

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040507**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.14

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

(21) Номер заявки
202090944

(22) Дата подачи заявки
2018.10.22

(54) **АНТИ-CD3-АНТИТЕЛО И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, СОДЕРЖАЩАЯ ЕГО**

(31) **10-2017-0136564**

(56) KR-A-1020140033107
KR-A-1020150046789
KR-A-1020050000376
WO-A2-2007042261
KR-A-1020170010863

(32) **2017.10.20**

(33) **KR**

(43) **2020.07.31**

(86) **PCT/KR2018/012492**

(87) **WO 2019/078697 2019.04.25**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН;
МОГАМ ИНСТИТЪЮТ ФОР
БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (KR)**

(72) Изобретатель:
**Ким Ки Су, Дзеонг Дзун Хонг, Йоон
Ае Рин, Сонг Еун Дзунг, Чои Хие
Дзи, Лим Ок Дзае, Ли Юн Дзунг, Лим
Хиунг Квон, Вон Дзонг Вха (KR)**

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

(57) Изобретение относится к анти-CD3-антителу и фармацевтической композиции для лечения онкологического заболевания, содержащей его. Анти-CD3-антитело по настоящему изобретению обладает высокой аффинностью и специфичностью к CD3 и, таким образом, может быть эффективно использовано для профилактики или лечения онкологического заболевания.

040507
B1

040507
B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к анти-CD3-антителу и фармацевтической композиции для лечения онкологических заболеваний, содержащей его.

Уровень техники

Среди различных причин смертности часто имеет место смерть в результате онкологических заболеваний, которые составляют вторую по величине долю летальных исходов. В прошлом предпринимались различные попытки лечения онкологических заболеваний. В настоящее время в отношении способов лечения онкологических заболеваний они сводятся к введению противоопухолевого средства, лучевой терапии или хирургической операции. Однако такие способы лечения могут быть эффективными на ранних стадиях злокачественного заболевания и имеют низкий терапевтический эффект на терминальных стадиях онкологических заболеваний, когда заболевание распространилось на другие ткани или когда имеет место его рецидив.

В последние годы внимание было обращено на исследование адоптивной клеточной иммунотерапии, где рак лечат, подвергая лимфоциты, выделенные из периферической крови пациента, массовому культивированию *in vitro*, и затем повторной трансплантации культивированных лимфоцитов пациенту. Кроме того, также в процессе разработки находится способ, в котором токсичным Т-клеткам, специфичным для опухолевых клеток, обеспечивается возможность элиминировать опухолевые клетки, подвергая иммунные клетки, выделенные из периферической крови пациента, массовой пролиферации *in vitro*, подвергая пролиферированные иммунные клетки обработке антигенами, такими как лизаты опухолевых клеток, так что в результате иммунные клетки активируются, и затем полученные иммунные клетки вводятся пациенту повторно.

Техническая проблема

Настоящее изобретение выполнено для решения вышеуказанных проблем предшествующего уровня техники. Целью настоящего изобретения является обеспечение антитела, обладающего высокой аффинностью связывания с CD3, и фармацевтической композиции, обладающей высокой эффективностью лечения онкологических заболеваний, с использованием его.

Однако проблема, решаемая настоящим изобретением, не ограничивается вышеуказанными проблемами, и другие проблемы, которые не были упомянуты, будут понятны специалистам в данной области техники из следующего описания изобретения.

Решение проблемы

В аспекте настоящего изобретения обеспечивается антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи (VL-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 15 или 16, и вариабельную область тяжелой цепи (VH-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 18-25.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается полинуклеотид, который кодирует вариабельную область легкой цепи (VL-область) и вариабельную область тяжелой цепи (VH-область) антитела.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ получения антитела, которое специфически связывается с CD3, включающий стадию культивирования клетки-хозяина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается фармацевтическая композиция для профилактики или лечения онкологических заболеваний, содержащая антитело или его фрагмент.

Преимущественные эффекты изобретения

За счет высокой аффинности и специфичности к CD3 антитело против CD3 по настоящему изобретению можно эффективно применять для профилактики или лечения рака.

Следует понимать, что эффект настоящего изобретения не ограничивается вышеописанными эффектами, и оно включает все эффекты, которые вытекают из конфигурации изобретения, описанного в разделе "Подробное описание" или формуле настоящего изобретения.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 показаны результаты, полученные в анализе аффинности связывания с человеческими Т-клетками, антител в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

На фиг. 2 показаны результаты, полученные в анализе аффинности связывания с Т-клетками обезьяны, антител в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения.

Подробное описание изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

В аспекте настоящего изобретения обеспечивается антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи (VL-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 15 или 16, и вариабельную область

тяжелой цепи (VH-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 18-25.

Вариабельная область легкой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 15 или 16.

Вариабельная область тяжелой цепи может состоять из аминокислотной последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 18-25.

Антитело, содержащее вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, может специфически связываться с кластером дифференцировки (CD3). Здесь антитело может обладать перекрестной реактивностью с CD3 человека или обезьяны. То есть, CD3 может включать, не ограничиваясь этим, CD3, происходящий от человека, и CD3, происходящий от обезьяны.

Как здесь используется, термин "CD3" может относиться к понятию, которое в совокупности относится к самому CD3 и любому его варианту, изотипу и паралогу, которые присутствуют у животного и предпочтительно у человека и обезьяны. Кроме того, как здесь используется, термин "человеческий CD3" относится к CD3, происходящему от человека. Как здесь используется, термин "CD3 обезьяны" относится к CD3, происходящему от обезьяны.

Как здесь используется, термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина (Ig), которая иммунологически реагирует с определенным антигеном, т.е. белковой молекуле, которая функционирует в качестве рецептора, который специфически распознает антиген. Кроме того, антитело может представлять собой полное антитело или фрагмент антитела.

В вариабельных областях легкой и тяжелой цепей некоторые аминокислоты могут быть замещены, вставлены и/или делецированы при условии, пока сохраняются свойства, соответствующие объекту настоящего изобретения, такие как аффинность и специфичность к CD3. Например, консервативные аминокислотные замены могут иметь место в вариабельных областях легкой и/или тяжелой цепи. Консервативная замена означает замену исходной аминокислотной последовательности другим аминокислотным остатком, имеющим сходные с ним свойства.

Например, лизин, аргинин и гистидин имеют сходные свойства в том, что они имеют основную боковую цепь, и аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота имеют сходные свойства в том, что они содержат кислую боковую цепь. Кроме того, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин и триптофан имеют сходные свойства в том, что они содержат незаряженную полярную боковую цепь; аланин, валин, лейцин, треонин, изолейцин, пролин, фенилаланин и метионин имеют сходные свойства в том, что они содержат неполярную боковую цепь; и тирозин, фенилаланин, триптофан и гистидин имеют сходные свойства в том, что они содержат ароматическую боковую цепь.

Следовательно, специалистам в данной области техники очевидно, что аминокислотные замены в группе аминокислот, имеющих сходные свойства, как описано выше, не будут вызывать какого-либо существенного изменения свойств. По этой причине антитела, которые претерпели изменения, вызванные консервативной заменой в вариабельной области, также включаются в объем настоящего изобретения, если такие антитела сохраняют свойства антитела по настоящему изобретению.

С другой стороны, антитело может специфически связываться с Т-клетками, конкретно с поверхностью Т-клеток, посредством специфического связывания с CD3. Здесь Т-клетки могут включать, не ограничиваясь этим, человеческие Т-клетки и Т-клетки обезьяны.

