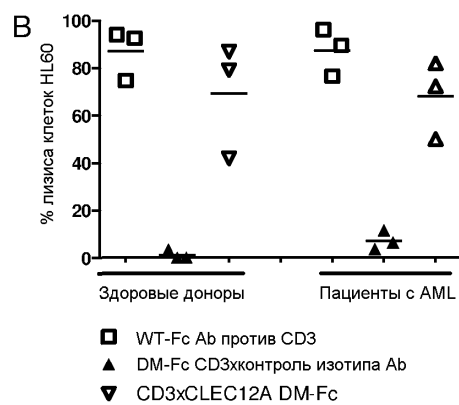
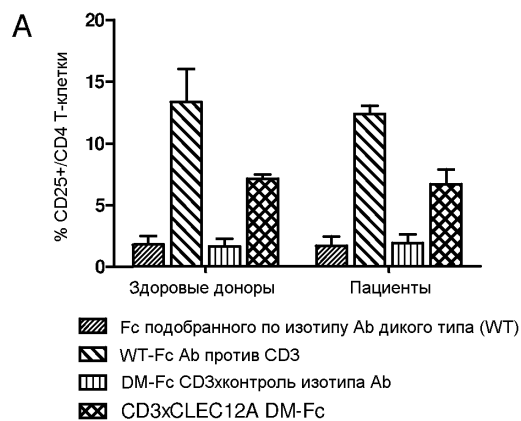
Фиг. 7



