



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.09

(21) Номер заявки
201791666

(22) Дата подачи заявки
2016.01.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К CD3, АНТИТЕЛА К CD123 И БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮТСЯ С CD3 И/ИЛИ CD123

(31) **15305077.8**

(32) **2015.01.23**

(33) **EP**

(43) **2017.11.30**

(86) **PCT/EP2016/051386**

(87) **WO 2016/116626 2016.07.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:

Альбрехт Яна (DE), Баррьер Седрик (FR), Байль Кристиан, Бенинга Йохен (DE), Карре Шанталь, Гериф Стефан (FR), Кроль Катя, Ланге Кристиан (DE), Лемуан Сендрин (FR), Лойшнер Вульф-Дирк, Рао Эрколе, Шнайдер Марион (DE), Ветзель Мари-Сесиль (FR), Вонеров Петер (DE)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2011109588**

KAstrup J. ET AL.: "In vitro production and characterization of partly assembled human CD3 complexes", SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, NOV 2002, vol. 56, no. 5, November 2002 (2002-11), pages 436-442, XP002741747, ISSN: 0300-9475, the whole document

V. MARRELLA ET AL.: "Anti-CD3 mAb improves thymic architecture and prevents autoimmune manifestations in a mouse model of Omenn syndrome: therapeutic implications", BLOOD, vol. 120, no. 5, 2 August 2012 (2012-08-02), pages 1005-1014, XP055199731, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2012-01-406827, the whole document

WO-A1-2014129270

ALIBAUD L. ET AL.: "A new monoclonal anti-CD3epsilon antibody reactive on paraffin sections", THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY: OFFICIAL JOURNAL OF THE

HISTOCHEMISTRY SOCIETY, DEC 2000, vol. 48, no. 12, December 2000 (2000-12), pages 1609-1616, XP055199782, ISSN: 0022-1554, the whole document

WO-A2-2008119567

WO-A2-2013173820

SHU-RU KUO ET AL.: "Engineering a CD123×CD3 bispecific scFv immunofusion for the treatment of leukemia and elimination of leukemia stem cells", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB, vol. 25, no. 10, 1 October 2012 (2012-10-01), pages 561-569, XP002721301, ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/PROTEIN/GZS040 [retrieved on 2012-06-27], the whole document

EP-A1-2789630

SALMERON A. ET AL.: "A conformational epitope expressed upon association of CD3-epsilon with either CD3-delta or CD3-gamma is the main target for recognition by anti-CD3 monoclonal antibodies", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 147, no. 9, 1 November 1991 (1991-11-01), pages 3047-3052, XP002453512, ISSN: 0022-1767, cited in the application, the whole document

C. RADER: "DARTs take aim at BiTers", BLOOD, vol. 117, no. 17, 28 April 2011 (2011-04-28), pages 4403-4404, XP055199549, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2011-02-337691, the whole document

WO-A1-2012135345

XUELIAN ZHANG ET AL.: "Molecular cloning and characterization of CD3[epsilon] in Chinese domestic goose (Anser cygnoides)", GENE, vol. 564, no. 2, 1 June 2015 (2015-06-01), pages 160-167, XP055199722, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/j.gene.2015.03.034 the whole document

EP-A1-2839842

STEIN CHRISTOPH ET AL.: "Novel conjugates of single-chain Fv antibody fragments specific for stem cell antigen CD123 mediate potent death of acute myeloid leukaemia cells", BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, BLACKWELL PUBLISHING LTD, vol. 148, no. 6, 1 March 2010 (2010-03-01), pages 879-889, XP002618076, ISSN: 1365-2141, DOI: 10.1111/J.1365-2141.2009.08033.X [retrieved on 2010-01-08], the whole document

WO-A1-2011156860

WO-A1-2012021934

WO-A1-2014138805

(57) Изобретение относится к антитело-подобному связывающему белку, специфически связывающемуся с CD3 и по меньшей мере с одним дополнительным антигеном, который представляет собой CD123. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело-подобный связывающий белок и к применению антитело-подобного

связывающего белка для лечения гематологической злокачественной опухоли. Кроме того, настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам, содержащим последовательность, кодирующую указанный антитело-подобный связывающий белок.

041572 B1

041572 B1

Изобретение распространяется на антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с CD3 и специфически связывается по меньшей мере с одним дополнительным антигеном, например CD123. Настоящее изобретение дополнительно распространяется на антитела к CD3 и антитела к CD123. Настоящее изобретение также распространяется на антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с CD123 и специфически связывается по меньшей мере с одним дополнительным антигеном. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антителоподобный связывающий белок, антитела к CD3 или антитела к CD123 по настоящему изобретению, и их применению в лечении рака. Настоящее изобретение дополнительно относится к выделенным нуклеиновым кислотам, векторам и клеткам-хозяевам, содержащим последовательность, кодирующую указанный антителоподобный связывающий белок, антитело к CD3 или антитело к CD123, и к применению указанного антитела к CD123 в качестве средства диагностики.

Первое поколение биспецифических антител было разработано более 20 лет назад. С тех пор в целом ряде клинических исследований были протестированы биспецифические антитела, сконструированные для нацеливания на поверхностные антигены раковых клеток. Эта группа противораковых белков слияния содержит два или более функциональных домена, которые локализуют иммунологические эффекторные клетки возле целевых раковых клеток для обеспечения противораковой активности.

По мере развития технологии биспецифических антител получили другую группу белков слияния под названием биспецифические активаторы Т-клеток (BiTE) путем соединения только двух одноцепочечных вариабельных областей антитела (scFv) (без включения аминокислотных сегментов Fc) с помощью гибкого линкера, при этом один scFv связывает целевые клетки, а другой связывает CD3 на поверхности Т-клетки. Один BiTE, блинатумомаб, характеризующийся биспецифической активностью связывания CD19×CD3, продемонстрировал обнадеживающие результаты для пациентов в клинических испытаниях фазы II с минимальной остаточной болезнью при В-клеточном остром лимфобластном лейкозе.

CD123 (альфа-цепь рецептора интерлейкина-3, IL-3Rα) представляет собой опухолевый антиген, который сверхэкспрессируется при различных гематологических новообразованиях. Большая часть бластных клеток при AML экспрессирует на поверхности CD123, и такая экспрессия не варьирует у подтипов AML. Как сообщалось, более высокая экспрессия CD123 при AML в момент постановки диагноза ассоциирована с более неблагоприятным прогнозом. Сообщалось, что CD123 экспрессируется на лейкозных стволовых клетках (LSC). Все возрастающее число фактов позволяют предположить, что AML возникает из этих лейкозных стволовых клеток (LSC), которые, как было показано, являются покоящимися и относительно устойчивыми к химиотерапии, повреждающей ДНК.

Таким образом, повышенная экспрессия CD123 на LSC по сравнению с гемопоэтическими стволовыми клетками (HSC) предоставляет возможность для терапевтического нацеливания на AML-LSC.

Как было показано ранее, моноклональное антитело (MAb) 7G3, вырабатываемое против CD123, ингибирует опосредованную IL-3 пролиферацию и активацию как линий лейкозных клеток, так и первичных клеток (патент США № 6177078). Однако оставалось неясно, может ли нацеливание на CD123 приводить к функциональным нарушениям в AML-LSC.

Применение антителоподобного связывающего белка к CD123×CD3 приводит к цитолизу опухолевых клеток, как показано в данном документе авторами настоящего изобретения.

Идея получения биспецифического антителоподобного связывающего белка с биспецифической активностью связывания CD123×CD3 уже была предложена и описана в международной патентной заявке WO 2013/173820.

Кроме того, молекула на основе биспецифического перенацеливающегося антитела с двойной аффинностью (DART) к CD123×CD3 от MacroGenics вступила в фазу I клинических испытаний в 2014 году.

Однако, как показано авторами настоящего изобретения, молекула на основе биспецифического перенацеливающегося антитела с двойной аффинностью (DART) к CD123×CD3 от MacroGenics, например, характеризуется активацией 82% экспрессирующих CD4+ Т-клеток и 83% экспрессирующих CD8+ Т-клеток в отсутствие целевых клеток. Несоответствующая активация Т-клеток может приводить к тяжелым побочным эффектам, таким как синдром выброса цитокинов. Синдромом выброса цитокинов называют выброс цитокинов активированными Т-клетками, что приводит к типу системного воспалительного ответа, аналогичного тому, который встречается при тяжелых инфекциях, и характеризующегося гипотензией, гипертермией и дрожью. Сообщалось о смертельных случаях вследствие синдрома выброса цитокинов при применении ОКТ3.

Следовательно, несмотря на эти продвижения в технологии биспецифических антител остается необходимость в дополнительных противораковых терапевтических средствах, в частности таких, которые эффективно нацеливаются и уничтожают раковые клетки либо напрямую, либо опосредованно.

Авторы настоящего изобретения добились успеха в получении, скрининге и отборе специфических антител крысы к CD3, которые проявляют высокую аффинность в отношении белка CD3 как человека, так и *Macaca fascicularis*.

Авторы настоящего изобретения разработали антителоподобные связывающие белки, характеризующиеся биологической и иммунологической специфичностью к антигену CD3 и по меньшей мере од-

ному дополнительному целевому антигену. В одном примере, чтобы продемонстрировать применение этих антител к CD3 в получении биспецифических антителоподобных связывающих белков, авторы настоящего изобретения получили антителоподобные связывающие белки к CD3/CD123 и продемонстрировали их терапевтическое применение. Такие биспецифические антителоподобные связывающие белки к CD3/CD123 характеризуются низкой активацией Т-клеток, как это наблюдалось в случае антитела к CD3 отдельно. Однако, если присутствуют экспрессирующие CD123 целевые клетки, такие как клетки ТНР-1, биспецифические антителоподобные связывающие белки к CD3/CD123 проявляют высокую активацию Т-клеток. Соответственно, антитело к CD3 по настоящему изобретению, определяемое выше, особенно применимо для получения антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению.

Определения.

На всем протяжении настоящей заявки термин "и/или" представляет собой грамматический союз, который следует интерпретировать как охватывающий то, что могут встречаться один или несколько случаев, которые он соединяет. Например, формулировку "такие белки с нативной последовательностью можно получить с применением стандартных рекомбинантных и/или синтетических способов" указывает на то, что белки с нативной последовательностью можно получить с применением стандартных рекомбинантных и синтетических способов, или белки с нативной последовательностью можно получить с применением стандартных рекомбинантных способов, или белки с нативной последовательностью можно получить с применением синтетических способов.

Кроме того, на протяжении настоящей заявки термин "содержащий" следует интерпретировать как охватывающий все специально упомянутые признаки, а также необязательные, дополнительные, неуказанные. Как используется в данном документе, применение термина "содержащий" также раскрывает вариант осуществления, в котором не присутствуют никакие признаки, за исключением специально упомянутых признаков (т.е. "состоящий из"). Кроме того, применение формы единственного числа не исключает множественного числа. Сам по себе тот факт, что определенные меры излагаются во взаимоисключающих зависимых пунктах формулы изобретения, не указывает на то, что комбинация этих мер не может применяться как преимущество.

Термин "ген" означает последовательность ДНК, которая кодирует или соответствует конкретной последовательности из аминокислот, которая представляет собой весь или часть одного или нескольких белков или ферментов, и может включать или не включать регуляторные последовательности ДНК, такие как промоторные последовательности, например, которые определяют условия, при которых ген экспрессируется. Некоторые гены, которые не представляют собой структурные гены, могут транскрибироваться из ДНК в РНК, но не транслируются в аминокислотную последовательность. Другие гены могут функционировать в качестве регуляторов структурных генов или в качестве регуляторов транскрипции ДНК. В частности, термин "ген" может предназначаться для геномной последовательности, кодирующей белок, т.е. последовательности, содержащей последовательности регулятора, промотора, интронов и экзонов.

Последовательность, которая "по меньшей мере на 85% идентична эталонной последовательности", представляет собой последовательность, по своей полной длине характеризующуюся 85% или большей, в частности 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью последовательности с полной длиной эталонной последовательности.

В контексте настоящей заявки "процентную долю идентичности" рассчитывают с применением глобального попарного выравнивания (т.е. две последовательности сравнивают по их полной длине). Способы сравнения идентичности двух или более последовательностей хорошо известны из уровня техники. Например, можно использовать программу "needle", использующую алгоритм глобального выравнивания последовательностей Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) для нахождения оптимального выравнивания (с учетом гэпов) двух последовательностей по их полной длине. Программа Needle, например, доступна в сети Интернет на сайте ebi.ac.uk. Согласно настоящему изобретению процентную долю идентичности между двумя полипептидами рассчитывают с применением EMBOSS: программы needle (глобального выравнивания) с параметром "штраф за открытие гэпа", равным 10,0, параметром "штраф за продолжение гэпа", равным 0,5, и матрицей Blosum62.

Белки, состоящие из аминокислотной последовательности, которая "по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична" эталонной последовательности, могут содержать мутации, такие как делеции, вставки и/или замены, по сравнению с эталонной последовательностью. В случае замен белок, состоящий из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична эталонной последовательности, может соответствовать гомологичной последовательности, полученной от вида, иного чем тот, из которого получена эталонная последовательность.

"Аминокислотные замены" могут быть консервативными или неконсервативными. Предпочтительно, замены представляют собой консервативные замены, в которых одна аминокислота замещена на другую аминокислоту с аналогичными структурными и/или химическими свойствами. Замена предпочтительно соответствует консервативной замене, указанной в таблице ниже.

Консервативные замены	Тип аминокислоты
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Аминокислоты с алифатическими гидрофобными боковыми цепями
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Аминокислоты с незаряженными, но полярными боковыми цепями
Asp, Glu	Аминокислоты с кислотными боковыми цепями
Lys, Arg, His	Аминокислоты с основными боковыми цепями
Gly	Нейтральная боковая цепь

"Антитело", также называемое иммуноглобулин, может представлять собой природное или традиционное антитело, в котором две тяжелые цепи связаны друг с другом дисульфидными связями и каждая тяжелая цепь связана с легкой цепью дисульфидной связью. Существует два типа легких цепей, лямбда (l) и каппа (k). Существует пять основных классов (или изотипов) тяжелых цепей, определяющих функциональную активность молекулы антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE. Каждая цепь содержит разную последовательность доменов. Легкая цепь содержит два домена или области, варибельный домен (VL) и константный домен (CL).

Тяжелая цепь содержит четыре домена, варибельный домен (VH) и три константных домена (CH1, CH2 и CH3, совместно именуемых CH). Варибельные области как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание при связывании и специфичность к антигену. Домены константной области легкой (CL) и тяжелой (CH) цепей придают важные биологические свойства, такие как объединение цепей антитела, секреция, перемещение через плаценту, связывание комплемента и связывание с Fc-рецепторами (FcR). Fv-фрагмент представляет собой N-концевую часть Fab-фрагмента иммуноглобулина и состоит из варибельных частей одной легкой цепи и одной тяжелой цепи. Специфичность антитела заключается в структурной комплементарности между паратопом антитела и антигенной детерминантой. Паратопы антител составлены остатками главным образом из гиперварибельных или определяющих комплементарность областей (CDR). Остатки из негиперварибельных или каркасных областей (FR) иногда влияют на общую структуру домена и, следовательно, паратоп. "Определяющими комплементарность областями" или "CDR" называют аминокислотные последовательности, которые совместно определяют аффинность связывания и специфичность природной Fv-области связывающего участка нативного иммуноглобулина. Каждая из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина имеет три CDR, обозначенные как CDR1-L, CDR2-L, CDR3-L и CDR1-H, CDR2-H, CDR3-H соответственно. Традиционный антигенсвязывающий участок антитела, таким образом, содержит шесть CDR, которые включают в себя набор CDR из каждой из V-областей тяжелой и легкой цепи.