То есть, когда антитело находится в организме, то такое антитело может привлекать Т-клетки посредством специфического связывания с CD3. Соответственно, привлеченные Т-клетки могут индуцировать иммунные ответы в непосредственной близости от них и могут дополнительно "атаковать" опухоли, такие как опухолевые клетки и т.п.

Вариабельные области легкой и тяжелой цепей антитела могут состоять из определяющих комплементарность участков (CDR) и каркасных областей (FR). Как правило, CDR обеспечивают специфичность связывания со специфическими антигенами, и FR функционируют для формирования свернутой структуры антитела для поддержания связывания CDR или т.п.

Антитело может представлять собой антитело, которое сохраняет CDR существующего мышинового анти-CD3-антитела SP34, в котором аминокислоты константной области (Fc) и FR вариабельной области SP34 частично или полностью замещены их человеческими аналогами.

Антитело может содержать CDR1 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; CDR2 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; CDR3 легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31; CDR1 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; CDR2 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и CDR3 тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34.

Следовательно, антитело может представлять гуманизованное антитело, которое специфически

связывается с CD3 человека. Как здесь используется, термин "гуманизированное антитело" относится к химерному антителу, которое содержит минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина антитела, отличного от человеческого, такого как мышинное антитело, и может означать такое антитело, в котором все части, за исключением последовательности, соответствующей гипервариабельной области, замещены их человеческими аналогами.

Кроме того, термин "гипервариабельная область (HVR)" относится к области переменного домена, которая проявляет гипервариабельность или образует структурно определенную петлю в последовательности антитела. Среди определений, идентифицирующих ее, определение определяющего комплементарного участка (CDR) согласно системе Kabat чаще всего используется для классификации областей на основе вариабельности последовательности.

Также можно использовать фрагмент антитела при условии, что фрагмент антитела сохраняет функцию антитела. Антитело или фрагмент антитела могут включать, не ограничиваясь этим, одноцепочечные антитела, диатела, триатела, тетраатела, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fd, scFv, доменные антитела, мини-тела, scAb, IgD антитела, IgE антитела, IgM антитела, IgG1 антитела, IgG2 антитела, IgG3 антитела, IgG4 антитела, производные константных областей антител, искусственные антитела на основе белковых каркасов и т.п., которые сохраняют функцию связывания с CD3.

Между тем, антитело также можно использовать в форме конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), полученного посредством связывания антитела с противоопухолевым лекарственным средством, обладающим эффективностью ингибирования пролиферации опухолевых клеток. Как здесь используется, термин "противоопухолевое" включает "профилактическое" и "лечебное" воздействие на злокачественную опухоль, и "профилактика" означает любое действие, направленное на ингибирование или задержку развития онкологического заболевания. Кроме того, "лечение" означает любое действие, направленное на ослабление или целебное изменение симптомов онкологического заболевания.

Лекарственное средство, которое можно использовать в конъюгате антитело-лекарственное средство, включает любое соединение, обладающее цитотоксическим или цитостатическим действием, и часть или функциональную группу соединения. Примеры лекарственного средства включают ингибиторы полимеризации микротубулина, ингибиторы мейоза, ингибиторы РНК-полимеразы, ингибиторы топоизомеразы, интеркаляторы ДНК, алкиляторы ДНК, ингибиторы рибосомы, миРНК, sh-РНК, si-РНК, радиоизотопы и токсины, среди которых можно использовать по меньшей мере одно соединение.

Лекарственное средство может включать, не ограничиваясь этим, майтанзиноид, ауристин, доластин, трихотецен, CC1065 (NSC 298223), калихеамицин, таксан, антрациклин, метотрексат, адриамицин, виндезин, алкалоиды барвинка (винкрестин, винбластин, этопозид), доксорубицин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, даунорубицин, дауномицин, этопозид, тенипозид, карминомицин, аминоптерин, дактиномицин, митомицины, блеомицины, эсперамицины, другие энединовые антибиотики, 5-фторурацил, другие азотистые иприты и их стереоизомеры, изостеры, гомологи или производные, цисплатин и гомологи цисплатина, другие интеркаляторные ферменты и их фрагменты, например нуклеазы, антибиотики, токсины (ферментативно активные токсины или низкомолекулярные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения) и различные противоопухолевые или противораковые агенты, такие как цисплатин, СРТ-11, паклитаксел и доцетаксел.

Кроме того, радиоизотоп (радионуклид) включает ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁵¹Cr, ⁵⁷Co, ⁵⁸Co, ⁵⁹Fe, ⁹⁰Y, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁸⁶Re и т.п. Также можно использовать микроРНК (миРНК), si-РНК, sh-РНК и т.п., которые могут ингибировать экспрессию некоторых онкогенов.

Связывание анти-CD3-антитела с лекарственным средством предпочтительно достигается конъюгацией с использованием функциональной группы, такой как тиоловая группа аминокислотного остатка, такого как лизин или цистеин, в антителе. При необходимости также можно провести конъюгацию в линкер-опосредованной форме, которая обычно используется. Также можно использовать линкер на основе малеимида или йодацетамида.

Когда лекарственное средство конъюгировано с антителом или его фрагментом, то лекарственное средство может быть конъюгировано с С-концевым сайтом, противоположным антигенсвязывающему сайту, для снижения влияния на способность или специфичность связывания антитела или фрагмента с CD3 и т.п. Когда используется полное антитело, а не его фрагмент, то лекарственное средство может быть конъюгировано с Fc-областью.

Кроме того, антитело также можно использовать в качестве терапевтического агента на основе химерного антигенного рецептора (CAR), содержащего его. Примеры такого терапевтического средства предпочтительно включают, не ограничиваясь этим, терапевтические средства на основе Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т-клетка) или природной клетки-киллера с химерным антигенным рецептором (CAR-NK-клетка).

Антитело также можно использовать в форме биспецифического антитела, включающего антитело против CD3. Биспецифическое антитело представляет антитело, которое обладает способностью связываться с двумя антигенами одновременно и, как правило, может находиться в форме, в которой пары тяжелых и легких цепей, которые связываются с различными антигенами, соединены друг с другом.

Кроме того, биспецифическое антитело доступно в форме, такой как биспецифическое одноцепочечное

чечное антитело, где фрагменты одноцепочечного антитела (scFv), в которых VL и VH связаны друг с другом посредством короткого линкерного пептида, связаны в форме scFv1-scFv2(-Fc), двойного антитела на основе однодоменного антитела (sdAb), с использованием VH и биспецифического антитела, полученного с использованием технологии BiTE (см. <http://www.micromet.de>) от Micromet, Германия.

Биспецифическое антитело может находиться в форме, в которой анти-CD3-антитело связано с антителом или его фрагментом, обладающим способностью связываться с молекулой-мишенью, специфичной для иммуноэффективной клетки. Молекула-мишень, специфичная для иммуноэффективной клетки, предпочтительно может быть выбрана, не ограничиваясь этим, из TCR/CD3, CD16 (FcγRIIIa), CD44, CD56, CD69, CD64 (FcγRI), CD89 и CD11b/CD18 (CR3).

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается полинуклеотид, кодирующий вариабельную область легкой цепи (VL-область) и вариабельную область тяжелой цепи (VH-область) антитела в соответствии с настоящим изобретением, и вектор экспрессии, содержащий его.