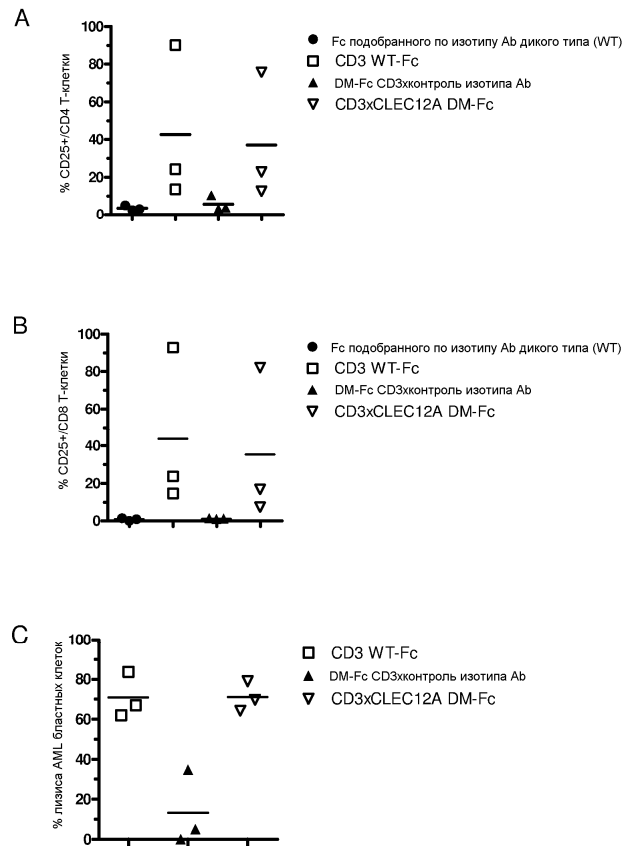
Фиг. 8



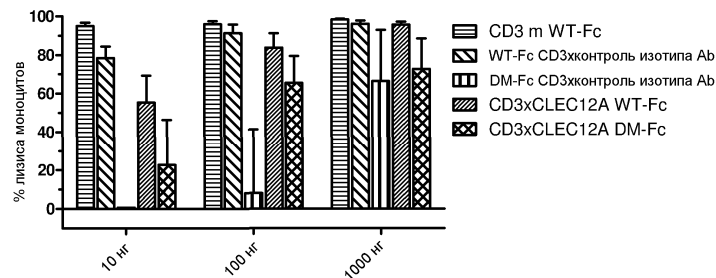
Фиг. 9



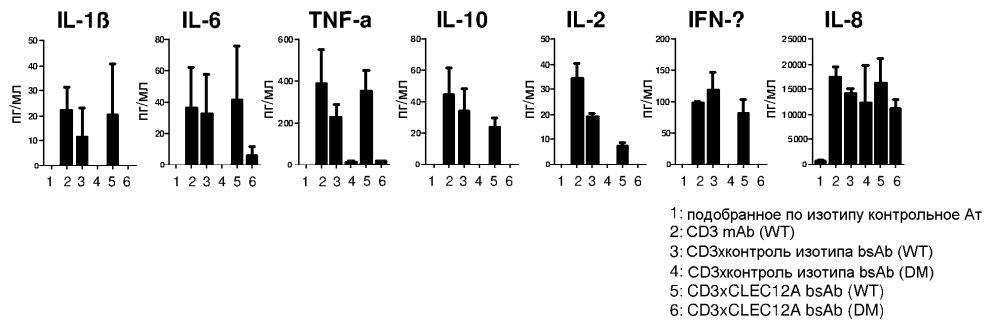
Фиг. 10



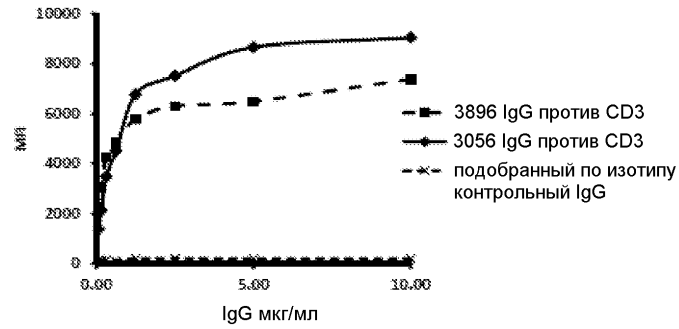
Фиг. 11



Фиг. 12

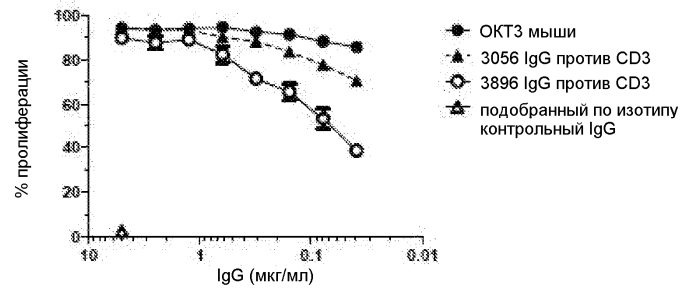


Фиг. 13

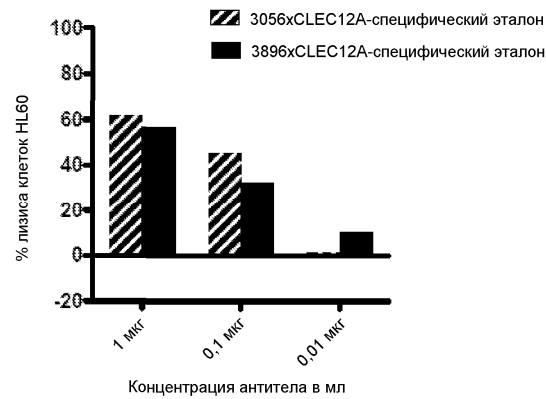


Фиг. 14А

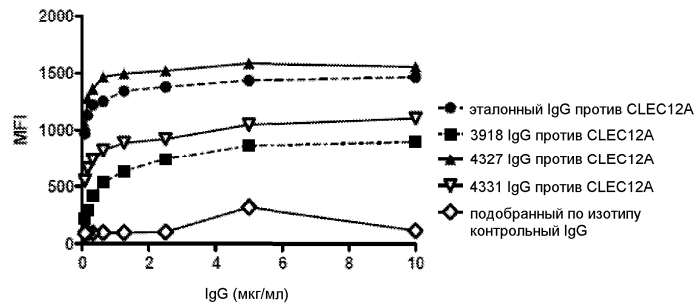
Пролиферация Т-клеток



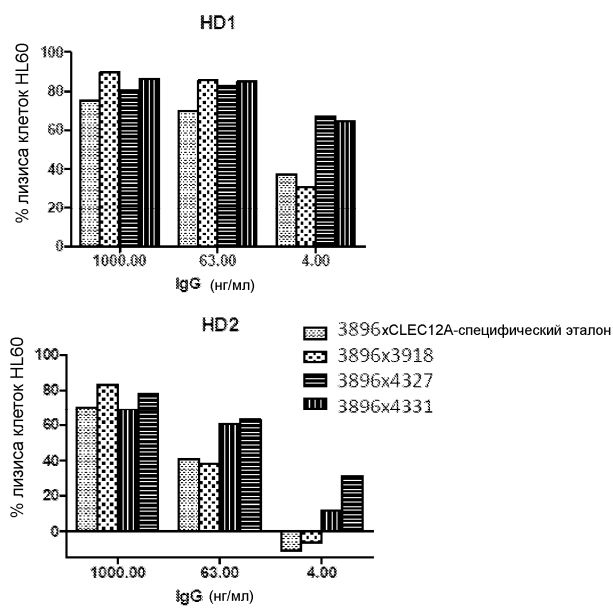
Фиг. 14В



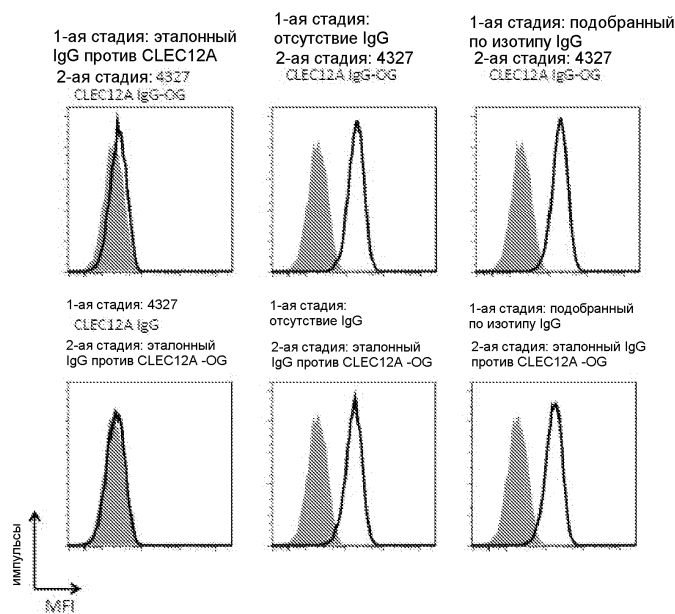
Фиг. 15



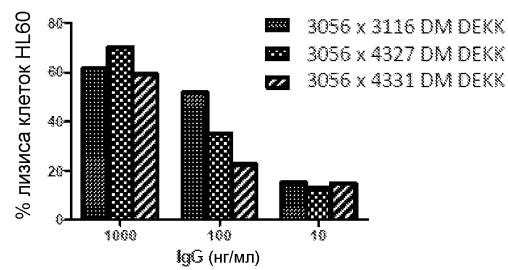
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19

3056

VH (VDI):

caggtgcagctggtgcagctctggcggcggagtggtgcagcccggcagaagcctgagactgagctgcgtgg
ccagcggcttcaccttcagcagctacggcatgcaactgggtccgccaggccctggcaagggactggaatg
ggtggccgcatctggtacaacggccggaagcaggactacgcgcagacgctgaagggccggttcaccatc
agccgggacaaacagcaagaacacccctgtacctgcagatgaacagcctccgggcccaggacacgcgctgt
actactgtaccgggggacccggtacaattggttcgacccttggggccagggcacccctggtcaccgctc
cagt

QVQLVQSGGCVVQPGRLRLSCVASGFTFSRYGMHWRQAPGKGLEWVAATWYNGRKQSYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRTGYNWFDWQGQTLTVTSS

VL/O12 (VI):