В контексте настоящего изобретения антитело или иммуноглобулин представляет собой IgM, IgD, IgG, IgA и IgE.

"Каркасными областями" (FR) называют аминокислотные последовательности, расположенные между CDR, т.е. те части варибельных областей легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, которые являются относительно консервативными среди различных иммуноглобулинов у одного вида. Каждая из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина имеет четыре FR, обозначенные как FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H соответственно. Соответственно, варибельный домен легкой цепи можно таким образом обозначить как (FR1-L)-(CDR1-L)-(FR2-L)-(CDR2-L)-(FR3-L)-(CDR3-L)-(FR4-L), а варибельный домен тяжелой цепи можно таким образом обозначить как (FR1-H)-(CDR1-H)-(FR2-H)-(CDR2-H)-(FR3-H)-(CDR3-H)-(FR4-H).

Зная аминокислотную последовательность CDR, специалист в данной области легко сможет определить каркасные области FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и/или FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Как используется в данном документе, "каркасная область человека" представляет собой каркасную область, которая практически идентична (приблизительно на 85% или более, в частности, на 90, 95, 97, 99 или 100%) каркасной области встречающегося в природе антитела человека.

В контексте настоящего изобретения определение CDR/FR в легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина следует давать на основании определения по IMGT (Lefranc et al. Dev. Comp. Immunol., 2003, 27(1):55-77; www.imgt.org).

Как используется в данном документе, термин "антитело" обозначает традиционные антитела и их фрагменты, а также однодоменные антитела и их фрагменты, в частности, варибельную область тяжелой цепи однодоменных антител, и химерные, гуманизированные, биспецифические или полиспецифические антитела.

Как используется в данном документе, антитело или иммуноглобулин также включают "однодоменные антитела", которые были описаны совсем недавно и которые представляют собой антитела, у которых области, определяющие комплементарность, являются частью однодоменного полипептида. Примеры однодоменных антител включают антитела, состоящие только из тяжелых цепей, антитела, в

естественных условиях не имеющие легких цепей, однодоменные антитела, полученные из традиционных антител с четырьмя цепями, сконструированные однодоменные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены из любого вида, в том числе, без ограничения, мыши, человека, верблюда, ламы, козы, кролика, крупного рогатого скота. Однодоменные антитела могут представлять собой встречающиеся в природе однодоменные антитела, известные как антитела, состоящие только из тяжелых цепей, не имеющие легких цепей. В частности, виды семейства Camelidae, например верблюд, дромедар, лама, альпака и гуанако, вырабатывают антитела, состоящие только из тяжелых цепей, в естественных условиях не имеющие легких цепей. У антител верблюдовых, состоящих только из тяжелых цепей, также отсутствует СН1-домен.

Вариабельная область тяжелой цепи этих однодоменных антител, не имеющих легких цепей, известна из уровня техники как "VHH" или "нанотело". Подобно традиционным VH-доменам VHH содержат четыре FR и три CDR. Нанотела обладают преимуществами по сравнению с традиционными антителами: они приблизительно в десять раз меньше, чем молекулы IgG, и, как следствие, правильно свернутые функциональные нанотела можно получать посредством экспрессии *in vitro* при достижении высокого выхода. Кроме того, нанотела являются очень стабильными и устойчивыми к действию протеаз. Обзор свойств и получения нанотел был приведен в Harmsen and De Haard HJ (Appl. Microbiol. Biotechnol. 2007 Nov;77(1):13-22).

Как используется в данном документе, термином "моноклональное антитело" или "mAb" называют молекулу антитела с единым аминокислотным составом, которое направлено против специфического антигена, и его не следует истолковывать как требующий получения антитела любым конкретным способом. Моноклональное антитело может быть получено из одного клона В-клеток или гибридомы, но также может быть рекомбинантным, т.е. полученным с помощью белковой инженерии.

Термином "химерное антитело" называют сконструированное антитело, которое в своем самом широком смысле содержит одну или несколько областей из одного антитела и одну или несколько областей из одного или нескольких других антител. В частности, химерное антитело содержит VH-домен и VL-домен антитела, полученного из отличного от человека животного, совместно с СН-доменом и CL-доменом другого антитела, в частности антитела человека. В качестве отличного от человека животного можно использовать любое животное, такое как мышь, крыса, хомяк, кролик и т.п. Химерное антитело также может означать полиспецифическое антитело, обладающее специфичностью в отношении по меньшей мере двух различных антигенов.

Термином "гуманизированное антитело" называют антитело, которое полностью или частично происходит не от человека и которое было модифицировано для замены определенных аминокислот, в частности в каркасных областях тяжелой и легкой цепей, чтобы избежать или минимизировать иммунный ответ у человека. Константные домены гуманизированного антитела в большинстве случаев представляют собой СН- и CL-домены человека.

Из уровня техники известны многочисленные способы гуманизации последовательности антитела; см., например, обзор в Almagro & Fransson (2008) Front Biosci. 13: 1619-1633. Одним обычно используемым способом является привитие CDR, или перестройка антитела, предусматривающая привитие последовательностей CDR из донорного антитела, обычно антитела мыши, в остов из каркасной области антитела человека с отличающейся специфичностью. Поскольку привитие CDR может снижать специфичность и аффинность связывания и, таким образом, биологическую активность CDR-привитого антитела, отличного от антитела человека, в выбранные положения CDR-привитого антитела можно вводить обратные мутации, чтобы сохранить специфичность и аффинность связывания исходного антитела. Идентификацию положений для возможных обратных мутаций можно осуществлять с применением информации, доступной в литературе и в базе данных антител. Аминокислотные остатки, которые являются кандидатами на проведение обратных мутаций, как правило, представляют собой остатки, расположенные на поверхности молекулы антитела, в то время как остатки, которые являются погруженными или которые характеризуются низкой степенью нахождения на поверхности, обычно изменять не будут. Методика гуманизации, альтернативная привитию CDR и проведению обратных мутаций, представляет собой изменение поверхности, при котором не находящиеся на поверхности остатки, происходящие не от человека, оставляют, в тоже время поверхностные остатки изменяют на остатки человека. Другая альтернативная методика известна как "направляемый отбор" (Jespers et al. (1994) Biotechnology 12, 899), и ее можно применять, например, для получения из антитела мыши или крысы полностью человеческого антитела с сохранением эпитопа и характеристик связывания исходного антитела. Дополнительный способ гуманизации представляет собой так называемую 4D-гуманизацию. Протокол 4D-гуманизации описан в патентной заявке US 20110027266 A1 (WO 2009032661 A1) и приведен в качестве примера ниже путем применения 4D-гуманизации, чтобы гуманизировать вариабельные домены легкой (VL) и тяжелой (VH) цепей антитела крысы. В одном примере получали гомологичную модель антитела крысы в основном с помощью программного обеспечения MOE (v. 2011.10 - Chemical Computing Group, Квебек, Канада) с применением PDB-структур (Berman et al., Nucleic Acids Research, 2000, 28:235-242) в качестве матриц и затем подвергали минимизации энергии с применением стандартных процедур, реализованных в MOE. Затем на минимизированной 3D гомологичной модели (проводили с помощью программного

обеспечения MOE) антитела крысы осуществляли моделирование способом молекулярной динамики (MD) и сравнивали, например, с 49 моделями антитела человека, полученными на основании семи репрезентативных легких цепей (vk1, vk2, vk3, vk4, vlamba1, vlamba2, vlamba3) и семи репрезентативных тяжелых цепей (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6), обозначенных с помощью LGCR/SDI и доступных в MOE. Например, одна модель из пары цепей (V_{kx}-V_{hx}) с наилучшими как гидрофобными, электростатическими компонентами, так и идентичностью последовательности за пределами CDR, была выбрана для "4D-гуманизации". Для попарного сравнения варибельного домена антитела крысы и выбранной модели последовательности выравнивали, в основном, на основании оптимального 3D наложения альфа-атомов углерода в соответствующих гомологичных моделях. Затем определяли и подвергали мутированию нежелательные мотивы. Наконец, в отношении полученных гуманизированных последовательностей применяли инструмент Blast для определения сходства последовательностей, например, с базой данных IEDB (<http://www.immuneepitope.org>; версия 2012/01/30, доступная локально), чтобы убедиться, что ни одна из последовательностей не содержит никакой известный В- или Т-клеточный эпитоп, приведенный в ней.

В случае химерных антител гуманизация, как правило, предусматривает модификацию каркасных областей последовательностей варибельных областей.

Аминокислотные остатки, которые представляют собой часть CDR, как правило, не будут изменять в связи с гуманизацией, хотя в некоторых случаях может быть необходимо изменить отдельные аминокислотные остатки CDR, например, чтобы удалить участок гликозилирования, участок дезамидирования или нежелательный остаток цистеина. N-сцепленное гликозилирование происходит путем прикрепления олигосахаридной цепи к аспарагиновому остатку в трипептидной последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr, где X может представлять собой любую аминокислоту за исключением Pro. Удаления участка N-гликозилирования можно достичь с помощью мутирования либо Asn, либо остатка Ser/Thr на другой остаток, в частности, путем консервативной замены. Дезамидирование аспарагинового и глутаминового остатков может происходить в зависимости от факторов, таких как pH и нахождение на поверхности. Аспарагиновые остатки особенно подвержены дезамидированию, в первую очередь когда находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Когда такой участок дезамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в последовательности CDR, тогда может быть желательно удалить данный участок, обычно посредством осуществления консервативной замены для удаления одного из участвующих остатков. Подразумевается, что замена в последовательности CDR для удаления одного из участвующих остатков также охватывается настоящим изобретением.

"Фрагменты" (традиционных) антител содержат часть интактного антитела, в частности антигенсвязывающую область или варибельную область интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂, диатела, биспецифические и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагмент традиционного антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело, состоящее только из тяжелых цепей или VHH.

Термин "Fab" обозначает фрагмент антитела с молекулярной массой, составляющей приблизительно 50000, и антигенсвязывающей активностью из числа фрагментов, получаемых путем обработки IgG протеазой папаином, в котором приблизительно половина N-концевой части H-цепи и вся L-цепь связаны друг с другом с помощью дисульфидной связи.

Термином "F(ab')₂" называют фрагмент антитела с молекулярной массой, составляющей приблизительно 100000, и антигенсвязывающей активностью из числа фрагментов, получаемых путем обработки IgG протеазой пепсином, который является немного большим, чем Fab, связанные с помощью дисульфидной связи шарнирной области.

Термином "Fab" называют фрагмент антитела с молекулярной массой, составляющей приблизительно 50000, и антигенсвязывающей активностью, который получают путем разрезания дисульфидной связи шарнирной области F(ab')₂.

Одноцепочечный полипептид Fv ("scFv") представляет собой объединенный ковалентными связями гетеродимер VH::VL, который обычно экспрессируется за счет генного слияния, содержащего гены, кодирующие VH и VL, соединенные линкером, кодирующим пептид. scFv-фрагмент человека по настоящему изобретению содержит CDR, удерживаемые в надлежащей конформации, в частности, путем применения методик рекомбинации генов. Бивалентные и поливалентные фрагменты антител либо могут образовываться спонтанно путем объединения моновалентных scFv, либо их можно получать путем соединения моновалентных scFv пептидным линкером, как, например, в случае бивалентного sc(Fv)₂. "dsFv" представляет собой гетеродимер VH::VL, стабилизированный дисульфидной связью. "(dsFv)₂" обозначает два dsFv, соединенных пептидным линкером.

Термин "биспецифическое антитело" или "BsAb" обычно обозначает антитело, в котором антигенсвязывающие участки двух антител объединены в пределах одной молекулы. Таким образом, BsAb способны связываться с двумя различными антигенами одновременно. Для разработки, модификации и получения антител или производных антител с необходимым набором свойств связывания и эффекторных

функций все чаще используют генную инженерию, как описано, например, в EP 2050764 A1.

Термин "полиспецифическое антитело" обозначает антитело, в котором антигенсвязывающие участки двух или более антител объединены в одной молекуле.

Термином "диатела" называют небольшие фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими участками, при этом данные фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с переменным доменом легкой цепи (VL) в составе одной полипептидной цепи (VH-VL). Вследствие применения линкера, слишком короткого для обеспечения спаривания между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и образовывать два антигенсвязывающих участка.

Термин "гибридома" обозначает клетку, которую получают путем слияния В-клетки, полученной при иммунизации отличного от человека млекопитающего антигеном, с клеткой миеломы, полученной от мыши, и т.д., в которой вырабатывается необходимое моноклональное антитело, характеризующееся специфичностью к антигену.

Под "очищенный" и "выделенный" подразумевают, при ссылке на полипептид (т.е. антитело по настоящему изобретению) или нуклеотидную последовательность, что указанная молекула присутствует при фактическом отсутствии других биологических макромолекул того же типа. Термин "очищенный", как используется в данном документе, в частности означает, что присутствует по меньшей мере 75, 85, 95 или 98% по весу биологических макромолекул одного типа. "Выделенной" молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, называют молекулу нуклеиновой кислоты, которая практически не содержит других молекул нуклеиновой кислоты, которые не кодируют данный полипептид; однако, молекула может включать некоторые дополнительные основания или фрагменты, которые не оказывают вредного воздействия на основные характеристики состава.

Термином "антиген" или "целевой антиген", как используется в данном документе, называют молекулу или часть молекулы, способную быть связанной антителом или антителоподобным связывающим белком. Термином также называют молекулу или часть молекулы, которую можно применять у животного с получением антител, которые способны связываться с эпитопом такого антигена. Целевой антиген может иметь один или несколько эпитопов. С учетом того, что каждый целевой антиген распознается антителом или антителоподобным связывающим белком, антителоподобный связывающий белок способен конкурировать с интактным антителом, которое распознает целевой антиген.

Теоретически, "аффинность" определяется по равновесной связи между цельным антителом и антигеном. Аффинность можно выражать, например, в виде полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}) или равновесной константы диссоциации (K_D).

"Полумаксимальной эффективной концентрацией", также называемой " EC_{50} ", называют концентрацию лекарственного средства, антитела или токсического вещества, которое индуцирует ответ, лежащий посередине между ответом в начальный момент времени и максимальным ответом после определенного времени воздействия. EC_{50} и аффинность обратно пропорциональны друг другу, причем чем ниже значение EC_{50} , тем выше аффинность антитела.