Полинуклеотид, который кодирует вариабельную область тяжелой цепи антитела или фрагмента антитела, т.е. ген, может быть легко получен специалистами в данной области из аминокислотной последовательности анти-CD3-антитела.

Как здесь используется, термин "вектор экспрессии" относится к рекомбинантному вектору, способному экспрессировать целевой белок в клетке-хозяине, и означает генную конструкцию, которая содержит важные регуляторные элементы, операбельно связанные с ней, для экспрессии вставленного гена. Ген, кодирующий анти-CD3-антитело, может быть вставлен в отдельный вектор или может быть использован в форме вставки в один и тот же вектор.

В частности, полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность анти-CD3-антитела, можно использовать в форме вставки в отдельный или один и тот же вектор, и полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь или ее вариабельную область, можно использовать в форме вставки в отдельный или один и тот же вектор.

Как здесь используется, термин "операбельно связанный" означает, что регуляторная последовательность экспрессии нуклеиновой кислоты и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая желаемый белок, операбельно связаны для выполнения желаемой функции. Операбельная связь с рекомбинантным вектором может быть достигнута с использованием методов генетической рекомбинации, хорошо известных в данной области, и сайт-специфическое расщепление и лигирование ДНК может быть легко достигнуто с использованием ферментов и т.п., хорошо известных в данной области.

Векторы экспрессии, подходящие для продуцирования анти-CD3-антитела, могут содержать сигнальные последовательности для нацеливания на мембраны или секреты в дополнение к регуляторным элементам экспрессии, таким как промоторы, кодоны инициации, кодоны терминации, сигналы полиаденилирования и энхансеры. Кодоны инициации и кодоны терминации обычно считаются частью нуклеотидной последовательности, кодирующей иммуногенный целевой белок. Такие кодоны должны быть функциональными у индивидуума при введении генной конструкции и должны находиться в рамке считывания с кодирующей последовательностью. В общем, промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными. Промотор может включать, не ограничиваясь этим, прокариотические промоторы, такие как lac, tac, T3 и T7, промоторы обезьяньего вируса 40 (SV40), промоторы вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторы вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), например, промотор длинного концевой повтора (LTR) ВИЧ, промоторы вируса лейкоза мышей Молони, промоторы цитомегаловируса (CMV), промоторы вируса Эпштейна-Бара (EBV), промоторы вируса саркомы Рауса (RSV), а также промоторы β-актина, эукариотические промоторы человеческого гемоглобина, человеческого креатина мышечной ткани, человеческого металлотионеина и т.п.

Вектор экспрессии может дополнительно содержать селективируемый маркер, который позволяет отбирать клетки-хозяева, содержащие его. Селективируемый маркер используется для отбора клеток, трансформированных вектором. В качестве селективируемого маркера можно использовать маркеры, которые придают селективируемый фенотип, такой как лекарственная устойчивость, ауксотрофия, устойчивость к цитотоксическим агентам или экспрессия поверхностных белков. В среде, обработанной селективным агентом, выживают только клетки, экспрессирующие селективируемый маркер, что позволяет отобрать трансформированные клетки. Кроме того, когда вектор является реплицируемым вектором экспрессии, такой вектор может содержать ориджин репликации, представляющий собой специфическую нуклеиновокислотную последовательность, из которой иницируется репликация.

В качестве рекомбинантного вектора экспрессии для вставки чужеродного гена можно использовать различные формы векторов, такие как плазмиды, вирусы и космиды. Тип рекомбинантного вектора конкретным образом не ограничивается при условии, что вектор функционирует для экспрессии желаемого гена и продуцирования желаемого белка в различных клетках-хозяевах, включая прокариотические и/или эукариотические клетки. Вектор может предпочтительно представлять вектор, способный продуцировать большое количество чужеродного белка, который находится в форме, сходной с его природным состоянием, при этом имея промотор с высокой активностью и высокой способностью экспрессии.

Для экспрессии анти-CD3-антитела можно использовать различные комбинации хозяин/вектор экс-

прессии. Вектор экспрессии, подходящий для эукариотических хозяев, включает, не ограничиваясь этим, регуляторные последовательности экспрессии, полученные из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса, аденоассоциированного вируса, цитомегаловируса и ретровируса. Вектор экспрессии, который можно использовать в бактериальных хозяевах, включает бактериальные плазмиды, полученные из *Escherichia coli*, такие как pET, pRSET, pBluescript, pGEX2T, вектор pUC, colE1, pCR1, pBR322, pMB9 и их производные; плазмиды, имеющие широкий ряд хозяев, такие как RP4; ДНК-фаги, примером которых может служить широкий ряд производных лямбда фагов, таких как λ gt10, λ gt11 и NM989; и другие ДНК-фаги, такие как M13 и нитчатые одноцепочечные ДНК-фаги. Вектор экспрессии, пригодный для дрожжевых клеток, может включать 2-микронные плазмиды и их производные. Вектор, пригодный для клеток насекомых, может представлять собой pVL941.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии в соответствии с настоящим изобретением. Вектор экспрессии может быть вставлен в клетку-хозяин с образованием трансформанта. Подходящая клетка-хозяин для вектора может включать прокариотические клетки, такие как *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis* или *Staphylococcus* sp. Кроме того, клетка-хозяин может включать эукариотические клетки, включая клетки низших эукариот из грибов, таких как *Aspergillus* sp., дрожжи, такие как *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces* sp. и *Neurospora crassa*, и другие низшие эукариоты, а также высшие эукариотические клетки, такие как клетки насекомых. Кроме того, клетка-хозяин также может быть получена из растений или млекопитающих. Предпочтительно клетка-хозяин, которую можно использовать, включает, не ограничиваясь этим, клетки почки зеленой мартышки (клетки COS7), клетки NS0 (клетки мышинной миеломы), клетки SP2/0 (клетки мышинной миеломы), другие клетки миеломной линии, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки W138 (культура диплоидных клеток человека), клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки MDCK, HuT 78, клетки HEK293 и т.п., где предпочтительными являются клетки CHO.

Как здесь используется, термин "трансформация в клетки-хозяева" предназначен для включения любого метода введения нуклеиновой кислоты в организм, клетку, ткань или орган, и такую трансформацию можно выполнить с использованием стандартной методики, известной в данной области техники, выбранной в зависимости от типа клетки-хозяина. В частности, можно использовать электропорацию, слияние протопластов, осаждение фосфатом кальция (CaPO_4), осаждение хлоридом кальция (CaCl_2), перемешивание с использованием волокна карбида кремния, трансформацию, опосредованную *Agrobacterium*, трансформацию, опосредованную пэггом, декстраном сульфатом, липофектаминам или высушиванием/ингибированием или т.п. Однако настоящее изобретение не ограничивается этими методами.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ получения антитела, которое специфически связывается с CD3, включающий культивирование клетки-хозяина. В частности, способ получения антитела может включать стадии: вставку в вектор нуклеотидной последовательности, кодирующей анти-CD3-антитело, для конструирования рекомбинантного вектора; трансформацию клетки-хозяина рекомбинантным вектором и проведение культивирования; и отделение и очистку гуманизованного антитела от культивированного трансформанта.