Gacatccagatgacccagctctccatcctccctgtctqcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggca
agtccagagcattagcagctacttaaattgggtatcagcagaaaccagggaagccctaaagctcctgatctatgct
gcatccagtttgcaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggaatctgggacagatttcactctcaccatc
agcagctctgcaacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagttaccctccaacgltcgccaa
gggaccaaggtggagatcaaac

DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSTSSFLNHWYQQKPKAPKLLIYANSSLOSGVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLLQPEDFATYYCQSISTFFTFGQGTKEIK

3896

VH:

caggtgcagctggtggagctctggcggcggagtggtgcagcccggcagaagcctgagactgagctgcgcgg
ccagcggcttcaccttcagaagctacggcatgcaactgggtccgccaggccctggcaagggactggaatg
ggtggccatcatctggtacagcggcagcaagaactacgcgcagacgctgaagggccggttcaccatc
agccgggacaaacagcaagaacacccctgtacctgcagatgaacagcctccgggcccaggacacgcgctgt
actactgtgcccggggacccggtacaattggttcgacccttggggccagggcacccctggtcaccgctc
cagt

QVQLVESGCGVVQPGRLRLSCAASGFTFRSYGMHWRQAPGKGLEWVAITWYSGSKKNYADSVKGRFTI
SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGTGYNWFDWQGQTLTVTSS

VL:

O12

СЛЕС12GA СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ЭТАЛОН (3116)

VH:

caggtgcagctgcaggaatctggaccggactgggtcaagcccagcgagacactgagcctgacctgtgtgg
tgtccggcggcagcatcagcagcagcaattggtggtcttgggtccgacagccctggcaagggccttgg
atggatcggcgagatctaccacagcggcagcccgactacaaccccagcctgaagtccagagtgaccatc
agcgtggacaagagccggaaacaggttcagcctgaagctgagcagcgtgacagccgcgcataccgcgctgt
actactgcgccaaagtgtccaccggcggtcttctcgactactggggccagggcacactggtcaccgctc
cagt

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVVSQGSISSSNWWSWVRQPPGKGLEWIGRIYHSGSPDYNPSLKSRTI
SVDKSRNQFSLKLSSVTADTAVYYCAKYSTGGSFDYWGQTLVTSS

VL:

O12

3918

VH:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgagggtctcctgcaagg
cttcctggatacaccttcaccggctactatatgcactgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtg
gatgggatggatcaaccctaacagtggtggcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcacgatg
accagggacagctccatcagcacagcctacatggagctgagcaggctgagatctgacgacacggccgtgt
attactgtgcaagagatggttactctcgctgacgcctttgattattggggccaaggtaccctggtcaccg
ctccagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTGYMHWVRQAPGQGLEWMGNIINPNSGGTNYAQKFQGRVTM
TRDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYYCARDGYFADAFDYWGQTLTVTSS

VL:

O12

4327

VH:

caggtgcagctggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgagggtttcctgcaagg
catctggatacaccttcaccagctactatatgcactgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtg
gatgggaataatcaaccctagtgggtgtagcaaacgctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccacgagcacagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaagggcactactggtgattggtttgactactggggccaaggtaccctggtcaccgctc
cagt

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSTGYMHWVRQAPGQGLEWMGNIINPNSGGTSYAQKFQGRVTM
TRDTSISTVYMESSLRSEDITAVYYCAKSTGDFWFDYWGQTLTVTSS

040393

VL:
O12

4331
VH:

gagggtccagctgggtgcagctctggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgagggtttcctgcaagg
catctggatacaccttcaccagctactatatgcactgggtgcgacaggccctggacaagggccttgagtg
gatgggaataatcaaccctagtggtggtgtagcacaagctacgcacagaagttccagggcagagtcaccatg
accagggacacgtccacgagcacagtcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgt
attactgtgcaaggggcaatttatggtgatgagtttgactactggggccaaggtacccctggtcaccgtctc
cagt

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQYTFSSXYMHWVRQAPQGLEWMCINPSGGSTSYAQKFQGRVTM
TRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARQNYGDEFFDYWGQGLVTVSS

VL:
O12

Фиг. 20



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