" K_D " представляет собой равновесную константу диссоциации, отношение k_{off}/k_{on} , между антителом и его антигеном. K_D и аффинность обратно пропорциональны друг другу. Значение K_D относится к концентрации антитела, и чем ниже значение K_D , тем выше аффинность антитела. Аффинность можно оценивать экспериментальным путем с помощью различных известных способов, как, например, путем измерения скорости ассоциации и диссоциации с помощью поверхностного плазмонного резонанса или измерения EC_{50} в иммунохимическом анализе (ELISA, FACS). Ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) представляет собой биохимический анализ, в котором используется твердофазный ферментный иммуноанализ для обнаружения наличия вещества, обычно антигена, в жидком образце или влажном образце. Антигены из образца прикрепляются к поверхности. Затем дополнительное специфическое антитело наносят на поверхность, чтобы оно могло связаться с антигеном. Данное антитело связано с ферментом, и, в качестве финальной стадии, добавляют вещество, содержащее субстрат фермента. В ходе последующей реакции образуется обнаруживаемый сигнал, чаще всего изменение цвета субстрата. Сортировка клеток с активацией флуоресценции (FACS) обеспечивает способ сортировки гетерогенной смеси биологических клеток в два или более контейнеров, по одной клетке за раз, на основании специфического светорассеяния и флуоресцентных характеристик каждой клетки. В этих анализах EC_{50} представляет собой концентрацию антитела, которая индуцирует ответ, лежащий посередине между ответом в начальный момент времени и максимальным ответом после некоторого определенного времени воздействия определенной концентрации антигена при ELISA (ферментный иммуносорбентный анализ) или экспрессии антигена клеткой при FACS (сортировка клеток с активацией флуоресценции). Поверхностный плазмонный резонанс представляет собой способ без применения меток, где напрямую измеряют связывание молекулы в растворимой фазе ("аналит") с молекулой-"лигандом", иммобилизованной на поверхности сенсора. В сенсорном устройстве связывание лиганда отслеживают по оптическому явлению под названием поверхностный плазмон. В частности, когда молекула "аналита" диссоциирует от молекулы-"лиганда", наблюдается снижение SPR-сигнала (выражаемого в резонансных единицах, RU). Скорости ассоциации ("скорость ассоциации", k_a) и диссоциации ("скорость диссоциации", k_d) получают

на основе сигнала, получаемого во время ассоциации и диссоциации, и из них можно рассчитать равновесную константу диссоциации ("константа связывания", K_D). Сигнал, приводимый в резонансных единицах (RU), зависит от размера лиганда, присутствующего в анализе, однако, в случае одинаковых экспериментальных условий, т.е. лиганд представляет собой ту же молекулу при тех же условиях, полученное значение в RU может измерять аффинность, при этом чем выше полученный сигнал в RU, тем выше связывание.

Связывание моноклонального антитела с антигеном 1 (Ag1) является "перекрестно-реактивным" в отношении антигена 2 (Ag2), когда EC_{50} находятся в аналогичном диапазоне для обоих антигенов.

В настоящей заявке связывание моноклонального антитела с Ag1 является перекрестно-реактивным в отношении Ag2, когда соотношение аффинности к Ag2 и аффинности к Ag1 равно 10 или менее (в частности, 5, 2, 1 или 0,5), при этом аффинности измеряют с помощью одного способа в случае обоих антигенов.

Связывание моноклонального антитела с Ag1 не является "в значительной степени перекрестно-реактивным" в отношении Ag2, когда аффинности к этим двум антигенам очень отличаются. Аффинность к Ag2 может быть неизмеряемой, если реакция связывания является слишком слабой. В настоящей заявке связывание моноклонального антитела с Ag1 не является в значительной степени перекрестно-реактивным в отношении Ag2, когда реакция связывания моноклонального антитела с Ag2 составляет менее 5% от реакции связывания того же моноклонального антитела с Ag1 в тех же экспериментальных условиях и при той же концентрации антитела. На практике применяемая концентрация антитела может составлять EC_{50} или концентрацию, требуемую для достижения плато насыщения, наблюдаемого в случае Ag1.

Как используется в данном документе, "специфичность" обозначает способность антитела отличать целевую пептидную последовательность, с которой оно связывается ("эпитоп"), от близкородственных, высокоомологичных пептидных последовательностей.

Моноклональное антитело "специфически связывается" с Ag1, когда оно не является в значительной степени перекрестно-реактивным в отношении Ag2.

"Домен" может представлять собой любую область белка, обычно определяемую на основании гомологии последовательностей и зачатую связанную определенным структурным или функциональным единством.

"Рекомбинантная" молекула представляет собой молекулу, которая была получена, экспрессирована, создана или выделена рекомбинантными способами.

Как используется в данном документе, термин "субъект" обозначает млекопитающее, такое как грызун, представитель кошачьих, представитель собачьих и примат. В частности, субъектом согласно настоящему изобретению является человек.

Антитела к CD3.

"CD3" обозначает антиген, который экспрессируется на Т-клетках в качестве части полимолекулярного комплекса Т-клеточных рецепторов и который состоит по меньшей мере из трех различных цепей, CD3 ϵ , CD3 δ и CD3 γ . CD3 δ и CD3 γ обладают низкой идентичностью последовательности и/или сходства с CD3 ϵ человека (сходство и идентичность составляют менее 20%). CD3 ϵ и CDR3 δ вместе могут образовывать комплекс, называемый в данном документе "CD3 ϵ / δ -комплекс". CD3 ϵ также образует комплекс с CDR3 γ , так называемый "CD3 ϵ / γ -комплекс". Кластеризация CD3 на Т-клетках, например, с помощью иммобилизованных антител к CD3, приводит к активации Т-клетки, аналогичной вовлечению Т-клеточного рецептора, но независимо от специфичности, типичной для ее клона. "CD3 ϵ " содержит три домена, внутриклеточный домен, трансмембранный домен и внеклеточный домен.

Большинство антител к CD3 из уровня техники распознавали цепь CD3 ϵ . Одно из таких антител к CD3 из уровня техники представляет собой ОКТ3. В уровне техники были приведены примеры явлений активации Т-клеток при использовании молекул антитела, например, при использовании молекулы антитела ОКТ3. Антитело к CD3 и его вариант были описаны в уровне техники (US 4361549; US 4361549; US 5885573; US 5929212 и WO 98/52975 или US 5955358). ОКТ3 дополнительно применялось как эффективное иммуносупрессорное средство при клинической трансплантации для лечения отторжения аллотрансплантата (Thistlethwaite 1984, Transplantation 38, 695-701; Woodle 1991, Transplantation 51, 1207-1212; Choi 2001, Eur. J. Immunol. 31(1), 94-106).

Основным недостатком данной терапии является активация Т-клеток, проявляющаяся в выбросе цитокинов, вследствие перекрестного связывания Т-клеток и Fc γ R-несущих клеток и ответа с антителом человека к антителу мыши (НАМА). В некоторых публикациях были описаны изменения, такие как гуманизация ОКТ3, для снижения таких побочных эффектов: US 5929212; US 5885573 и другие. С другой стороны, ОКТ3 или другие антитела к CD3 можно применять в качестве иммуностимулирующих средств для стимуляции активации и пролиферации Т-клеток (US 6406696 от Bluestone; US 6143297 от Bluestone; US 6113901 от Bluestone; Yannelly 1990, J. Immunol. Meth. 1, 91-100). Антитела к CD3 также были описаны в качестве средств, применяемых в комбинации с антителами к CD28 для индуцирования пролиферации Т-клеток (US 6352 694). ОКТ3 дополнительно применяли само по себе или в качестве компонента

биспецифического антитела для нацеливания цитотоксических Т-клеток на опухолевые клетки или инфицированные вирусом клетки (Nitta 1990, Lancet 335, 368-376; Sanna 1995, Bio/Technology 13, 1221-1224; WO 99/54440).

До сегодняшнего дня подходы с применением антител в качестве средств для рекрутинга Т-клеток сдерживались из-за некоторых данных. Во-первых, природные или сконструированные антитела, характеризующиеся высокой аффинностью связывания с Т-клетками, зачастую не активируют Т-клетки, с которыми они связались. Во-вторых, природные или сконструированные антитела, характеризующиеся низкой аффинностью связывания с Т-клетками, также зачастую являются неэффективными вследствие их способности запускать клеточный лизис, опосредованный Т-клетками.

Эталонная последовательность полноразмерного белка CD3ε человека, включая сигнальный пептид, доступна из базы данных Uniprot под номером доступа P07766 и раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 1 (в виде, доступном на 12 декабря 2014 года).

Эталонная последовательность полноразмерного белка CD3ε *Macaca fascicularis*, включая сигнальный пептид, доступна из базы данных Uniprot под номером доступа Q95LI5 и раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 2 (в виде, доступном на 12 декабря 2014 года).

Последовательность белков слияния, содержащих Fc и зрелый CD3ε человека с меткой His, клонированных авторами настоящего изобретения из геномной ДНК, раскрыта под SEQ ID NO: 3. Указанный белок слияния, содержащий Fc и зрелый CD3ε человека с меткой His, содержит аминокислоты 23-126 из полноразмерного белка CD3ε человека и, таким образом, содержит внеклеточный домен CD3ε человека.

Последовательность белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD3ε *Macaca fascicularis*, клонированного авторами настоящего изобретения из геномной ДНК, раскрыта под SEQ ID NO: 4. Указанный белок слияния, содержащий Fc и зрелый CD3ε *Macaca fascicularis*, содержит аминокислоты 23-117 из полноразмерного белка CD3ε *Macaca fascicularis* и, таким образом, содержит внеклеточный домен CD3ε человека или *Macaca fascicularis*, содержащий одну замену аланина на валин в аминокислотном положении 35 по сравнению с аминокислотным положением 57 последовательности дикого типа.

Доменная организация CD3ε человека и *Macaca fascicularis* является следующей (на основании последовательности P07766 в Uniprot (человек) и последовательности Q95LI5 в Uniprot (*Macaca fascicularis*)):

Домены CD3ε	Положения в SEQ ID	Положения в SEQ ID NO: 2
	NO: 1 (человек)	(<i>Macaca fascicularis</i>)
Внеклеточный	23-126	22-117
Трансмембранный домен	127-152	118-138
Цитоплазматический	153-207	139-198

Соответственно, внеклеточный домен CD3ε человека состоит из аминокислот в положениях 23-126 из SEQ ID NO: 1, а внеклеточный домен CD3ε *Macaca fascicularis* состоит из аминокислот в положениях 22-117 из SEQ ID NO: 2.

Авторы настоящего изобретения добились успеха в получении, скрининге и отборе специфических антител мыши и крысы к CD3. Эти антитела к CD3 проявляют высокую аффинность в отношении белка CD3 как человека, так и *Macaca fascicularis* и в то же время характеризуются низкой активацией Т-клеток в отсутствие целевых клеток.

Авторы настоящего изобретения определили последовательность вариабельных областей тяжелой и легкой цепей таких моноклональных антител, антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2" и "8H2".

Антитело к CD3, называемое "20G6-F3", содержит:

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCAATSGFTFTKAWMHWVRQSPKQLEWVAQIKDKSNSYA

TYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNLSKEEDTAIYYCRGVYYALSPFDYWGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 5, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 6, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 7 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 8, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVMTQTPVSLSVSLGGQVSISSCRSSQSLVHNNNGNTYLSWYLVQKPGQSPQSLIYKVSINRFSGFS

DRFSGSGSGTDFTLKISRVD PDDLGVYYCQGGTOYPTFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 9, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "4B4-D7", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGRLVQPGKSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWRQSPKQLEWVAQIKARSNNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKSTIYLQMNSLKEEDTAIYYCRGTTYASKPFDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 12, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 14 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 15, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTPTVSLVSLGGQVSIISCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQRPQSPQVLIYKVSNRFSGTS

DRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTOYPTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 16, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 17, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "4E7-C9", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQVETGGSLVQPGKSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWRQSPKQLEWVAQIKDKSNNYATYYAE

SLKGRFTISRDDPKRSIYLQMNSLREEDTAIYYCRYVHYGIGYAMDAGWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 18, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 20, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTPTVSLVSLGGQVSIISCRSSQSLHNNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIYKVSNRFSGIS

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTOYPTFGPGTKLELK

(SEQ ID NO: 21, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 22, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "18F5-H10", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQVETGGSLVQPGKSLKLTCAATSGFTFTNAWMHWRQSPKQLEWVAQIKDKSNNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKSSIYLQMNSLKEEDTAIYYCRYVHYRFAYALDAWGRGTSVSVSS

(SEQ ID NO: 23, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 24, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 25, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVLMQTPTVSLVSLGGQVSIISCRSSQSLVHTNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRSLSGIS

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTHYPTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 26, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 27, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28.

Антитело к CD3, называемое "12D2-E5", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVKLVESGGGLVQPGKSLRLSCAASGFNFYAYWMGWVRQAPGKLEWIGEIKKDGTTINYPSTL

KDRFTISRDNQNTLYLQMTKLGSSEDTALYYCAREERDGYFDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 29, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 30, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 31 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 32, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

QFVLTQPNSTNLGSLVSKLSCRSKSGTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPPTMIYRDDKRPDGPVDRFS

GSIDRSSNSALLTINNVTQTEADYFCQSYSSGIVFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 33, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 34, CDR2-L, состоящий из последовательности "RDD", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 35.

Антитело к CD3, называемое "11D7-C3", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQFVETGGSLVQPGKSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWRQSPKQLEWVAQIKAKSNNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTATYYCRGLYYGLSPSDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 36, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 38, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTPTVSLSVSLGGQVSI SCRSS **QSLVHNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY **KVS**NRFGSIS
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC **GQGTHTYPT**FGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 39, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28.

Антитело к CD3, называемое "11H3-E5", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLT CATS **GFTFSSNAW**MHWVRQSPKQLEWVAQ **IKAKSNNYATYYAE**
SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC **RGTYAYKPF**WDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 40, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 41, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTPTVSLSVSLGGQVSI SCRSS **QSLVHDNNGNTY**LSWSLQKPGQSPQVLIY **KVS**NRFGSIS
DRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC **GQGTQYPT**FGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 42, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 17, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "13H2-C2", содержит:

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EEELVETGGSLVQPGKSLKLT CATS **GFTFSSNAW**MHWVRQSPDKQLEWVAQ **IKAKSNNYATYYAE**
SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYC **RYVHYGLAPMDA**WGQGTSTVTVSS

(SEQ ID NO: 43, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 44, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTPTVSLSVSLGGQVSI SCRSS **QSLVHNNGNTY**LSWYLQKAGQSPQLLIY **KVS**NRFGSIS
DRFSGSGSGTDFILKISRVEPDDLGVFYC **GQGTQYPT**FGAGTKLEIK

(SEQ ID NO: 45, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "13C1-F6", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGTLVQPGKSLKLT CATS **GFTFSSNAW**MHWVRQSPKQLEWVAQ **IKAKSNNYATYYAE**
SVKGRFTISRDDSKTSVYLQNLNREEDTAIYYC **RGTOYGYNPF**WDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 46, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 47, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTQSPVSLSVSLGGQVSI SCRSS **QSLVHNNGNTY**LSWYLQKRGQSPQLLIY **KVS**NRLSGIS
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC **GQGTQYPT**FGSGTRLEIK

(SEQ ID NO: 48, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "18H11-F10", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVESGGGLVQPGKSLKLTCAAS **GFIFSDYY**MAWVRQAPKQLEWVAQ **ISISGSR**TYYPDSV
KGRFTVSRDANKSSLYLQMNSLKSEDTATYYC **ATNNPGGWFWY**WGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 49, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 50, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 51 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 52, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

NIQMTQSPSLLSASVGDRTLSCKAG **QININD**LAWYQKLGAEAPRLLIY **NAN**SLQTGIPSRFSG
SGSGADFTLTITSLQPEDVATYFC **QQYSSGDT**FGAGTKLEIK

(SEQ ID NO: 53, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 54, CDR2-L, состоящий из последовательности "NAN", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 55.

Антитело к CD3, называемое "1E6-C9", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TS****GFTFSYAW**MHWVRQSPDKQLQWVAQ**I****KAKSNNYAT**YYAE

SVEGRFTISRDDSKSSVYLQMN**SLKEEDTAIYYC****RGVYYGLGLDA**WGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 56, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 57, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 58, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVM**TQTPVSLSVRLGGQVSISCRSS****QSLVHNNNGNTY**LSWFLQKPGQSPQLLIY**KVS**NRFGSGIS

DRFSGSASGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTHYPFT**FGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 59, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28.