Гуманизированные антитела можно получить в большом количестве культивированием трансформанта, в котором экспрессируется рекомбинантный вектор, в питательной среде, и среду и условия культивирования можно соответствующим образом выбрать из тех, которые известны в данной области, в зависимости от типа клетки-хозяина. Во время культивирования такие условия, как температура, pH среды и время культивирования, могут быть соответствующим образом скорректированы, чтобы они подходили для роста клеток и массовой продукции белка.

Полученные рекомбинантным способом анти-CD3-антитела, как описано выше, можно выделить из среды или клеточного лизата. Когда антитело находится в мембраносвязанной форме, то такое антитело можно выделить из мембраны с использованием подходящего раствора поверхностно-активного вещества (например, Triton-X 100) или ферментативным расщеплением. Клетки, используемые для экспрессии гуманизированных антител, можно подвергнуть разрушению с использованием различных физических и химических способов, таких как циклы замораживания-оттаивания, обработка ультразвуком, механическое разрушение или применение агентов, лизирующих клетки, и разделение и очистку можно выполнить с использованием обычных методов биохимического разделения. Метод биохимического разделения, который можно использовать, включает, не ограничиваясь этим, электрофорез, центрифугирование, гель-фильтрацию, осаждение, диализ, хроматографию (ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию, иммуноабсорбционную хроматографию, эксклюзионную хроматографию или т.п.), изоэлектрическое фокусирование и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается фармацевтическая композиция для профилактики или лечения онкологического заболевания, содержащая антитело по настоящему изобретению или его фрагмент.

Тип онкологического заболевания, который можно лечить фармацевтической композицией, может включать как солидный рак, так и рак крови и предпочтительно может включать любые злокачественные опухоли, которые экспрессируют CD3. Здесь антитело может привлекать Т-клетки посредством специ-

фического связывания с CD3 и, таким образом, вызывать гибель опухолевых клеток.

В частности, рак может представлять, не ограничиваясь этим, рак поджелудочной железы, рак печени, рак желудка, рак легкого, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак молочной железы, рак крови, рак кожи, эпителиальный рак, рак головного мозга, рак центральной нервной системы или рак яичника.

Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. В качестве фармацевтически приемлемого носителя для перорального введения можно использовать связующее вещество, скользящее вещество, разрыхлитель, эксципиент, солубилизатор, диспергатор, стабилизатор, суспендирующий агент, пигмент, ароматизатор и т.п.; буфер, консервант, обезболивающее средство, солубилизатор, изотонический агент, стабилизатор и т.п. можно использовать в смеси для инъекций; и основу, эксципиент, скользящее вещество, консервант и т.п. можно использовать для местного применения.

Состав фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть приготовлен различными способами посредством смешивания с фармацевтически приемлемым носителем, как описано выше. Например, для перорального введения фармацевтическая композиция может быть составлена в форме таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, облаток или т.п. Для инъекций фармацевтическая композиция может быть формулирована в виде ампул с разовыми дозами или форм с множеством доз.

Кроме того, фармацевтическая композиция может содержать поверхностно-активное вещество, которое может повышать проницаемость мембраны. Такие поверхностно-активные вещества могут быть получены из стероидов или могут включать катионные липиды, такие как хлорид N-[1-(2,3-диолеил)пропил-N,N,N-триметиламмония (DOTMA)], или различные соединения, такие как холестерина гемисукцинат и фосфатидилглицерин. Однако поверхностно-активное вещество этим не ограничивается.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ лечения онкологического заболевания или ингибирования роста злокачественной опухоли, включающий введение фармацевтической композиции индивидууму. Фармацевтическую композицию, содержащую анти-CD3-антитело, можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для воздействия на опухолевые клетки или их метастазы или для ингибирования роста злокачественной опухоли. Эффективное количество может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как тип онкологического заболевания, возраст пациента, масса тела, характер и тяжесть симптомов, тип текущей терапии, количество видов лечения, лекарственная форма и способ введения, и может быть легко определено специалистами в соответствующей области.

Фармацевтическую композицию можно вводить вместе или последовательно с вышеуказанными фармакологическими или физиологическими компонентами и также можно вводить в комбинации с дополнительными обычными терапевтическими агентами, в этом случае фармацевтическую композицию можно вводить последовательно или одновременно с обычными терапевтическими агентами. Такое введение может быть однократным или многократным. Принимая во внимание все вышеуказанные факторы, важно вводить количество, которое является минимальным количеством и позволяет обеспечить максимальный эффект без проявления побочных эффектов, и такое количество может легко определить специалист в данной области техники.

Как здесь используется, термин "индивидуум" относится к млекопитающему, предпочтительно человеку, страдающему или имеющему риск развития патологического состояния или заболевания, которое можно облегчить, подавить или лечить введением фармацевтической композиции.

Как здесь используется, термин "введение" означает введение заранее определенного вещества индивидууму любым подходящим способом, и фармацевтическую композицию можно вводить любым путем при условии, что путь позволяет фармацевтической композиции достичь ткани-мишени. Такой способ введения может включать, без ограничения, внутривенное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутрикожное введение, пероральное введение, местное введение, интраназальное введение, пульмонарное введение или ректальное введение. Здесь, в случае перорального введения, с точки зрения того, что белки подвергаются перевариванию, может быть желательным формулировать композицию для перорального применения таким образом, чтобы активный агент был покрыт оболочкой или композиция была защищена от переваривания в желудке. Кроме того, фармацевтическую композицию можно вводить с использованием любого устройства, так чтобы активный ингредиент мог мигрировать в его клетку-мишень.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается применение антитела по настоящему изобретению для профилактики или лечения онкологического заболевания.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается применение антитела по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для профилактики или лечения онкологического заболевания.

В еще одном аспекте настоящего изобретения обеспечивается способ профилактики или лечения

онкологического заболевания, включающий введение антитела по настоящему изобретению индивидууму.

Наилучший способ осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью примеров. Следующие примеры описаны с целью иллюстрации настоящего изобретения, и объем настоящего изобретения этим не ограничивается.

Пример 1. Получение гуманизированных анти-CD3-антител.

Пример 1.1. Селекция антител-кандидатов для гуманизации.

Аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи (VL-область) и переменной области тяжелой цепи (VH-область) мышинового антитела SP34, известного как анти-CD3-антитело, вводили в базу данных web (IgBLAST) и затем проводили поиск наиболее сходных последовательностей эмбриональных антител человека. В результате наибольшее сходство аминокислотной последовательности было показано между переменной областью легкой цепи мышинового антитела SP34 и *Homo sapiens* IGKV7-46*01 (название гена в базе данных IMGT) и между переменной областью тяжелой цепи мышинового антитела SP34 и *Homo sapiens* IGHV1-73*02 (название гена в базе данных IMGT).

Пример 1.2. Гуманизация переменной области легкой цепи.

Аминокислотную последовательность CDR *Homo sapiens* IGKV7-46*01 (название гена в базе данных IMGT), человеческого эмбрионального антитела, имеющего последовательность, наиболее сходную с переменной областью легкой цепи антитела SP34, заменяли последовательностью CDR мышинового антитела SP34 с получением частично гуманизированной переменной области легкой цепи SP34.

Для усиления антигенсвязывающих свойств частично гуманизированной переменной области легкой цепи SP34 аминокислотные остатки в последовательностях каркасной области (FR), которые, как полагают, играют важную функцию в обеспечении антигенсвязывающих свойств, заменяли такими же аминокислотными остатками, что и в мышинном антителе SP34. Полученная таким образом аминокислотная последовательность гуманизированной переменной области легкой цепи SP34 показана в табл. 1.

Как показано в табл. 1, были сделаны случайные модификации аминокислотных остатков 38, 48, 51 и 71 переменной области легкой цепи мышинового антитела SP34 с получением в общей сложности 16 гуманизированных переменных областей легкой цепи SP34. Здесь переменную область легкой цепи мышинового антитела SP34 использовали в качестве контроля для сравнения аффинности к антигену CD3.

Таблица 1

Клон	Вариабельная область	Аминокислотная последовательность (участки, выделенные жирным шрифтом, указывают CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи по порядку)	SEQ ID NO
01	Легкая цепь	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRTLIY GTNKRAPWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	1
02	Легкая цепь	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRTLIY GTNKRAPWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	2
03	Легкая цепь	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRTLIG GTNKRAPWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	3
04	Легкая цепь	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRTLIG GTNKRAPWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	4
05	Легкая цепь	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRGLIY GTNKRAPWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	5
06	Легкая цепь n	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRGLIY GTNKRAPWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	6
07	Легкая цепь	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CRSSTGAVTTSNYA NWFQKPGQAPRGLIG GTNKRAPWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	7

08	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWFQQKPGQAPRGLIGG GNKR APWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	8
09	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRTLIG GNKR APWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	9
10	Легкая цепь п	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRTLIG GNKR APWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	10
11	Легкая цепь п	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRTLIG GNKR APWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	11
12	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRTLIG GNKR APWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	12
13	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRGLIG GNKR APWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	13
14	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRGLIG GNKR APWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	14
15	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRGLIG GNKR APWTPARFSGSLL GGKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	15
16	Легкая цепь	QAVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQQKPGQAPRGLIG GNKR APWTPARFSGSLL GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	16
		GDKAALTLGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGG GTKLTVLG	
SP34	Легкая цепь	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYA NWVQEKPDHLFTGLIG GNKR APGVPARFSGSLIG DKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGT KLTVLG	17

Пример 1.3. Гуманизация варибельной области тяжелой цепи.

Аминокислотную последовательность CDR Homo sapiens IGHV3-73*03 (название гена в базе данных IMGT), человеческого эмбрионального антитела, имеющего последовательность, наиболее сходную с варибельной областью тяжелой цепи SP34, заменяли последовательностью CDR мышинового антитела SP34 с получением частично гуманизированной варибельной области тяжелой цепи SP34.

Для усиления антигенсвязывающих свойств частично гуманизированной варибельной области тяжелой цепи SP34 аминокислотные остатки в последовательностях каркасной области (FR), которые, как полагают, играют важную функцию в обеспечении антигенсвязывающих свойств, заменяли такими же аминокислотными остатками, что и в мышинном антителе SP34. Полученная таким образом аминокислотная последовательность гуманизированной варибельной области тяжелой цепи SP34 показана в табл. 2.

Как показано в табл. 2, были сделаны случайные модификации аминокислотных остатков 49, 78, 79 и 81 в варибельной области тяжелой цепи мышинового антитела SP34 с получением в общей сложности

восемь гуманизированных переменных областей тяжелой цепи SP34. Здесь переменную область тяжелой цепи мышиного антитела SP34 использовали в качестве контроля для сравнения аффинности к антигену CD3.

Таблица 2

Клон	Переменная область	Аминокислотная последовательность (участки, выделенные жирным шрифтом, указывают CDR1, CDR2, CDR3 легкой цепи по порядку)	SEQ ID NO
A	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYC VRHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	18
B	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	19
C	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSQSTAYLQMN SLKTEDTAVYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	20
D	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV GRIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSQSTLYLQMN SLKTEDTAVYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	21
E	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTAYLQMN SLKTEDTAVYYC VRHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	22
F	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	23
G	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSQSTAYLQMN SLKTEDTAVYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	24
H	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQASGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDSQSTLYLQMN SLKTEDTAVYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	25
SP34	Тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLS CAASGFTFNTYA MNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADS VKDRFTISRDDQSILYLQMN NLKTEDTAMYYCV RHGN FGNSYVSWFAYWGQGLTVVSS	26

Пример 1.4. Клонирование гуманизированных анти-CD3-антител-кандидатов.

Каждый из генов 16 переменных областей легкой цепи, как описано выше, вставляли в вектор экспрессии pCDNA3.4 для клеток животных, содержащий константную область легкой цепи лямбда (λ -CL), и каждый из генов восьми переменных областей тяжелой цепи встраивали в вектор экспрессии pCDNA3.4 для клеток животных, содержащий константные области IgG1 (CH1, шарнирная область, CH2, CH3).

Соответствующие специфические аминокислотные последовательности для константной области легкой цепи лямбда и константной области тяжелой цепи IgG1 показаны в табл. 3.

Таблица 3

Клон	Варибельная область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO
λ	Легкая цепь	QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC	27
IgG1	Тяжелая цепь	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK	28

Пример 1.5. Трансфекция гуманизированных анти-CD3-антител-кандидатов.

За 24 ч до трансфекции клетки Epxi293F с плотностью $2,0 \times 10^6$ клеток/мл пассивировали в среде Epxi293 в термостате со встряхиванием со скоростью 125 ± 10 об/мин в условиях 37°C и 8% CO_2 . Когда выполняли трансфекцию, то измеряли количество клеток и оценивали жизнеспособность клеток для определения наличия жизнеспособности клеток на уровне 95% или выше.

Клетки помещали с титром $7,5 \times 10^7$ клеток в культуральную колбу емкостью 125 мл и затем добавляли среду Epxi293 для доведения конечного объема до 25 мл (из расчета на 30 мл). Используя среду Opti-MEM I, 30 мкг вектора, экспрессирующего антитело, смешивали с общим объемом 1,5 мл и проводили инкубацию в течение 5 мин при комнатной температуре. Для векторов антител использовали в целом 128 гуманизированных IgG1 антител SP34, полученных комбинированием вектора экспрессии для 8 варибельных областей тяжелой цепи и векторов экспрессии для 16 варибельных областей легкой цепи. В качестве вектора контрольного антитела использовали химерное мышиное/человеческое IgG1 антитело SP34. Конкретные комбинации антител показаны в табл. 4.

Таблица 4

Клон	Тяжелая цепь (VH)								
	A	B	C	D	E	F	G	H	
Легкая цепь (VL)	01	A01	B01	C01	D01	E01	F01	G01	H01
	02	A02	B02	C02	D02	E02	F02	G02	H02
	03	A03	B03	C03	D03	E03	F03	G03	H03
	04	A04	B04	C04	D04	E04	F04	G04	H04
	05	A05	B05	C05	D05	E05	F05	G05	H05
	06	A06	B06	C06	D06	E06	F06	G06	H06
	07	A07	B07	C07	D07	E07	F07	G07	H07
	08	A08	B08	C08	D08	E08	F08	G08	H08
	09	A09	B09	C09	D09	E09	F09	G09	H09
	10	A10	B10	C10	D10	E10	F10	G10	H10
	11	A11	B11	C11	D11	E11	F11	G11	H11
	12	A12	B12	C12	D12	E12	F12	G12	H12
	13	A13	B13	C13	D13	E13	F13	G13	H13
	14	A14	B14	C14	D14	E14	F14	G14	H14
	15	A15	B15	C15	D15	E15	F15	G15	H15
	16	A16	B16	C16	D16	E16	F16	G16	H16

Используя среду Opti-MEM I, 80 мкл реагента для трансфекции смешивали с общим объемом 1,5 мл и проводили инкубацию в течение 5 мин при комнатной температуре. Среду Opti-MEM I, соответственно содержащую вектор и реагент для трансфекции, осторожно перемешивали и оставляли взаимодействовать при комнатной температуре на 20 мин. Затем полученную смесь помещали в колбу, содержащую

клетки Eхr1293F. Инкубацию проводили в термостате со встряхиванием со скоростью 125 ± 10 об/мин в течение 16-20 ч при 37°C и 8% CO_2 . Затем добавляли 1,5 мл усилителя трансфекции I и 150 мкл усилителя трансфекции II и проводили инкубацию в течение 6 суток для получения антител-кандидатов.