Антитело к CD3, называемое "10F4-C10", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPGKSLKITCA**TS****GFTFSNAW**MHWVRQSP**E**KQLEWVAQ**I****KAKSNNYAT**YYAE

SVKGRFTISRDDSKSSIIYLQMN**SLKEEDTAIYYC****RAVNYGNYPLDY**WGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 60, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 61, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVM**TQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS****QSLVHNNNGNTY**LSWCLQKPGQSPQLLIY**KVS**NRFGSGIS

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC**GOGTOYPFT**FGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 62, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "10E6-G6", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGGLVQSGKSLKLTCA**TS****GFTVTNAW**MHWVRQSP**E**KQLEWVAQ**I****KAKSNNYE**YYAE

SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN**SLKEEDTAIYYC****RGTOYGYNPFDY**WGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 63, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 64, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 65 и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 47, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVM**TQSPVSLSVSLGGQVSISCRSS****QSLVHNNNGYTY**LSWYLQKPGQSPQVFIY**KVS**NRFGSGIS

DRFSGSGSGTDFTLKISR**IE**PDDLGVYYC**GOGTHYPFT**FGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 66, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 67, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28.

Антитело к CD3, называемое "18G9-H11", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTCA**TS****GFTFSNAW**IQWVRQSP**E**KQLEWVAQ**I****KAKSNNYAT**YYAE

SVKGRFTISRDDSKSSVYLQMN**SLKEEDTAIYYC****TWRHYSSHTMDA**WGQGT**L**TVTVSS

(SEQ ID NO: 68, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 69, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVM**TQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS****QSLVHNNNGNTY**LSWYLQKPGQSPQLLIY**KVS**NRFGSGIS

DRFSGSGSGTDFTLKISR**V**AP**T**DLGVYYC**GOGSQYPFT**FGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 70, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 71.

Антитело к CD3, называемое "11F3-B9", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPGKSLTLTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRYVNYGLAPMDVWGQGSTVTSS

(SEQ ID NO: 72, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 84, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHDNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGFS

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTOYPFTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 73, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 17, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "12G3-E8", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVVVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSLAWMHVVRQSPEKKLEWVAQIKDKANNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKRSVYLQMNRLKEEDTAIYYCRGVYGFSGMTFPFDYWGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 74, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 75, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 76 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 77, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVAMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQVLIYKVSNRFSGIS

DRFSGSGSGADFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTOYPFTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 78, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "5B1-G2", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFSFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKANNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKGSIYLMNSLKEEDTAVYYCRGLYYGLFSPSDYWGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 79, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 80, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 76 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 81, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLLKPGQSPQLLIYKVSNRFSGIS

DRFSGGGSGTDFTLKISRLEPDDLGIYYCGOGTOYPFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 82, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "16F8-A7", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность

VETGGNLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYATYYAESVKG

RFTISRDDSKSSVYLQMNSLKEEDTAIYYCRYVNYGLAPMDVWGQGSTVTSS

(SEQ ID NO: 83, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 84, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSISCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGFS

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTOYPFTFGAGTKLELK

при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "11F9-F8", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNNYATYYAE

SVKGRFTISRDDSKTSVYLQLNSLREEDTAIYYCRGTOYGYNPFDYWGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 46, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 47, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVLQTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSS QSLVHNNGNTYLSWSLQKPGQSPQVLIY KVSNRFSGIS
NRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC GOGAHYPFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 87, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 88.

Антитело к CD3, называемое "3G5-E10", содержит: варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVKLVESGGGLVQPGRSLKLSCAAS GFNFENVYWMGWVRQAPGKGLEWIGE IKKDSNSINYTPSL
KEKFTISRDNANTLYLQVNKLGS EDTAIYYC AREERDGYFDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 89, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 90, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 91 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 32, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTCKAS ENVVTYVSWYQQKPEQSPKLLIY GASNRYTGVPDRFTG
SGSATDFTLTISSVQAEDLADYHC GQGYSPYPTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 92, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 93, CDR2-L, состоящий из последовательности "GAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 94.

Антитело к CD3, называемое "9D7-F3", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

AVQLVESGGGLVQPKESLKISCAAS GFTFSNAAMYWVRQAPGKGLEWVAR IRTKPNNYATYYAD
SVTGRFTISRDDSRSMVYLQMDNLQTEDTAMYYC TALISTAMAAWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 95, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 96, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 97 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 98, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTINCKAS QNINKYLNWYHQMLGEAPKLVIS NTNNLQAGIPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDVATYFC LQHRSGYTFGLGKLELK

(SEQ ID NO: 99, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 100, CDR2-L, состоящий из последовательности "NTN", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 101.

Антитело к CD3, называемое "8C2-F7", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKAS GYTFTDFAMNWVKQAPGNGLKWMGW INTOTGKPTYADGF
KQRFVFSLETSASTIYLQINN LNIEDTATYFC TRGALASVGQGLVTVSS

(SEQ ID NO: 102, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 103, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 104 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 105, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTQTPVSLSVSLGSHVSI SCRSS QSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIY KVSNRFSGIS
DRFSGSGSGTDFLTLEINRVEPDDLGVYYC GOGAQPFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 106, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "20E5-F10", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGENLVQPGKSLRLTCATS GFSFSNAWMHWIRQSPEKQLEWVAQ IKDKSNNYATYYAE
SVNGRFTISRDDSKSSIYLMHMDNLKEEDSAIYYC RYVHYGVRFFYTMDVWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 107, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 80, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 108, и варибельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVVMQTQTPVSLSVSLGDQVSI SCRPS QSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPHPLIY KVSNRFSGIS
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYC GOGTOYPTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 109, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последовательности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "20B5-F10", содержит

варибельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGSLVQPQKSLKLTCA~~TS~~GFTFSNAWMHWVRQSP~~EKQLEWVAQ~~IKAKSNNYATYYAE
SVKGRFTISRDDSISSVYLQMN~~NLKEEDTAIYYC~~RGVYYGFLGMDAWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 110, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под
SEQ ID NO: 37 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 111, и вариабельный домен легкой
цепи, состоящий из последовательности

DVVM~~TQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS~~ORLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLVYKVSNRFSGIS
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTEYPFTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 112, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 113, CDR2-L, состоящий из последова-
тельности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 114.

Антитело к CD3, называемое "6C9-C9", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

AVQLVESGGGLVPRPKESLKISCAASGFTFRNAAMYWVRQAPGKGLEWVARIRTQPNNYAKYYAD
SVKDRFTISRDDSKSMVYLQMDNLKTEDTAMYYCTGLVVTAMDAWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 115, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 116, CDR2-H с последовательностью под
SEQ ID NO: 117 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 118, и вариабельный домен легкой
цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPSFLSASVGD~~RVTINCKAS~~QNINKYLNWYQQKLG~~EAPKLLIY~~VTNNLQTGIPSRFSG
SGSGTDYTLTISSLPEDVATYFCLQHRSMYTFGTGTKELEK

(SEQ ID NO: 119, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 100, CDR2-L состоящий из последова-
тельности "VTN", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 120.

Антитело к CD3, называемое "3E8-G1", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQVVESGGGLVQPG~~RSKLKLS~~CAASGFTFSNYYMDWVRQAPKKGLEWVATITASGSRIYYPDSV
KGRFTISRDNAKSSLYLLMNSLKSEDTATYYCARERTDAYFDYWGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 121, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 122, CDR2-H с последовательностью под
SEQ ID NO: 123 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 124, и вариабельный домен легкой
цепи, состоящий из последовательности

QFILTQPN~~SVSTILGSTVKLSCKRS~~TGNIGTNYVS~~WYQHHEGRSPTTMIY~~RDDKRPDGPVDRFS
GSIDRSSNSALLTINN~~VQTEDEADYFC~~QSYISGLNPVFGGSGSKLTVL

(SEQ ID NO: 125, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 126, CDR2-L, состоящий из последова-
тельности "RDD", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 127.

Антитело к CD3, называемое "3H6-D2", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVETGGRLVQPQKSLKLTCA~~TS~~GFTFSNAWMHWVRQSP~~EKQLEWVAQ~~IKDKSNNYATYYAE
SVKGRFTISRDDSKSIIYLQMN~~SLKEEDTAIYYC~~RALTYGYKRDAMDGWHGTSVTVSS

(SEQ ID NO: 128, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под
SEQ ID NO: 19 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 129, и вариабельный домен легкой
цепи, состоящий из последовательности

DVVM~~TQTPVSLSVSLGGQVSISCRSS~~QSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGIS
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGOGTQYPFTFGAGTKLEIK

(SEQ ID NO: 130, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L, состоящий из последова-
тельности "KVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11.

Антитело к CD3, называемое "8H2", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDFAMNVVKQAPGNGLKWMGWINTQTGKPTYADGF
KQRFVFSLETSASTIYLQINN~~LNIEDTATYFC~~TRGALASVGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 131, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты),
содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 103, CDR2-H с последовательностью под
SEQ ID NO: 104 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 105, и вариабельный домен легкой
цепи, состоящий из последовательности

DVVMTQTPVSLVAIGQPASISCKSSQSLVGTSGKTYLNWLLQRPQGSPKRLLIYLVSKLDSGIP

DRFSGSGSETDFTLKISRVTDDLGVYYCLQGSHPFLTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 132, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 133, CDR2-L, состоящий из последовательности "LVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 134.

В варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению связывается с CD3 человека. В другом варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению дополнительно связывается с CD3 *Macaca fascicularis*. В частности, антитело к CD3 по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом CD3 человека, или CD3 как человека, так и *Macaca fascicularis*. Более конкретно, антитело связывается с CD3ε. Более конкретно, антитело к CD3 связывается с внеклеточным доменом CD3ε человека и *Macaca fascicularis*. Антитело к CD3 связывается с CD3ε, когда он присутствует в форме комплекса, такого как CD3ε/δ-комплекс, или когда он присутствует в качестве отдельного белка, не важно экспрессируется ли он в виде выделенной формы или присутствует в виде растворимого внеклеточного домена или полноразмерного заякоренного в мембране CD3ε, представленного, например, в Т-клетках.

Антитело к CD3 согласно настоящему изобретению является специфическим в отношении поверхностного белка CD3 человека, или белков CD3 как человека, так и *Macaca fascicularis*, в частности, в отношении CD3ε.

В варианте осуществления антитело к CD3 согласно настоящему изобретению характеризуется соотношением аффинности к CD3 *Macaca fascicularis* и аффинности к CD3 человека ($KD(\text{Macaca fascicularis})/KD(\text{человек})$), которое составляет ≤ 10 , в частности ≤ 6 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , например ≤ 2 , ≤ 1 или $\leq 0,5$. Такой полипептид согласно настоящему изобретению можно применять в токсикологических исследованиях, проводимых на обезьянах, поскольку профиль токсичности, наблюдаемый на обезьянах, соответствует ожидаемым потенциальным неблагоприятным эффектам у человека.

В частности, антитело к CD3 по настоящему изобретению не связывается с белком(ами) CD3γ и/или CD35 или не является в значительной степени перекрестно реактивным в их отношении.

В частности, антитело не связывается с внеклеточным доменом вышеупомянутого белка(ов) CD3γ и/или CD35 человека и *Macaca fascicularis* или не является в значительной степени перекрестно реактивным в их отношении.

Последовательность полноразмерного белка CD35 человека доступна в базе данных Uniprot под номером доступа P04234 (SEQ ID NO: 86, в виде, доступном на 14 декабря 2014 года). Внеклеточный домен CD35 человека состоит из аминокислот в положениях 22-105 из SEQ ID NO: 86.

Последовательность полноразмерного белка CD3γ человека доступна в базе данных Uniprot под номером доступа P09693 (SEQ ID NO: 185, в виде, доступном на 14 декабря 2014 года). Внеклеточный домен CD3γ человека состоит из аминокислот в положениях 23-116 из SEQ ID NO: 185.

Кроме того, антитело к CD3 согласно настоящему изобретению характеризуется аффинностью (KD) к CD3 человека или CD3 *Macaca fascicularis*, или обоим, которая составляет ≤ 90 нМ, ≤ 50 нМ, или ≤ 30 нМ, например, ≤ 20 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 8 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 4 нМ или ≤ 2 нМ, например аффинностью, составляющей от 0,1 до 10 нМ, в частности от 0,1 до 8 нМ или от 0,1 до 4 нМ.

Аффинность к CD3 человека или к CD3 *Macaca fascicularis* определяют в виде значения KD с помощью поверхностного плазмонного резонанса с применением растворимого рекомбинантного CD3ε/δ-комплекса из белков человека и *Macaca fascicularis* в качестве антигена для захвата.

В одном примере, аффинности связывания антитела к CD3 измеряют с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением, например, инструмента Biacore3000 (GE Healthcare). Буфер для анализа представляет собой, например, HBS-EP (BR-1001-88, GE Healthcare). В качестве антигена можно применять, например, конструкции на основании внеклеточного домена субъединиц CD3ε человека и CD3δ человека, включая сигнальный пептид, в форме белков слияния, содержащих Fc, как описано в примерах. В качестве альтернативы в качестве антигена можно применять конструкции на основе внеклеточного домена субъединиц CD3ε *Macaca fascicularis* и CD3δ *Macaca fascicularis*, включая сигнальный пептид, в форме белков слияния, содержащих Fc, как описано в примерах. Захват белков слияния, содержащих Fc и CD3ε/δ человека или *Macaca fascicularis*, достигается с применением, например, набора для захвата антител человека (GE Healthcare). Например, захватывающее антитело может быть соединено с чипами CM5 (BR-1001-88, GE Healthcare), например, до приблизительно 12000 RU с применением, например, набора для аминного связывания (BR-100-50, GE Healthcare). Белки слияния CD3ε/δ-Fc захватываются при 10 мкл/мин. до приблизительно 70 RU с обеспечением значений R_{max} , составляющих 30 RU. Кинетику связывания для антитела к CD3 можно измерять, например, при 30 мкл/мин в течение 240 и 600 с для фаз ассоциации и диссоциации соответственно. Например, можно применять двукратные разведения антитела к CD3 от 3 до 400 нМ в буфере для анализа. Регенерацию поверхности захвата можно проводить, например, с помощью 1-минутной инъекции, например 3М раствора $MgCl_2$ при 30 мкл/мин. Для анализа данных можно применять, например, программное обеспечение BIAevaluation.

tion v.4.1 (GE Healthcare). Данные можно аппроксимировать в целом с применением 1:1 модели Лэнгмюра с массообменом.

В варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению также характеризуется кажущейся EC50, например, определяемой с помощью анализа FACS на Т-клетках человека, которая составляет ≤ 60 нМ, например ≤ 50 нМ, ≤ 40 нМ, ≤ 30 нМ, ≤ 20 нМ или ≤ 15 нМ. Как правило, кажущаяся EC50 находится в пределах диапазона 1-60 нМ, в частности 1-30 нМ, например 1-20 нМ.

В одном варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению характеризуется активацией Т-клеток, которая составляет менее 10%, менее 8%, менее 6%, менее 4%, менее 2%, менее 1%, например, менее 0,5% в отсутствие целевых клеток.