Пример 1.6. Очистка антител.

Инкубационную смесь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и затем удаляли клеточный дебрис с получением супернатанта. 0,2 мл смолы Mabselect Xtra добавляли на колонку и уравнивание проводили с использованием буфера, связывающегося с белком А, в объеме, соответствующем 10-кратному объему смолы.

Затем супернатант загружали на колонку под действием силы тяжести. После завершения загрузки колонку промывали буфером, связывающимся с белком А, в объеме, соответствующем 10-кратному объему смолы.

Затем на колонку добавляли элюирующий IgG буфер и проводили элюирование. Элюат нейтрализовали добавлением 25 мкл 1,5 М Трис-Cl на 1 мл элюата. Затем концентрацию элюата измеряли при OD 280 нм. Элюент, для которого была измерена концентрация, подвергали диализу с буферным обменом с PBS.

Пример 2. Селекция гуманизированных анти-CD3-антител.

Твердофазный иммуоферментный анализ (ELISA) использовали для селекции антител, проявляющих аффинность к CD3 человека и CD3 обезьяны, из общего числа 128 комбинаций анти-CD3-антител (SP34).

В частности, рекомбинантный гетеродимер CD3 ϵ / β человека или обезьяны Cynomolgus разводили буфером для покрытия и использовали для обработки 96-луночного планшета. Планшет выдерживали при 4°C в течение 12 ч или более. Затем буфер удаляли и обрабатывали 1% раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA)/PBS при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем раствор удаляли. Затем лунки, покрытые рекомбинантным CD3, обрабатывали растворами клеточных культур, экспрессирующих антитела, в течение примерно 1 ч.

Лунки промывали раствором 0,05% Твин-20/PBS и затем проводили обработку человеческим IgG антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена, которое было разведено в 1% растворе BSA/PBS, при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем раствор удаляли и лунки промывали раствором 0,05% Твин-20/PBS.

Раствор ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) использовали для обработки 96-луночного планшета и 96-луночный планшет выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем проводили обработку стоп-раствором и сразу определяли интенсивность развития окрашивания при длине волны поглощения 450 нм. Среди кандидатов гуманизированных антител SP34 только те образцы, у которых появилась окраска, представляли клоны, которые сохраняли аффинность к CD3 мышинного антитела SP34. Конкретные результаты, полученные в анализе измерения аффинности, приведены в табл. 5.

Таблица 5

Клон	Поглощение (450 нм)			Клон	Поглощение (450 нм)		
	BSA	CD3 человека	CD3 обезьяны Cynomolgus		BSA	CD3 человека	CD3 обезьяны Cynomolgus
A01	0,107	0,152	0,098	E01	0,078	0,100	0,078
A02	0,071	0,098	0,068	E02	0,077	0,095	0,070
A03	0,092	0,132	0,094	E03	0,098	0,134	0,076
A04	0,063	0,098	0,065	E04	0,080	0,087	0,067
A05	0,152	0,167	0,141	E05	0,083	0,085	0,068
A06	0,084	0,140	0,108	E06	0,206	0,112	0,086

040507

A07	0,089	1,315	2,546	E07	0,097	0,109	0,115
A08	0,094	0,875	2,339	E08	0,106	0,074	0,099
A09	0,061	0,092	0,050	E09	0,072	0,096	0,084
A10	0,077	0,097	0,066	E10	0,064	0,083	0,065
A11	0,072	0,122	0,105	E11	0,065	0,098	0,075
A12	0,060	0,097	0,068	E12	0,059	0,088	0,064
A13	0,098	0,172	0,154	E13	0,085	0,139	0,114
A14	0,082	0,125	0,113	E14	0,068	0,105	0,078
A15	0,099	2,785	2,864	E15	0,130	2,411	2,702
A16	0,068	2,538	2,799	E16	0,089	2,399	2,736
B01	0,055	0,097	0,071	F01	0,084	0,118	0,086
B02	0,059	0,086	0,072	F02	0,062	0,093	0,076
B03	0,071	0,126	0,091	F03	0,078	0,128	0,101
B04	0,053	0,087	0,059	F04	0,057	0,084	0,069
B05	0,069	0,102	0,100	F05	0,066	0,105	0,075
B06	0,077	0,138	0,143	F06	0,079	0,115	0,096
B07	0,061	0,718	2,449	F07	0,142	0,133	0,163
B08	0,060	0,424	2,193	F08	0,076	0,134	0,180
B09	0,063	0,096	0,099	F09	0,071	0,099	0,084
B10	0,078	0,098	0,076	F10	0,068	0,118	0,091
B11	0,074	0,132	0,107	F11	0,071	0,138	0,104
B12	0,059	0,098	0,072	F12	0,090	0,090	0,077
B13	0,130	0,169	0,156	F13	0,076	0,192	0,151
B14	0,078	0,127	0,102	F14	0,071	0,114	0,100
B15	0,204	2,709	3,161	F15	0,081	2,489	2,755
B16	0,064	2,370	2,926	F16	0,066	2,455	2,855
C01	0,128	0,131	0,075	G01	0,080	0,113	0,096
C02	0,108	0,099	0,071	G02	0,075	0,146	0,069
C03	0,126	0,140	0,089	G03	0,078	0,098	0,088
C04	0,073	0,093	0,067	G04	0,067	0,129	0,063
C05	0,099	0,107	0,128	G05	0,079	0,109	0,072
C06	0,080	0,108	0,083	G06	0,095	0,118	0,078
C07	0,113	0,960	2,604	G07	0,077	0,118	0,316

C08	0,111	0,446	2,178	G08	0,148	0,137	0,119
C09	0,083	0,109	0,075	G09	0,083	0,106	0,079
C10	0,066	0,096	0,074	G10	0,072	0,099	0,079
C11	0,168	0,288	0,261	G11	0,086	0,104	0,080
C12	0,065	0,087	0,065	G12	0,057	0,085	0,065
C13	0,128	0,179	0,179	G13	0,132	0,265	0,242
C14	0,075	0,107	0,095	G14	0,075	0,105	0,099
C15	0,098	2,454	2,813	G15	0,091	2,415	2,694
C16	0,092	2,369	2,802	G16	0,108	2,482	2,773
D01	0,124	0,136	0,099	H01	0,087	0,121	0,154
D02	0,056	0,150	0,073	H02	0,125	0,111	0,080
D03	0,073	0,159	0,130	H03	0,068	0,113	0,085
D04	0,083	0,091	0,072	H04	0,055	0,077	0,068
D05	0,061	0,121	0,101	H05	0,059	0,078	0,061
D06	0,092	0,136	0,110	H06	0,086	0,134	0,101
D07	0,074	1,168	2,393	H07	0,060	0,110	0,090
D08	0,083	0,897	2,532	H08	0,091	0,118	0,136
D09	0,083	0,122	0,098	H09	0,085	0,141	0,113
D10	0,076	0,117	0,113	H10	0,055	0,088	0,077
D11	0,105	0,138	0,134	H11	0,083	0,122	0,142
D12	0,081	0,095	0,114	H12	0,060	0,099	0,083
D13	0,314	0,569	0,532	H13	0,083	0,175	0,196
D14	0,121	0,149	0,113	H14	0,064	0,096	0,094
D15	0,108	2,529	3,006	H15	0,067	2,436	2,836
D16	0,080	2,655	2,872	H16	0,080	2,461	2,873

Как видно из результатов в табл. 5, было показано, что 24 клона, A7, A8, A15, A16, B7, B8, B15, B16, C7, C8, C15, C16, D7, D8, D15, D16 E15, E16, F15, F16, G15, G16, H15 и H16 сохраняли аффинность к CD3 человека и CD3 обезьяны. Таким образом, эти 24 клона были отобраны в качестве гуманизованных анти-CD3-антител (SP34).

Пример 3. Измерение аффинности гуманизованных анти-CD3-антител к рекомбинантному CD3.

Систему Octet использовали для измерения аффинности к рекомбинантному CD3 гуманизованных анти-CD3-антител (SP34), полученных, как описано в примере 2.

В частности, раствор рекомбинантного CD3 ϵ/δ человека или обезьяны готовили в концентрации 5 мкг/мл в 1× кинетическом буфере и использовали для обработки 96-луночного планшета из расчета 200 мкл/луночку. CD3 после обработки фиксировали на биосенсоре анти-Penta His (HIS1K, Cat # 18-5121, ForteBio).

Клоны, проявившие аффинность связывания с рекомбинантным CD3 ϵ/δ человека или обезьяны по результатам ELISA, готовили в концентрации 50 нМ в 1× кинетическом буфере и обработку этим раствором проводили из расчета 200 мкл/луночку. 1× кинетический буфер получали разведением 10× кинетического буфера (ForteBio, Cat # 18-1092) в 10 раз PBS и использовали.

Взаимодействие между CD3 ϵ/δ , фиксированным на биосенсоре, и антителом в концентрации 50 нМ анализировали для расчета аффинности антиген-антитело, и результаты приведены в табл. 6.

Таблица 6

Ag	Человеческий CD3E/D			CD3E/D обезьяны Cynomolgus		
	KD (M)	kon(1/Mc)	kdis(1/c)	KD (M)	kon(1/Mc)	kdis(1/c)
cSP34	2.29E-10	2.62E+05	6.01E-05	1.40E-10	3.78E+05	5.30E-05
A7	1.95E-08	1.19E+05	2.32E-03	2.05E-08	1.53E+05	3.15E-03
B7	2.14E-08	1.98E+05	4.23E-03	3.09E-08	2.08E+05	6.42E-03
C7	2.30E-08	1.52E+05	3.49E-03	2.75E-08	1.94E+05	5.35E-03
D7	1.90E-08	1.13E+05	2.14E-03	2.00E-08	1.43E+05	2.84E-03
A8	2.22E-08	1.02E+05	2.26E-03	2.19E-08	1.47E+05	3.21E-03
B8	2.76E-08	1.48E+05	4.07E-03	2.63E-08	1.99E+05	5.25E-03
C8	2.94E-08	1.08E+05	3.17E-03	3.56E-08	1.66E+05	5.89E-03
D8	3.50E-08	8.20E+04	2.87E-03	2.16E-08	1.23E+05	2.66E-03
A15	2.96E-10	3.23E+05	9.58E-05	3.64E-10	4.53E+05	1.65E-04
B15	5.21E-10	3.71E+05	1.93E-04	6.27E-10	5.23E+05	3.28E-04
C15	4.30E-10	3.76E+05	1.62E-04	6.53E-10	5.25E+05	3.43E-04
D15	2.94E-10	3.27E+05	9.60E-05	5.33E-10	4.37E+05	2.33E-04
E15	1.74E-09	2.25E+05	3.92E-04	1.86E-09	2.90E+05	5.40E-04
F15	1.04E-09	1.97E+05	2.06E-04	1.33E-09	2.24E+05	2.97E-04
G15	1.59E-09	2.09E+05	3.32E-04	1.72E-09	2.69E+05	4.61E-04
H15	9.53E-10	1.99E+05	1.89E-04	1.17E-09	2.30E+05	2.69E-04
A16	2.93E-10	2.75E+05	8.07E-05	6.57E-10	3.70E+05	2.43E-04
B16	4.45E-10	3.22E+05	1.44E-04	6.60E-10	4.66E+05	3.08E-04
C16	4.19E-10	2.68E+05	1.12E-04	8.88E-10	3.84E+05	3.41E-04
D16	4.46E-10	2.40E+05	1.07E-04	6.11E-10	3.56E+05	2.17E-04
E16	1.76E-09	1.62E+05	2.84E-04	2.19E-09	2.20E+05	4.82E-04
F16	8.52E-10	1.41E+05	1.20E-04	1.37E-09	1.85E+05	2.53E-04
G16	1.32E-09	1.53E+05	2.01E-04	1.75E-09	1.95E+05	3.40E-04
H16	8.81E-10	1.36E+05	1.20E-04	1.13E-09	1.82E+05	2.06E-04

Как видно из результатов в табл. 6, было установлено, что все клоны демонстрируют высокую аффинность к CD3ε/δ как человека, так и обезьяны; и среди них клоны A15, B15, C15, D15, A16, B16, C16 и D16 показывают наиболее высокую аффинность.

Пример 4. Измерение аффинности гуманизированных анти-CD3-антител к Т-клеткам человека.

Проточную цитометрию использовали для измерения аффинности к Т-клеткам человека гуманизированных анти-CD3-антител (SP34), селектированных, как описано в примере 2.

В частности, клетки H9 (ATCC® HTB-176TM) готовили с титром 2×10^5 клеток в 100 мкл буфера FACS (1% FBS/FACS для покрытия) на образец антитела и затем для обработки клеток использовали 1 мкг антитела. Полученную смесь выдерживали в течение 25 мин в темноте при 4°C. Затем проводили обработку 3 мл буфера FACS и центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин. Затем супернатант отбрасывали.

Затем для обработки клеток использовали 100 мкл буфера FACS, содержащего 1 мкг человеческого IgG-антитела, конъюгированного с фикоэритрином (PE), и полученную смесь выдерживали в течение 25 мин в темноте при 4°C. Затем проводили обработку 3 мл буфера FACS и центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин. Затем супернатант отбрасывали.

Клетки обрабатывали 4% раствором формальдегида, выдерживали в темноте при 4°C в течение 30 мин и затем обрабатывали 3 мл буфера FACS. Центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин и затем супернатант отбрасывали. Проводили обработку 350 мкл буфера FACS и использовали проточный цитометр для анализа аффинности антител к Т-клеткам человека. Результаты анализа приведены на фиг. 1.

Как показано на фиг. 1, было установлено, что все антитела, которые связывались с рекомбинантным CD3ε/δ человека, также специфически связывались с Т-клетками человека.

Пример 5. Измерение аффинности гуманизированных анти-CD3-антител к Т-клеткам обезьяны.