Термином "активация Т-клеток" в данном документе называют запуск передачи сигнала с участием CD3, что влечет за собой слияние цитотоксических гранул, временный выброс цитокинов и пролиферацию. Антителоподобный связывающий белок и антитело к CD3 по настоящему изобретению нацеливается на CD3ε и активирует Т-клетки в присутствии целевых клеток; данную активность также называют "эффект вовлечения Т-клеток". Эффект вовлечения Т-клеток индуцирует цитотоксичность в отношении целевой клетки.

Как известно специалисту в данной области, активация Т-клеток индуцирует экспрессию поверхностного маркера, такого как CD69 и CD25. Активацию Т-клеток, таким образом, можно измерять путем обнаружения и измерения экспрессии CD4+/CD25+, CD4+/CD69+, CD8+/CD25+ или CD8+/CD69+ Т-клеток. Способы измерения активации Т-клеток известны специалисту в данной области.

Способ измерения активации Т-клеток дополнительно раскрыт в разделе примеров (пример 3.3). Соответственно, в контексте настоящего изобретения активацию Т-клеток измеряют или как процентную долю клеток, экспрессирующих CD69, в % от общего количества клеток, или как процентную долю клеток, экспрессирующих CD4 и CD69, в % от общего количества клеток, или как процентную долю клеток, экспрессирующих CD8 и CD69, в % от общего количества клеток.

"Низкой активацией Т-клеток" в контексте антитела к CD3 по настоящему изобретению называют менее чем 10%, менее чем 8%, менее чем 6%, менее чем 4%, менее чем 2%, менее чем 1%, например, менее чем 0,5% активацию Т-клеток в отсутствие целевых клеток.

Проводили выравнивание последовательностей областей VH и VL из антител к CD3, "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2" и "8H2". Сравнение последовательностей CDR-H и CDR-L в большинстве случаев указывает на то, что "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10" и "3H6-D2" являются близкородственными с точки зрения структуры, причем указанные антитела, вероятно, связываются с одним и тем же эпитопом. Сравнение последовательностей CDR-H и CDR-L из указанных родственных антител представлено на фиг. 1 и 2 соответственно. Идентифицировали положения CDR, которые были строго консервативными у разных антител и которые, таким образом, предположительно важны с точки зрения специфичности, тогда как остальные положения могли содержать замену.

Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H, состоящий из последовательности GFX₁X₂X₃X₄AW (SEQ ID NO: 331), где X₁ представляет собой Т или S, X₂ представляет собой F или V, X₃ представляет собой S или T, а X₄ представляет собой N, K, L или Y, или любая их комбинация; и

CDR2-H, состоящий из последовательности IKX₁X₂X₃NX₄YX₅T (SEQ ID NO: 332), где X₁ представляет собой A или D, X₂ представляет собой K или R, X₃ представляет собой S или A, X₄ представляет собой N или S и X₅ представляет собой A или E, или любая их комбинация; и

CDR3-H, состоящую из последовательности TWRHYSSHTMDA (SEQ ID NO: 69), или RALTYYGKRDAMDG (SEQ ID NO: 129), или RX₁X₂X₃YX₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁DX₁₂ (SEQ ID NO: 333), где X₁ представляет собой Y, G или A, X₂ представляет собой V, T или L, X₃ представляет собой H, N, Y или Q, X₄ представляет собой G, R или

A, X₅ представляет собой F, или V, или отсутствие аминокислоты, X₆ представляет собой R или отсутствие аминокислоты, X₇ представляет собой F, S, или I, или отсутствие аминокислоты, X₈ представляет собой F, L, N, M, Y, S, A или G, X₉ представляет собой Y, A, K, S, N, T, F или L, X₁₀ представляет собой A, P, G или T, X₁₁ представляет собой M, L, F или S, а X₁₂ представляет собой A, V или Y, или любая их комбинация, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L, состоящий из последовательности QX₁LX₂HX₃NGX₄TY (SEQ ID NO: 334), где X₁ представляет собой R или S, X₂ представляет собой V или E, X₃ представляет собой N, D или T, а X₄ представляет собой N или Y, или любая их комбинация; и

CDR2-L, состоящую из последовательности "KVS"; и

CDR3-L, состоящий из последовательности GQGX₁X₂YPFT (SEQ ID NO: 335), где X₁ представляет собой T, A или S, а X₂ представляет собой H, E или Q, или любая их комбинация.

ID NO: 111 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 111 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 113 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 113 одной аминокислотной заменой; CDR2-L с последовательностью "KVS" или последовательностью, отличающейся от последовательности "KVS" одной аминокислотной заменой, и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 114 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 114 одной аминокислотной заменой; или

у) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 116 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 116 одной аминокислотной заменой; CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 117 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 117 одной или несколькими аминокислотными заменами; CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 118 или последовательностью,

отличающейся от SEQ ID NO: 118 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 100 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 100 одной аминокислотной заменой; CDR2-L с последовательностью 'VTN' или последовательностью, отличающейся от последовательности 'VTN' одной аминокислотной заменой, и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 120 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 120 одной аминокислотной заменой; или

з) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 122 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 122 одной аминокислотной заменой; CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 123 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 123 одной или несколькими аминокислотными заменами; CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 124 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 124 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 126 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 126 одной аминокислотной заменой; CDR2-L с последовательностью "RDD" или последовательностью, отличающейся от последовательности "RDD" одной аминокислотной заменой, и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 127 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 127 одной аминокислотной заменой; или

аа) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 13 одной аминокислотной заменой; CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 19 одной или несколькими аминокислотными заменами; CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 129 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 129 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10 или последовательностью,

отличающейся от SEQ ID NO: 10 одной аминокислотной заменой; CDR2-L с последовательностью "KVS" или последовательностью, отличающейся от последовательности "KVS" одной аминокислотной заменой, и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 11 одной аминокислотной заменой; или

bb) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 103 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 103 одной аминокислотной заменой; CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 104 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 104 одной или несколькими аминокислотными заменами; CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 105 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 105 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 133 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 133 одной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью "LVS" или последовательностью, отличающейся от последовательности "LVS" одной аминокислотной заменой, и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 134 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 134 одной аминокислотной заменой.

Одну или несколько отдельных аминокислот можно изменить путем введения замены, в частности, консервативной замены, в одну или несколько вышеуказанных последовательностей CDR. Такое изменение может подразумевать, например, удаление участка гликозилирования или участка дезамидирования в сочетании с гуманизацией антителя.

Исходя из выравнивания последовательностей областей VH и VL из "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10" и "3H6-D2" были идентифицированы различные аминокислотные замены. Следовательно, в одном варианте осуществления аминокислота является замещенной:

в CDR1-H, в одном или нескольких из положений 3-6, например, в положении 3, 5 или 6 из CDR1-H

с последовательностью GFTFSNAW (SEQ ID NO: 13), или, например, в положении 4 и 5 в CDR1-H с последовательностью GFTFSNAW (SEQ ID NO: 13); и/или

в CDR2-H, в одном или нескольких из положений 3-5, 7 и 9, например, в положениях 3, 4, 5, 7 или 9 из CDR2-H с последовательностью IKAKSNNYAT (SEQ ID NO: 37), или, например, в положениях 3 и 5 или 3 и 7 в CDR2-H с последовательностью IKAKSNNYAT (SEQ ID NO: 37); и/или

в CDR3-H, в одном или нескольких из положений 2-4, 7-10 и 12, например, в положениях 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 и 10, или в положениях 2, 4, 6, 8, 10 и 12, или в положениях 2, 3, 7 и 8 из CDR3-H с последовательностью RGVYYALSPFDY (SEQ ID NO: 8), или в положении 7 и 8 из CDR3-H с последовательностью RGLYYGLSPSDY (SEQ ID NO: 38), или в положениях 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 и 10 в CDR3-H с последовательностью RGLYYGLSPSDY (SEQ ID NO: 38); и/или

в CDR1-L, в одном или нескольких из положений 2, 4, 6 и 9, например, в положении 6 из CDR1-L с последовательностью QSLVHDNGNTY (SEQ ID NO: 17) или QSLVHTNGNTY (SEQ ID NO: 27), или в положении 2 в CDR1-L с последовательностью QSLVHNNNGNTY (SEQ ID NO: 10) или QRLVHNNNGNTY (SEQ ID NO: 113), или в положении 4, 6 и 9 в CDR1-L с последовательностью QSLVHNNNGNTY (SEQ ID NO: 10); и/или

в CDR3-L, в одном или нескольких из положений 4 и 5, например, в положении 4 из CDR3-L с последовательностью GQGSQYPFT (SEQ ID NO: 71) или GQGTQYPFT (SEQ ID NO: 11), или в положении 4 и 5 в CDR3-L с последовательностью GQGAHYPFT (SEQ ID NO: 88) или в положении 5 в CDR3-L с последовательностью GQGTHYPFT (SEQ ID NO: 28) или GQGTEYPFT (SEQ ID NO: 114).

Антитело к CD3 согласно настоящему изобретению, в частности, представляет собой традиционное антитело, в частности традиционное моноклональное антитело или фрагмент антитела, биспецифическое или полиспецифическое антитело.

Антитело к CD3 согласно настоящему изобретению, в частности, содержит или состоит из IgG или его фрагмента.

Согласно дополнительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к антителу к CD3, которое содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 6, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 7, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 8, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 142, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

б) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 14, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 15, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 184, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

с) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 20, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 22, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

д) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 24, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 25, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 27, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28; или

е) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 30, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 31, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 32, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 34, CDR2-L с последовательностью "RDD" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 35; или

ф) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 38, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28; или

г) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 37, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 41, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 17, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

t) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 89 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 92 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

u) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 95 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 99 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

v) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 102 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 106 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

w) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 107 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 109 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

x) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 110 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 112 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

y) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 115 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 119 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

z) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 121 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 125 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

aa) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 128 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 130 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

bb) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 131 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 132 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей.

Например, последовательность вариабельного домена тяжелой или легкой цепи может отличаться от эталонной последовательности под SEQ ID NO: 5, 9, 12, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 92, 95, 99, 102, 106, 107, 109, 110, 112, 115, 119, 121, 125, 128, 130, 131, 132, при необходимости, одной или несколькими аминокислотными заменами, в частности, одной или несколькими консервативными аминокислотными заменами и/или заменами на канонические остатки. В частности, последовательность вариабельного домена тяжелой или легкой цепи может отличаться от эталонной последовательности под SEQ ID NO: 5, 9, 12, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 92, 95, 99, 102, 106, 107, 109, 110, 112, 115, 119, 121, 125, 128, 130, 131, 132 только консервативной аминокислотной заменой(ами).

Изменения последовательности по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 5, 9, 12, 16, 18, 21, 23, 26, 29, 33, 36, 39, 40, 42, 43, 45, 46, 48, 49, 53, 56, 59, 60, 62, 63, 66, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 82, 83, 85, 87, 89, 92, 95, 99, 102, 106, 107, 109, 110, 112, 115, 119, 121, 125, 128, 130, 131, 132, в частности, будут присутствовать в основном в одной или нескольких карманных областях, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и/или FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

Однако также возможны аминокислотные замены в одном или нескольких CDR. В частности, последовательность вариабельного домена легкой цепи может отличаться от последовательности под SEQ ID NO: 9 по меньшей мере заменой S на R в положении 28 из SEQ ID NO: 9 (в CDR1-L), и/или по меньшей мере заменой V на E в положении 30 из SEQ ID NO: 9 (в CDR1-L), и/или по меньшей мере заменой N на D или T в положении 33 из SEQ ID NO: 9 (в CDR1-L), и/или по меньшей мере заменой N на Y в положении 35 из SEQ ID NO: 9 (в CDR1-L), и/или последовательность вариабельного домена легкой цепи может отличаться от последовательности под SEQ ID NO: 9 по меньшей мере заменой T на S или A в положении 97 из SEQ ID NO: 9 (в CDR3-L), и/или по меньшей мере заменой Q на H или E в положении 98 из SEQ ID NO: 9 (в CDR3-L), и/или вариабельный домен тяжелой цепи может отличаться от последовательности под SEQ ID NO: 5 по меньшей мере заменой T на N или S в положении 28 из SEQ ID NO: 5 (в CDR1-H), и/или по меньшей мере заменой F на V в положении 29 из SEQ ID NO: 5 (в CDR1-H), или по

меньшей мере заменой Т на N или Y в положении 30 из SEQ ID NO: 5 (в CDR1-H), или по меньшей мере заменой K на L или Y в положении 31 из SEQ ID NO: 5 (в CDR1-H), и/или переменный домен тяжелой цепи может отличаться от последовательности под SEQ ID NO: 5 по меньшей мере заменой D на A в положении 53 из SEQ ID NO: 5 (в CDR2-H), или по меньшей мере заменой K на R в положении 54 из SEQ ID NO: 5 (в CDR2-H), или по меньшей мере заменой S на A в положении 55 из SEQ ID NO: 5 (в CDR2-H), или по меньшей мере заменой S на N в положении 57 из SEQ ID NO: 5 (в CDR2-H), или по меньшей мере заменой A на E в положении 59 из SEQ ID NO: 5 (в CDR2-H), и/или переменный домен тяжелой цепи может отличаться от последовательности под SEQ ID NO: 5 по меньшей мере заменой G на A в положении 100 из SEQ ID NO: 5 (в CDR3-H) и/или по меньшей мере заменой Т на V в положении 101 из SEQ ID NO: 5 (в CDR3-H), по меньшей мере заменой Q на Y в положении 102 из SEQ ID NO: 5 (в CDR3-H).

В одном варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению и его фрагмент представляют собой антитело крысы и фрагмент антитела крысы соответственно.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело к CD3 по настоящему изобретению также может быть химерным антителом и, в частности, антителом крысы/человека, например антителом, содержащим переменные домены тяжелой и легкой цепей крысы и CH-домен и CL-домен из антитела человека.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения антитело к CD3 также может быть гуманизированным антителом или фрагментом гуманизованного антитела, полученными, например, с помощью привития CDR или с помощью 4D-способа (US 20110027266).

Соответственно, в одном варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению представляет собой гуманизованное антитело, содержащее:

а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 153, и

переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, или

б) переменный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 181, SEQ ID NO: 183, и

переменный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 182.

Согласно дополнительному варианту осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению представляет собой гуманизованное антитело, содержащее:

а) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 138 и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 143; или

б) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 171 и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 158; или

с) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 176 и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 164.

В одном варианте осуществления антитело к CD3 согласно настоящему изобретению содержит последовательности трех CDR или переменный домен тяжелой цепи, или последовательности шести CDR или переменные домены тяжелой и легкой цепей одного из антител к CD3, названия которых перечислены выше.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фрагменту гуманизованного антитела к CD3, определяемого выше. В одном варианте осуществления гуманизованное антитело к CD3, описанное выше, представляет собой химерное антитело.

Антитело к CD3 согласно настоящему изобретению также может представлять собой однодоменное антитело или его фрагмент. В частности, фрагмент однодоменного антитела может состоять из переменной области тяжелой цепи (VHH), которая содержит CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H одного из антител, описанных выше. Антитело к CD3 также может представлять собой антитело, состоящее только из тяжелой цепи, т.е. антитело, не имеющее легкой цепи, которое может содержать или может не содержать CH1-домен.

Однодоменное антитело или его фрагмент также может содержать каркасные области из однодоменного антитела верблюдовых и необязательно константный домен из однодоменного антитела верблюдовых.

Антитело к CD3 согласно настоящему изобретению также может быть фрагментом антитела, в частности фрагментом гуманизованного антитела, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ и диател.

Соответственно, антитело к CD3 по настоящему изобретению представляет собой Fab, содержащий или состоящий из:

- а) аминокислотной последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 186 и/или аминокислотной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 187; или
- б) аминокислотной последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 188 и/или аминокислотной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 189; или
- с) аминокислотной последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 190 и/или аминокислотной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 191; или
- д) аминокислотной последовательности тяжелой цепи под SEQ ID NO: 192 и/или аминокислотной последовательности легкой цепи под SEQ ID NO: 193.

В варианте осуществления антитело к CD3 является биспецифическим или полиспецифическим антителом, образованным по меньшей мере из одного фрагмента антитела или по меньшей мере одного вариабельного домена антител к CD3 по настоящему изобретению. Полиспецифические антитела представляют собой поливалентные белковые комплексы, описываемые, например, в EP 2050764 A1 или US 2005/0003403 A1.

Биспецифические или полиспецифические антитела к CD3 согласно настоящему изобретению могут характеризоваться специфичностью в отношении (а) внеклеточного домена CD3 человека или человека и *Macaca fascicularis*, на который нацеливается одно из описанных выше антител к CD3, и (б) по меньшей мере одного другого антигена.

В одном варианте осуществления другой антиген представляет собой CD123 и, соответственно, полученное биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело к CD3/CD123. Традиционные биспецифические антитела могут быть получены с помощью методик, которые известны специалисту в данной области.

Антитела и фрагменты антител к CD3 согласно настоящему изобретению можно применять в виде выделенных (например, очищенных) молекул или содержащихся в переносчике, таком как мембрана или липидная везикула (например, липосома).

В одном дополнительном варианте осуществления антитело к CD3 по настоящему изобретению служит для применения в получении антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению, дополнительно определяемого в разделе "Антителоподобный связывающий белок".

Любая комбинация вышеупомянутых вариантов осуществления составляет часть настоящего изобретения.

Антитела к CD123.

"CD123" (кластер дифференцировки 123) также известен как "рецептор интерлейкина 3, альфа (IL3RA)" или "IL3R", "IL3RX", "IL3RY", "IL3RAY", "hIL-3Ra" и обозначает специфическую в отношении интерлейкина 3 субъединицу гетеродимерного цитокинового рецептора. Функциональный рецептор интерлейкина 3 представляет собой гетеродимер, который содержит специфическую альфа-цепь (IL-3A; CD123) и бета-цепь рецептора IL-3 (β ; CD 131), которая общая с рецепторами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина 5 (IL-5). CD123 представляет собой интегральный трансмембранный белок I типа с предсказанной молекулярной массой, составляющей приблизительно 43 кДа, который содержит внеклеточный домен, вовлеченный в связывание IL-3, трансмембранный домен и короткий цитоплазматический хвост из приблизительно 50 аминокислот. Внеклеточный домен составляют две области: N-концевая область из приблизительно 100 аминокислот, последовательность которой проявляет сходство с эквивалентными областями альфа-цепей рецепторов GM-CSF и IL-5; и область вблизи трансмембранного домена, которая содержит четыре консервативных цистеиновых остатка и мотив WSXWS, общий для других представителей этого семейства цитокиновых рецепторов. Домен связывания IL-3 содержит мотивы цитокиновых рецепторов (CRM) из приблизительно 200 аминокислотных остатков, которые составлены из двух Ig-подобных складчатых доменов. Внеклеточный домен CD123 является в высокой степени гликозилированным, при этом N-гликозилирование необходимо как для связывания лиганда, так и для передачи сигнала рецептором. Семейство белков объединяет трех представителей: IL3RA (CD123A), CSF2RA и IL5RA. Общая структура у трех представителей является в существенной степени консервативной, но степени гомологии последовательностей очень низки. На данный момент была открыта одна изоформа CD123 длиной 300 аминокислот, но только на уровне РНК, которая доступна в базе данных Genentry под номером доступа ACM24116.1.

В патенте США № 6177078 раскрыто моноклональное антитело 7G3 к альфа цепи рецептора IL-3 (IL-3R α , CD123) и способность 7G3 связываться с N-концевым доменом, а именно, аминокислотными остатками 19-49, IL-3R α . В патенте США № 6733743 раскрыт способ ослабления клетки-предшественника гемабластоza, которая экспрессирует CD123, но не экспрессирует в значительной степени CD131, путем приведения клетки в контакт с композицией из антитела и цитотоксического средства (выбранного из химиотерапевтического средства, токсина или радиоизотопа, излучающего альфа-частицы), причем композиция селективно связывается с CD123 в количестве, эффективном для обеспечения гибели клетки. Однако оставалось неясно, может ли нацеливание на CD123 приводить к функцио-

нальным нарушениям в AML-LSC.

Эталонная последовательность полноразмерного белка CD123 человека, включая сигнальный пептид, доступна из базы данных NCBI под номером доступа NP_002174.1 и в Uniprot под номером доступа P26951, а также раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 194 (в виде, доступном на 14 декабря 2014 года). Эталонная последовательность полноразмерного белка CD123 *Macaca fascicularis*, включая сигнальный пептид, доступна из базы данных GenBank под номером доступа EHH61867.1 и в Uniprot под номером доступа G8F3K3, а также раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 195 (в виде, доступном на 14 декабря 2014 года).

Последовательность белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD123 человека с меткой Strep-II, клонированного авторами настоящего изобретения из геномной ДНК, раскрыта под SEQ ID NO: 196. Указанный белок слияния, содержащий Fc и зрелый CD123 человека, содержит аминокислоты 19-305 из полноразмерного белка CD123 человека и, таким образом, содержит внеклеточный домен CD123 человека.

Последовательность белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD123 *Macaca fascicularis* с меткой Strep-II, клонированного авторами настоящего изобретения из кДНК, раскрыта под SEQ ID NO: 197. Указанный белок слияния, содержащий Fc и зрелый CD123 *Macaca fascicularis*, содержит аминокислоты 19-305 из полноразмерного белка CD123 *Macaca fascicularis* и, таким образом, содержит внеклеточный домен CD123 *Macaca fascicularis*.

Доменная организация CD123 человека и *Macaca fascicularis* является следующей (на основании последовательности CD123 человека, доступной в базе данных NCBI под номером доступа NP_002174.1 (SEQ ID NO: 194) и основана на последовательности CD123 *Macaca fascicularis*, доступной в базе данных Uniprot под номером доступа G8F3K3, SEQ ID NO: 195).

Домены	CD123	Положения в SEQ ID	Положения в SEQ ID
		NO: 194	NO: 195
человека		(человек)	(<i>Macaca fascicularis</i>)
Внеклеточный		19-305	19-305
Трансмембранный домен		306-325	306-325
Цитоплазматический		326-378	326-378

Соответственно, внеклеточный домен CD123 человека состоит из аминокислот в положениях 19-305 из SEQ ID NO: 194.

CD123 (альфа-цепь рецептора интерлейкина-3, IL-3R α) представляет собой опухолевый антиген, который сверхэкспрессируется при различных гематологических новообразованиях. Большая часть бластных клеток при AML экспрессирует на поверхности CD123, и такая экспрессия не варьирует у подтипов AML. Как сообщалось, более высокая экспрессия CD123 при AML в момент постановки диагноза ассоциирована с более неблагоприятным прогнозом. Об экспрессии CD123 сообщалось при других гематологических злокачественных опухолях, включая миелодисплазию, системный мастоцитоз, новообразование из бластных плазмцитоидных дендритных клеток (BPDCN), ALL и злокачественный ретикулоэндотелиоз.

CD123 экспрессируется на лейкозных стволовых клетках AML, и возрастающее число фактов позволяет предположить, что AML возникает из этих LSC, которые, как было показано, являются покоящимися и относительно устойчивыми к химиотерапии, повреждающей ДНК. Выказывалась гипотеза, что персистенция LSC лежит в основе рецидива после первичной ремиссии и, таким образом, уничтожение LSC можно считать требованием для излечения и важной терапевтической задачей.

"Лейкозные стволовые клетки (LSC)" представляют собой раковые клетки, которые обладают характеристиками, присущими нормальным стволовым клеткам, а именно, свойством самообновления и способностью к развитию в многочисленные линии. Предполагается, что такие клетки персистируют в гемобластах, таких как AML, в качестве отдельных популяций. LCS, присутствующие у пациентов с AML, представляют собой так называемые "AML-LCS".

"Острый миелоидный лейкоз (AML)" представляет собой клональное нарушение, которое клинически проявляется как повышенная пролиферация гетерогенных и недифференцированных миелоидных бластных клеток. Иерархическая структура лейкоза поддерживается небольшой популяцией LSC (AML-LCS), которые характеризуются выраженной способностью к самообновлению и способны дифференцироваться в клетки-предшественники лейкоза. Эти клетки-предшественники образуют огромные количества бластных клеток лейкоза, которые легко обнаруживаются у пациентов при постановке диагноза и рецидиве, который приводит в конечном итоге к смерти. Обычно сообщалось, что AML-LSC представляют собой покоящиеся клетки, в отличие от быстро делящихся клоногенных клеток-предшественников. Это свойство AML-LSC делает традиционные химиотерапевтические препараты, которые нацеливаются на делящиеся клетки, менее эффективными, что возможно объясняет современные данные, согласно ко-

торым большая доля пациентов с AML входит в состояние полной ремиссии, но почти всегда происходит рецидив, при этом <30% взрослых пациентов выживают в течение более 4 лет. Кроме того, появление минимальной остаточной болезни и малый процент выживания были характерны при высокой частоте LSC в момент постановки диагноза у пациентов с AML. Следовательно, для долгосрочного ведения AML (и также других вышеупомянутых состояний гемабластозов) необходимо, чтобы разрабатывались новые средства лечения, которые специфически уничтожают LSC.

Сообщалось о сверхэкспрессии CD123 на бластных клетках AML и на CD34⁺/CD38 AML-LSC по сравнению с нормальными гемопоэтическими клетками.

Таким образом, CD123 представляет собой важную терапевтическую мишень для терапии рака, в частности, для терапии рака у пациентов с плохим прогнозом.

Авторы настоящего изобретения добились успеха в получении, скрининге и отборе специфических антител мыши и крысы к CD123, которые проявляют высокую степень аффинности к белку CD123 как человека, так и Macaca fascicularis и которые не являются в значительной степени перекрестно-реактивными в отношении белков CSF2RA и IL5RA человека и белков CD3 Macaca fascicularis.

Авторы настоящего изобретения определили последовательность вариабельной области тяжелой и легкой цепей таких моноклональных антител, антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8" и "9F6-G3".

Антитело к CD123, называемое "3E3-D3", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTTYDVHWVRQPPGKGLEWMGRIQNGGITDYNALK

SRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMFYCAKTGSYFYAFDHWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 226, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 227, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 228 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 229, или

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTTYDVHWVRQPPGKGLEWMGRIQNAGITDYNALK

SRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMFYCAKTGSYFYAFDHWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 277, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 227, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 353 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 229, или

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTTYDVHWVRQPPGKGLEWMGRIQDGGITDYNALK

SRLIISRDTSKSQVFLKMNSVQTEDTAMFYCAKTGSYFYAFDHWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 278, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 227, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 279 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 229, и вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

QFVLTPQNSVSTNLGSGTVKLSCKRNTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPDGVPRFS

GSIDRSSNSALLTINNVTQTEADYFCQSYSSGINIIIFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 230, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 231, CDR2-L, состоящий из последовательности "RDD", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 232.

Антитело к CD123, называемое "1E1-G5", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAFGYTFTHDIHWWKQSHGKSLEWIGYINPYSGGTNYNEKF

KSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSEDSALCYCALNYGSSYAMDAGWGQTSVTVSS

(SEQ ID NO: 198, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 199, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 200 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPASLSASLGQTVTIECRPSEDIYSNLAWFQQKPGSSPQLLIYDANNLADGVPSRFSG

SGSGTQYSLKINSLSQSEDVASYFCQYNYKYPYTFGTGKLELK

(SEQ ID NO: 202, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 203, CDR2-L, состоящий из последовательности "DAN", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 204.

Антитело к CD123, называемое "2B8-F3", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSDYNMAWVRQAPKKGLEWVATILYDGGRTYYRGSV

KGRFTISRDNASTLYLRMSLRSEDATATYYCATHSRGTDYFDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 205, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 206, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 207 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 208, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

EIVLTQSPSTMTASPGEQVTITCRASSSINYMHWYQQKPGASPRPWIYETSKLASGVPDRFSGS

ASGTSYSLTINNMEAEDAATYYCQOWNYPSWTFGGGTKLELK

(SEQ ID NO: 209, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 210, CDR2-L, состоящий из последовательности "ETS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 211.

Антитело к CD123, называемое "2F8-D6", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLKESGPGGLVQPSQTLSTCTVSGFSLSYGVSWVRQPPGKGLEWVATISSAGSTYYDLVLK

SRLSITRDTSKSQVFLKVHSLQTEDTAIYLCARDAPVFNYGSYNAMDSWGQGSTVTVSS

(SEQ ID NO: 212, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 213, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 214 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 215, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPSFLSATVGDRVTINCKASQNKYLNWYQQKLGAPKRLIYNTNSLQTGIPSRFSG

SGSGTDYTLTISSLQPEDVATYFCLQHKSGLTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 216, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 217, CDR2-L, состоящий из последовательности "NTN", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 218.

Антитело к CD123, называемое "3B10-E6", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQQSGPELRRPGSSVRLSCKASGYRIKDFLIHWIKNRPEHGLEWIGWIDPPEDGETKYAQKF

QTKATLTADTSSNTAYMQLSSLTSEDATATYFCARWGDVYYGLMRGHVMDAWGQGSTVTVSS

(SEQ ID NO: 219, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 220, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 221 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 222, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DVLMTQTPVSLPVSLLGGQVSISCRSSQSLVHSDGDTYHLHWYLOKPGQSPQLLIYRVSNRFGVP

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPEDLGLYYCLQTTHFPFWTFGGGKLEMK

(SEQ ID NO: 223, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 224, CDR2-L, состоящий из последовательности "RVS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 225.

Антитело к CD123, называемое "5A5-B4", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QIQIVQSGSDVTSTCNGCGTCYFSGFSLSTTGICVSWIRQPSGKGQEWLADFCWDDGKGYNPSSL

KNRLSISKDTSNNQVFLKITSVDATATATYYCARRRVYYGIYFDYWGQGMVTVSS

(SEQ ID NO: 233, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 234, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 235 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 236, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIVMTQSPALAVSPGERVSISCRASNSVSTRMHWYQQKPGQPKLLIYGASNLESGVPARFSGS

SGSGTDFTLTIDPVEADDIATYFCQSQSWNDPLTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 237, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 238, CDR2-L, состоящий из последовательности "GAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 239.

Антитело к CD123, называемое "6B10-E4", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSHYNMAWVRQAPKKGLEWVATITYDDHSTYYRDSV

KGRFTISRDTAKSTLYLQMDSLRSEDATATYYCARLVNYAFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 240, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 241, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 242 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 243, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

NIVMTQSPKSMSSISVGDRVTMNCASQTVGNNIAWYQKPGLSPLQLLIDYASNRYTGVPNRFRTG
GGYGTDFILTINSVQAEDAAFYCYQRMYSPTFGGGTKLELK

(SEQ ID NO: 244, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 245, CDR2-L, состоящий из последовательности "YAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 246.

Антитело к CD123, называемое "6C10-C4", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVKLQESGSPSLVQPSSETLSLTCTVS**GFSLTSYS**VHWVRQHSKGSLWGMGR**MWNDGDT**SYNSAFT

SRLSISRDTSGQVFLKMNSLQTEDTGTYCY**ARGHRTPF**DYWGQGVMTVSS

(SEQ ID NO: 247, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 248, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 249 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 250, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSS**QSFLSSGDERNY**VAWYQHKPGQSPKLLIY**WAS**TRHSGV

PDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYCYQYYDTPLTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 251, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 252, CDR2-L, состоящий из последовательности "WAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 253.