Проточную цитометрию использовали для измерения аффинности к Т-клеткам обезьяны гуманизированных анти-CD3-антител (SP34), селектированных, как описано в примере 2.

В частности, спленоциты обезьяны готовили из расчета 10 клеток в 100 мкл раствора FACS на образец антитела и затем для обработки клеток использовали 1 мкг антитела. Полученную смесь выдержи-

вали в течение 25 мин в темноте при 4°C. Затем проводили обработку 3 мл буфера FACS и центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин. Затем супернатант отбрасывали.

Затем для обработки клеток использовали 100 мкл буфера FACS, содержащего 1 мкг PE-конъюгированного человеческого IgG-антитела и полученную смесь выдерживали в течение 25 мин в темноте при 4°C. Затем проводили обработку 3 мл буфера FACS и центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин. Затем супернатант отбрасывали.

Клетки обрабатывали FITC-конъюгированным анти-CD20-антителом, PE-Cy5-конъюгированным анти-CD14, антителом 7-AAD, APC-Cy7-конъюгированным анти-CD16-антителом или V450-конъюгированным анти-CD45-антителом, и полученные смеси выдерживали в течение 25 мин в темноте при 4°C. Затем проводили обработку 3 мл буфера FACS и центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин. Затем супернатант отбрасывали.

Клетки обрабатывали 4% раствором формальдегида, выдерживали в темноте при 4°C в течение 30 мин и затем обрабатывали 3 мл буфера FACS. Центрифугирование проводили при 2000 об/мин в течение 3 мин и затем супернатант отбрасывали. Проводили обработку 350 мкл буфера FACS и использовали проточный цитометр для анализа аффинности антител к Т-клеткам обезьяны. Результаты анализа приведены на фиг. 2.

Как показано на фиг. 2, было установлено, что все антитела, которые связывались с рекомбинантным CD3ε/δ обезьяны, также специфически связывались с Т-клетками обезьяны.

Несмотря на то, что варианты осуществления были описаны с помощью ограниченного числа примеров и фигур, приведенных выше, специалистам в данной области техники будет очевидно, что можно сделать различные изменения и модификации без отклонения от сущности и объема изобретения. Например, желаемых результатов можно достичь даже в случае, когда описанные методики выполняются в другом порядке, чем описанный способ, и/или описанные компоненты составлены или объединены в форме, отличной от описанного способа, или заменены или замещены другими компонентами или эквивалентами.

Следовательно, другие выполнения, другие варианты осуществления и эквиваленты прилагаемой формулы изобретения попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, специфически связывающееся с кластером дифференциации 3 (CD3), где антитело содержит

вариабельную область легкой цепи (VL-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 15 или 16; и

вариабельную область тяжелой цепи (VH-область), состоящую из последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью с аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 18-25.

2. Антитело по п.1, где CD3 включает CD3, происходящий от человека, и CD3, происходящий от обезьяны.

3. Антитело по п.1, в котором антитело специфически связывается с Т-клетками.

4. Антитело по п.3, где Т-клетки включают Т-клетки человека и Т-клетки обезьяны.

5. Антитело по п.1, где антитело представляет гуманизованное антитело.

6. Полинуклеотид, который кодирует вариабельную область легкой цепи (VL-область) и вариабельную область тяжелой цепи (VH-область) антитела по п.1.

7. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.6.

8. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.7.

9. Способ получения антитела, которое специфически связывается с CD3, включающий культивирование клетки-хозяина по п.8.

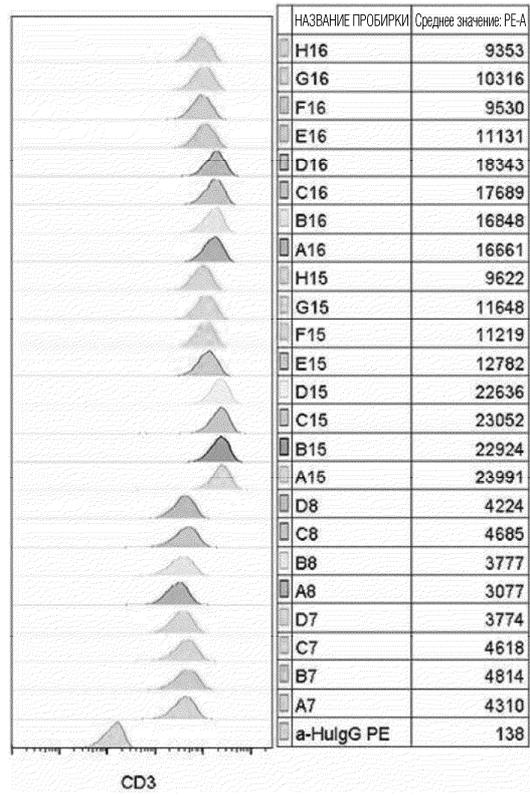
10. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения онкологического заболевания, отличающаяся тем, что содержит антитело по п.1 или его антигенсвязывающий фрагмент.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, где рак представляет рак поджелудочной железы, рак печени, рак желудка, рак легкого, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак щитовидной железы, рак пищевода, рак почки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак шейки матки, рак молочной железы, рак крови, рак кожи, эпителиальный рак, рак головного мозга, рак центральной нервной системы или рак яичника.

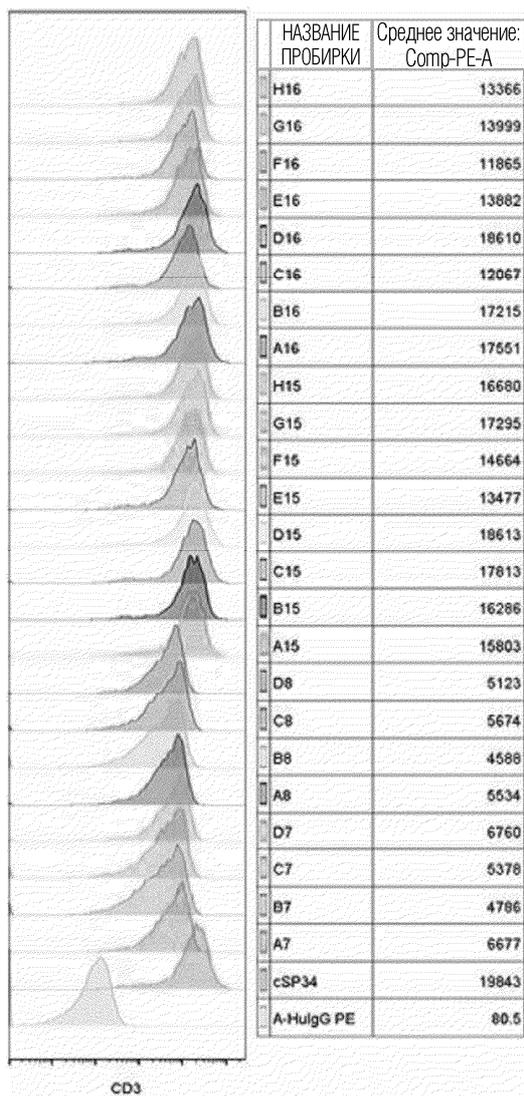
12. Применение антитела по п.1 для профилактики или лечения онкологического заболевания.

13. Применение антитела по п.1 для производства лекарственного средства для профилактики или лечения онкологического заболевания.

14. Способ профилактики или лечения онкологического заболевания, включающий введение антитела по п.1 индивидууму.



Фиг. 1



Фиг. 2



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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