Антитело к CD123, называемое "6D6-B8", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGFTLVKPGDSVKMSCKAS**YTFTDNI**IHWVKQSHGKSLDWIGY**INPYSGGT**NYNGWF

RSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSDDSAIYCY**ALNYGSYYAMDA**WGQGSTVTVSS

(SEQ ID NO: 254, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 255, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 200 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPASLSASLGFTVTIDCRPSEDI**FNN**LAWYQKPGNSPQLLIY**DAN**SLADGVPSRFSG

SGSGTQYSLMIIRLQSEDVASYFCHQYNIYPYTFGAGTKLELK

(SEQ ID NO: 256, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 257, CDR2-L, состоящий из последовательности "DAN", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 258.

Антитело к CD123, называемое "8B11-B7", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGPTLVNPGDSVKMSCKAS**GYTFTDHI**IHWVKQSHGKSLWIGY**INPYSGGA**NYNGKF

KSKATLTIDKSSSTAYMEFSRLTSGDSAIYCY**ALNYGSYYAMDA**WGQGSTVTVSS

(SEQ ID NO: 259, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 199, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 260 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPASLSASLGFTVTIECRTSKDIYSNLAWFQQEPGNSPQLLIY**DAN**SLADGVPSRFSG

SGSGTQYSLQINNLSQSEDVASYFCHQYNNYPYTFGTGKLELK

(SEQ ID NO: 261, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 262, CDR2-L, состоящий из последовательности "DAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 263.

Антитело к CD123, называемое "9B8-G6", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVKLQESGSPSLVQSSQTLSTCTVS**GFSLTSYH**IHWVRQPPGKGLEWGMV**MWSDGDT**SYSSALK

SRLSISRDTSSQVFLKMNSLQTEDTATYCY**ARGDYSSYIYLWFAY**WGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 264, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 265, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 266 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 267, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIVMTQSPSSLAVSAGETVTINCKSS**QSFLSSGDERNY**VAWYQHKPGQSPKLLIY**WAS**TRHSGV

PDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLAIYCYQYYDTPLTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 251, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 252, CDR2-L, состоящий из последовательности "WAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 253.

Антитело к CD123, называемое "9D7-C8", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVKLQESGSLVQSSQTLSTCTVSGFSLTSYHIHWVRQTPGKGLEWVGVMWSDGDTSYNSALK

SRLSISRDTSSQSVFLKMNSLQTEDTATYYCARGYYSSYLWLFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO: 268, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 265, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 266 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 269, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIVMTQSPSSLAVSEGETVTINCKSSQSFLSSGDGKNYVAWYQYKPGQSPKLLIYWASTRQSGV

PDRFIGSGSGTDFTLTISTVQAEDLAIYYCQYYDTPLTFGSGTKLEIK

(SEQ ID NO: 270, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 271, CDR2-L, состоящий из последовательности "WAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 253.

Антитело к CD123, называемое "9F6-G3", содержит

вариабельный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKASGYTFTDYIIHWVKQSHGKSLIEWIGYINPYSDGTNYNEKF

KSKATLTVDKSTSTAYMEFSRLTSEDAIYFCALNYGSYYAMDAWGQGTSTVTVSS

(SEQ ID NO: 272, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 273, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 274 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DIQMTQSPASLSASLGETVTITIECRPSEDIHSNVAWYQQKPGNSPQLLIYDASNLADGVPSRFSG

SGSGTQYSLKINSLSQSEDAVSYFCHQYNIYPYTFGSGTKLELK

(SEQ ID NO: 275, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 276, CDR2-L, состоящий из последовательности "DAS", и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 258.

В одном аспекте настоящего изобретения антитело к CD123 связывается с CD123 человека. В другом варианте осуществления антитело к CD123 дополнительно связывается с CD123 *Macaca fascicularis*. В частности, антитело к CD123 по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом CD123 человека или CD123 как человека, так и *Macaca fascicularis*. Более конкретно, антитело к CD123 связывается с дистальным фрагментом CD123, например, с аминокислотами в положении 19-49 CD123 человека с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 194. Антитело к CD123 связывается с CD123, не важно экспрессируется ли он в виде выделенной формы или присутствует в виде растворимого внеклеточного домена или полноразмерного заякоренного в мембране CD123, представленного в клетках, экспрессирующих CD123, таких как клетки AML или клетки, трансфицированные с помощью CD123. Антитело к CD123 согласно настоящему изобретению является специфическим в отношении клеток, которые экспрессируют белки CD123 человека и *Macaca fascicularis* на своей поверхности, например, раковых клеток, экспрессирующих CD123.

Антитело к CD123 согласно настоящему изобретению характеризуется соотношением аффинности к CD123 *Macaca fascicularis* и аффинности к CD123 человека ($KD(\text{Macaca fascicularis})/KD(\text{человек})$), которое составляет ≤ 10 , в частности, ≤ 6 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , ≤ 2 , ≤ 1 или $\leq 0,5$. Таким образом, полипептид согласно настоящему изобретению можно применять в токсикологических исследованиях, проводимых на обезьянах, поскольку профиль токсичности, наблюдаемый на обезьянах, соответствует ожидаемым потенциальным неблагоприятным эффектам у человека.

В частности, антитело к CD123 по настоящему изобретению не связывается с белками CSF2RA и/или IL5RA или не является в значительной степени перекрестно реактивным в их отношении.

В частности, антитело не связывается с внеклеточным доменом вышеупомянутого белка(ов) CSF2RA и/или IL5RA человека и *Macaca fascicularis* или не является в значительной степени перекрестно реактивным в их отношении.

Кроме того, антитело к CD123 согласно настоящему изобретению характеризуется аффинностью (KD) к CD123 человека или CD123 *Macaca fascicularis*, или обоим, которая составляет ≤ 50 нМ, ≤ 40 нМ, ≤ 30 нМ, например, ≤ 20 нМ, < 15 нМ, < 10 нМ, ≤ 8 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ или $\leq 0,5$ нМ, например, аффинность составляет от 0,1 нМ до 20 нМ, например, от 0,1 нМ до 10 нМ, в частности, от 0,1 нМ до 2 нМ или от 0,1 нМ до 1 нМ.

В одном примере аффинность к CD3 человека или к CD3 *Macaca fascicularis* определяют как значение KD с помощью поверхностного плазмонного резонанса с применением рекомбинантного белка CD123 от человека и *Macaca fascicularis* в качестве антигена захвата, например, с применением белка слияния, содержащего Fc и CD123 человека и *Macaca fascicularis*.

В качестве антигена можно применять, например, внеклеточный домен CD123 человека или *Macaca fascicularis*, включая сигнальную последовательность, соответствующий аминокислотной последовательности от положения M1 до R305 из белка дикого типа (SEQ ID NO: 194 (человек), SEQ ID NO: 195 (Ma-

casca fascicularis)). Полученная аминокислотная последовательность зрелого белка CD123 человека или *Macaca fascicularis* приведена под SEQ ID NO: 196 и SEQ ID NO: 197 соответственно. Измерения с помощью Biotec известны специалисту в данной области. В настоящем примере измерение с помощью Biotec можно проводить как описано в разделе "антитела к CD3" выше.

Антитело к CD123 по настоящему изобретению также может характеризоваться кажущейся константой аффинности (кажущаяся KD), которую, например, определяют с помощью анализа FACS на клетках, экспрессирующих CD123, таких как клетки НЕК293, трансфицированные с помощью CD123, с применением неочищенного антитела к CD123 в супернатанте гибридомы, которая составляет ≤ 20 нМ, например, ≤ 15 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ или ≤ 1 нМ. Как правило, кажущаяся KD находится в пределах диапазона 0,1-20 нМ, в частности, 0,1-10 нМ, например 0,1-5 нМ.

Выравнивания последовательностей областей VH и VL антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3". Сравнение последовательностей CDR-H и CDR-L в большинстве случаев указывает на то, что антитела к CD123, "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7" и "9F6-G3", с одной стороны, и антитела к CD123, "6C10-C4", "9B8-G6", "9D7-C8", с другой стороны, являются близкородственными с точки зрения структуры, причем указанные антитела, вероятно, связываются с одним и тем же эпитопом. Выравнивание антител к CD123, называемых "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7" и "9F6-G3", и антител к CD123, называемых "6C10-C4", "9B8-G6", "9D7-C8", показано на фиг. 3 и 4 соответственно. При сравнении последовательностей CDR-H и CDR-L дополнительно идентифицировали положения CDR, которые были строго консервативными у этих двух групп антител и которые, таким образом, предположительно важны с точки зрения специфичности, тогда как остальные положения могли содержать замену.

Соответственно, антитело согласно настоящему изобретению содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H, состоящую из последовательности X_1 YTFTDX₂I (SEQ ID NO: 336), где X_1 представляет собой G или A, а X_2 представляет собой H, Y или N, или любая их комбинация; и

CDR2-H, состоящую из последовательности INPYSX₁GX₂ (SEQ ID NO: 337), где X_1 представляет собой G или D, а X_2 представляет собой T или A, или любая их комбинация; и

CDR3-H, состоящую из последовательности ALNYGSYYAMDA (SEQ ID NO: 201), и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L, состоящую из последовательности X_1 DIX₂X₃N (SEQ ID NO: 338), где X_1 представляет собой E или K, X_2 представляет собой F, H или Y, а X_3 представляет собой N или S, или любая их комбинация; и

CDR2-L, состоящую из последовательности "DAN" или "DAS"; и

CDR3-L, состоящую из последовательности X_1 QYNX₂YPYT (SEQ ID NO: 339), где X_1 представляет собой H или Q, а X_2 представляет собой I, K или N, или любая их комбинация; или

б) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H, состоящий из последовательности GFSLTSYX₁ (SEQ ID NO: 340), где X_1 представляет собой H или S; и

CDR2-H, состоящий из последовательности MWX₁DGDT (SEQ ID NO: 341), где X_1 представляет собой S или N; и

CDR3-H, состоящий из последовательности ARGX₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉FX₁₀Y (SEQ ID NO: 342), где X_1 представляет собой D, Y или H, X_2 представляет собой Y или R, X_3 представляет собой S или T, X_4 представляет собой S или P, X_5 представляет собой Y или отсутствие аминокислоты, X_6 представляет собой L, I или отсутствие аминокислоты, X_7 представляет собой Y или отсутствие аминокислоты, X_8 представляет собой L или отсутствие аминокислоты, X_9 представляет собой W или отсутствие аминокислоты, X_{10} представляет собой A или D, или любая их комбинация, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L, состоящую из последовательности QSFLSSGD X_1 X₂NY (SEQ ID NO: 343), где X_1 представляет собой E или G, а X_2 представляет собой R или K, или любая их комбинация; и

CDR2-L, состоящую из последовательности "WAS"; и

CDR3-L, состоящую из последовательности QQYYDTPLT (SEQ ID NO: 253).

Согласно варианту осуществления антитело к CD123 согласно настоящему изобретению содержит последовательности CDR из тяжелой и/или легкой цепей одного из 13 антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8" и "9F6-G3", перечисленных выше.

Следовательно, настоящее изобретение относится к антителу к CD123, которое содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 227 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 227 одной аминокислотной заменой; CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 228, или SEQ ID NO: 353, или SEQ ID NO: 279, или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 228, или SEQ ID NO: 353, или SEQ ID NO: 279 одной или несколькими аминокислотными заменами; CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 229 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 229 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO:

стью, отличающейся от SEQ ID NO: 253 одной аминокислотной заменой; или

m) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 273 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 273 одной аминокислотной заменой; CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 274 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 274 одной или несколькими аминокислотными заменами; CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 201 одной аминокислотной заменой; и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 276 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 276 одной аминокислотной заменой;

CDR2-L с последовательностью "DAS" или последовательностью, отличающейся от "DAS" одной аминокислотной заменой, и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 258 или последовательностью, отличающейся от SEQ ID NO: 258 одной аминокислотной заменой.

Одну или несколько отдельных аминокислот можно изменить путем введения замены, в частности, консервативной замены, в одну или несколько вышеуказанных последовательностей CDR. Такое изменение может подразумевать, например, удаление участка гликозилирования или участка дезамидирования в сочетании с гуманизацией антитела.

Исходя из выравнивания последовательностей областей VH и VL из антител к CD123, "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7", "9F6-G3", были идентифицированы различные аминокислотные замены. Следовательно, в одном варианте осуществления аминокислота может быть замещенной:

в CDR1-H, в одном или нескольких из положений 1 и 7, например, в положении 7 из CDR1-H с последовательностью GYTFTDHI (SEQ ID NO:199) или GYTFTDYI (SEQ ID NO: 273), например, в положении 1 и 5 из CDR1-H с последовательностью AYTFTDNI (SEQ ID NO: 255); и/или

в CDR2-H, в одном или нескольких из положений 6 и 8, например, в положении 6 и/или 8 из CDR2-H с последовательностью INPYSGGT (SEQ ID NO: 200), или INPYSDGT (SEQ ID NO: 274), или INPYSGGA (SEQ ID NO: 260); и/или

в CDR1-L, в одном или нескольких из положений 1, 4 и 5, например в положении 1 или 1, 4 и 5 из CDR1-L с последовательностью KDIYSN (SEQ ID NO: 262) или EDIFNN (SEQ ID NO: 257); и/или

в CDR2-L, положении 3 из последовательности "DAN" или "DAS"; и/или

в CDR3-L, в одном или нескольких из положений 1 и 5, например, в положении 1 и/или 5 из CDR3-L с последовательностью HQYNIYPYT (SEQ ID NO: 258), или QQYNKYPYT (SEQ ID NO: 204), или HQYNNYPYT (SEQ ID NO: 263).

В дополнительном варианте осуществления аминокислота является замещенной:

в CDR1-H, в положении 8, например, в положении 8 из CDR1-H с последовательностью GFSLTSYH (SEQ ID NO: 265) или GFSLTSYS (SEQ ID NO: 248); и/или

в CDR2-H, в положении 3, например, в положении 3 из CDR2-H с последовательностью MWSDGD (SEQ ID NO: 265) или MWNDGD (SEQ ID NO: 248); и/или

в CDR3-H, в положениях 4 и 9, например, в положениях 4 и 9 из CDR3-H с последовательностью ARGDYSSYIYLFAY (SEQ ID NO: 267) или ARGYYSSYLYLWFAY (SEQ ID NO: 269); и/или

в CDR1-L, в одном или нескольких из положений 9 и 10, например в положении 9 и 10 из CDR1-L с последовательностью QSFLSSGDERNY (SEQ ID NO: 252) или QSFLSSGDGKNY (SEQ ID NO: 271).

Согласно варианту осуществления антитело содержит:

a) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 227, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO:353, SEQ ID NO:279, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 229, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 231, CDR2-L с последовательностью "RDD" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 232; или

n) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 199, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 200, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 203, CDR2-L с последовательностью "DAN" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 204; или

o) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 206, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 207, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 208, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 210, CDR2-L с последовательностью "ETS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 211; или

p) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 213, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 214, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 215, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 217, CDR2-L с последовательностью "NTN" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 218; или

q) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID

NO: 220, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 221, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 222, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 224, CDR2-L с последовательностью "RVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 225; или

г) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 234, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 235, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 236, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 238, CDR2-L с последовательностью "GAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 239; или

с) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 241, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 242, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 243, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 245, CDR2-L с последовательностью "YAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 246; или

т) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 248, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 249, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 250, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 252, CDR2-L с последовательностью "WAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 253; или

и) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 255, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 200, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 257, CDR2-L с последовательностью "DAN" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 258; или

в) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 199, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 260, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 262, CDR2-L с последовательностью "DAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 263; или

и) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 265, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 266, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 267, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 252, CDR2-L с последовательностью "WAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 253; или

х) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 265, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 266, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 269, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 271, CDR2-L с последовательностью "WAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 253; или

у) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 273, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 274, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 201, и

вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 276, CDR2-L с последовательностью "DAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 258.

Антитело к CD123 согласно настоящему изобретению, в частности, представляет собой традиционное антитело, в частности, традиционное моноклональное антитело или фрагмент антитела, биспецифическое или полиспецифическое антитело.

Антитело к CD123 согласно настоящему изобретению, в частности, содержит или состоит из IgG или его фрагмента.

В настоящем изобретении также предусмотрено антитело к CD123, определяемое выше, дополнительно содержащее по меньшей мере вариабельный домен тяжелой цепи и/или вариабельный домен легкой цепи одного из антител к CD123, названия которых перечислены выше.

Таким образом, настоящее изобретение относится, в частности, к антителу к CD123, которое содержит:

а) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 226, или SEQ ID NO: 277, или SEQ ID NO: 278, или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 230 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

б) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 198 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 202 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, или

с) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 205 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 209 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

д) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 212 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 216 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

е) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 219 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 223 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

ф) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 233 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 237 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

г) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 240 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 244 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

h) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 247 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 251 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

i) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 254 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 256 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

j) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 259 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 261 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

k) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 264 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 251 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

l) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 268 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 270 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

m) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 272 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 275 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей.

Например, последовательность вариабельного домена тяжелой или легкой цепи может отличаться от эталонной последовательности под SEQ ID NO: 226, 277, 278, 230, 198, 202, 205, 209, 212, 216, 219, 223, 233, 237, 240, 244, 247, 251, 254, 256, 259, 261, 264, 251, 268, 270, 272 или 275, при необходимости, одной или несколькими аминокислотными заменами, в частности, одной или несколькими консервативными аминокислотными заменами и/или заменами на канонические остатки. В частности, последовательность вариабельного домена тяжелой или легкой цепи может отличаться от эталонной последовательности под SEQ ID NO: 226, 277, 278, 230, 198, 202, 205, 209, 212, 216, 219, 223, 233, 237, 240, 244, 247, 251, 254, 256, 259, 261, 264, 251, 268, 270, 272 или 275 только консервативной аминокислотной заменой(ами).

Изменения последовательности по сравнению с последовательностью под SEQ ID NO: 226, 277, 278, 230, 198, 202, 205, 209, 212, 216, 219, 223, 233, 237, 240, 244, 247, 251, 254, 256, 259, 261, 264, 251, 268, 270, 272 или 275, в частности, будут присутствовать в основном в одной или нескольких каркасных областях, FR1-L, FR2-L, FR3-L, FR4-L и/или FR1-H, FR2-H, FR3-H, FR4-H.

В одном варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению и его фрагмент представляют собой антитело крысы и фрагмент антитела крысы соответственно.

Антитело к CD123 по настоящему изобретению также может быть химерным антителом и, в частности, антителом крысы/человека, например, антителом, содержащим вариабельные домены тяжелой и легкой цепей крысы и CH-домен и CL-домен из антитела человека. Полипептид может представлять со-

бой фрагмент такого антитела. Антитело к CD123 также может быть гуманизированным антителом или фрагментом гуманизированного антитела, полученными с помощью привития CDR или с помощью 4D-способа (US 20110027266).

Соответственно, в одном варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное антитело, содержащее:

а) вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 280, SEQ ID NO: 281, SEQ ID NO: 282, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 301 и SEQ ID NO: 302; и

б) вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 292, SEQ ID NO: 293, SEQ ID NO: 294, SEQ ID NO: 295, SEQ ID NO: 296, SEQ ID NO: 297, SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 299, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 303, SEQ ID NO: 304 и SEQ ID NO: 305.

В одном варианте осуществления антитело к CD123 согласно настоящему изобретению содержит последовательности трех CDR или вариабельный домен тяжелой цепи, или последовательности шести CDR или вариабельные домены тяжелой и легкой цепей одного из антител к CD123, названия которых перечислены выше.

Настоящее изобретение дополнительно относится к фрагменту гуманизированного антитела к CD123, определяемого выше. В одном варианте осуществления гуманизированное антитело к CD123, описанное выше, представляет собой химерное антитело.

Антитело к CD123 согласно настоящему изобретению также может представлять собой однодоменное антитело или его фрагмент. В частности, фрагмент однодоменного антитела может состоять из вариабельной области тяжелой цепи (VHH), которая содержит CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H одного из антител, описанных выше. Антитело к CD123 также может представлять собой антитело, состоящее только из тяжелой цепи, т.е. антитело, не имеющее легкой цепи, которое может содержать или может не содержать CH1-домен.

Однодоменное антитело или его фрагмент также может содержать каркасные области из однодоменного антитела верблюдовых и необязательно константный домен из однодоменного антитела верблюдовых.

Антитело к CD123 согласно настоящему изобретению также может быть фрагментом антитела, в частности, фрагментом гуманизированного антитела, выбранным из группы, состоящей из Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, (dsFv)₂, scFv, sc(Fv)₂ и диател.

Антитело к CD123 также может быть биспецифическим или полиспецифическим антителом, образованным из по меньшей мере одного фрагмента антитела или по меньшей мере одного вариабельного домена антитела к CD123 по настоящему изобретению.

Полиспецифические антитела представляют собой поливалентные белковые комплексы, описываемые, например, в EP 2050764 A1 или US 2005/0003403 A1.

Биспецифические или полиспецифические антитела к CD123 согласно настоящему изобретению могут характеризоваться специфичностью в отношении (а) внеклеточного домена CD123 человека или человека и *Macaca fascicularis*, на который нацеливается одно из описанных выше антител к CD123, и (б) по меньшей мере одного другого антигена.

В конкретном варианте осуществления другой антиген представляет собой CD3 и, соответственно, полученное биспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело к CD3/CD123. Традиционные биспецифические антитела могут быть получены с помощью методик, которые известны специалисту в данной области.

Антитела и их фрагменты согласно настоящему изобретению можно применять в виде выделенных (например, очищенных) молекул или содержащихся в переносчике, таком как мембрана или липидная везикула (например, липосома).

В одном дополнительном варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению применяют для получения антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению, дополнительно определяемого в разделе "Антителоподобный связывающий белок".

Любая комбинация вышеупомянутых вариантов осуществления составляет часть настоящего изобретения.

Антителоподобные связывающие белки.

Авторы настоящего изобретения получили несколько антителоподобных связывающих белков, а именно антителоподобных связывающих белков, называемых "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3", "hz20G6×7G3-TL4" и "hz20G6×hz7G3", где термин "hz" обозначает гуманизированные антитела. Эти антителоподобные связывающие белки характеризуются конструкцией CODV, в частности конструкцией CODV-Fab или CODV-Ig.

В контексте настоящего изобретения "формат CODV" относится к кроссоверной конфигурации с двойной вариабельной областью (CODV) биспецифических антител или полиспецифических антител.

Формат CODV обеспечивает возможность взаимозаменяемости переменных доменов с сохранением укладки и наивысшей аффинности связывания.

Формат CODV был ранее описан в международной патентной заявке WO 2012/135345. Соответственно, в одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению находится в формате CODV, описываемом ранее в международной патентной заявке WO 2012/135345, которая включена в данный документ посредством ссылки.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителоподобному связывающему белку в формате CODV-Fab. Соответственно, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителоподобному связывающему белку, содержащему две полипептидные цепи, которые образуют два антигенсвязывающих участка, где первый полипептид имеет структуру, представленную формулой [I]

$$V_{D1}-L_1-V_{D2}-L_2-C_L \text{ [I]},$$

а второй полипептид имеет структуру, представленную формулой [II]

$$V_{D3}-L_3-V_{D4}-L_4-C_{H1} \text{ [II]},$$

где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;

и при этом первый и второй полипептиды образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей.

Добавление Fc-домена к антителоподобному связывающему белку в CODV-Fab дополнительно стабилизирует антителоподобный связывающий белок. Точнее говоря, добавление Fc-домена к полипептиду формулы (II) антителоподобного связывающего белка в CODV-Fab повышает время полужизни антителоподобного связывающего белка и, таким образом, улучшает фармакокинетический профиль антителоподобного связывающего белка. Добавление одной Fc-области к CODV-Fab приводит к димеризации полипептидов, содержащих Fc-домен, и полученный антителоподобный связывающий белок представляет собой антителоподобный связывающий белок в формате CODV-Ig. Следовательно, настоящее изобретение дополнительно относится к антителоподобному связывающему белку в формате CODV-Ig.

Следовательно, настоящее изобретение дополнительно относится к антителоподобному связывающему белку, содержащему четыре полипептидные цепи, которые образуют четыре антигенсвязывающих участка, где две полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулой [I]

$$V_{D1}-L_1-V_{D2}-L_2-C_L \text{ [I]},$$

а две полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулой [III]

$$V_{D3}-L_3-V_{D4}-L_4-C_{H1}-F_C \text{ [III]},$$

где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_C представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;

и при этом полипептиды формулы I и полипептиды формулы III образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и

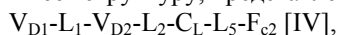
при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей.

домены тяжелых цепей.

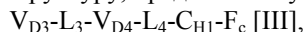
В указанном формате CODV-Ig две полипептидные цепи, имеющие структуру, представленную формулой [III], образуют димер с помощью своих F_c -доменов.

В дополнительном варианте осуществления первый F_c -домен добавляют к полипептиду формулы [II] антителоподобного связывающего белка CODV-Fab, а второй F_c -домен (называемый F_{c2}) добавляют к полипептиду формулы [I] антителоподобного связывающего белка CODV-Fab. Кроме того, в том же варианте осуществления линкер L_5 присутствует между C_L и F_{c2} -доменом полипептидных цепей формулы [I], что приводит к полипептидным цепям формулы [IV].

Соответственно, настоящее изобретение дополнительно относится к антителоподобному связывающему белку, содержащему две полипептидные цепи, которые образуют два антигенсвязывающих участка, где одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [IV]



и одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [III]



где V_{D1} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_c представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

F_{c2} представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 , L_4 и L_5 представляют собой аминокислотные линкеры;

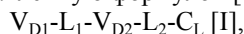
и при этом полипептид формулы [IV] и полипептид формулы [III] образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и

при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или вариабельные домены легких цепей, или вариабельные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой вариабельные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой вариабельные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой вариабельные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой вариабельные домены тяжелых цепей.

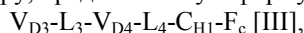
Этот формат CODV, в котором полипептидные цепи, представленные формулами [III] и [IV], образуют димер с помощью своих соответствующих областей F_{c2} и F_c , называется в данном документе CODV-Fab-TL.

В другом варианте осуществления CODV-Fab первый F_c -домен добавляют к полипептидной цепи, представленной формулой [II] (что приводит к формуле [III]), а антителоподобный связывающий белок содержит третью полипептидную цепь, содержащую или состоящую из второго F_c -домена (называемого F_{c3}).

Настоящее изобретение дополнительно относится к антителоподобному связывающему белку, который содержит три полипептидные цепи, которые образуют два антигенсвязывающих участка, где первый полипептид имеет структуру, представленную формулой [I]



второй полипептид имеет структуру, представленную формулой [III]



третий полипептид F_{c3} (также называемый "Fc-stump") представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

где V_{D1} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_c представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;

и при этом полипептид формулы [I] и полипептид формулы [III] образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и

при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей;

и при этом полипептид формулы [III] образует гетеродимер с третьим полипептидом при помощи своего F_c -домена.

Соответственно, в указанном варианте осуществления так называемый "Fc-stump" (F_{c3}) образует гетеродимер с F_c -областью полипептида согласно формуле III. Этот формат CODV называется в данном документе CODV-Fab-OL. Эта конструкция предотвращает образование агрегатов CODV-Fab.

В одном варианте осуществления CODV-Fab-OL оба F_c и F_{c3} представляют собой варианты иммуноглобулинов, в которых домен CH3 был модифицирован: каждый из F_c и F_{c3} был сконструирован генетически в месте контакта CH3-CH3 для стимуляции образования гетерополимера согласно так называемой технологии "выступ-во-впадину", которая была описана, в частности, в патентах US5731168 и US8216805 и которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, в варианте осуществления CH3-домен одного из F_c и F_{c3} содержит мутации Y349C, T366S, L368A и Y407V, в то же время домен CH3 другого из F_c и F_{c3} содержит мутации S354C и T366W (положение аминокислот указывается относительно последовательности IgG1).

Примеры подходящих пар F_c и F_{c3} включают пару SEQ ID NO: 396 (F_c) и SEQ ID NO: 397 (F_{c3}) и пару SEQ ID NO: 394 (F_c) и SEQ ID NO: 398 (F_{c3}).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый иммуноглобулин или второй иммуноглобулин представляют собой одно антитело к CD3, как определено в разделе "Антитела к CD3" выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения первый иммуноглобулин или второй иммуноглобулин представляют собой одно антитело к CD123, как определено в разделе "Антитела к CD123" выше.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения оба V_{D1} и V_{D2} из полипептида формулы I или формулы [IV] представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} из полипептида II или III представляют собой переменные домены тяжелых цепей или легких цепей. Данная взаимозаменяемость также называется "обмениваемость" и, таким образом, определяет кроссоверную конфигурацию с двойной переменной областью (CODV) антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению.

Согласно вышеприведенному определению V_{D1} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина, а V_{D2} и V_{D3} представляют собой переменные домены тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина, следовательно, V_{D1} и V_{D4} рассматриваются как родственные домены, так же как V_{D2} и V_{D3} .

Соответственно, термином "кроссовер" называют поменянное местами выравнивание V_{D1} или V_{D2} из полипептида формулы [I] или формулы [IV] относительно его родственного переменной домена V_{D4} или V_{D3} из полипептида формулы [II] или формулы [III].

В одном конкретном варианте осуществления V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легкой цепи, а V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелой цепи.

Антителоподобные связывающие белки по настоящему изобретению можно получить с применением доменов или последовательностей, полученных или происходящих от любого антитела человека или животного, отличного от человека, в том числе, например, антитела человека, антитела крысы или гуманизированного антитела.

В одном варианте осуществления иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин IgG.

Соответственно, в одном варианте осуществления C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина IgG. В дополнительном варианте осуществления C_{H1} представляет собой константный домен тяжелой цепи C_{H1} иммуноглобулина IgG.

В одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению может быть получен с применением доменов или последовательностей из антитела к CD3 и антитела к CD123, описанных в данном документе.

Термином "линкер", как используется в данном документе, называют один или несколько аминокислотных остатков, вставленных между доменами иммуноглобулина для обеспечения подвижности, достаточной для того, чтобы домены легкой и тяжелой цепей сворачивались в иммуноглобулины с кроссоверной областью из двойных переменных областей. В некоторых вариантах осуществления линкер состоит из 0 аминокислот, что означает, что линкер отсутствует. Линкер вставлен в переходную зону между переменными доменами или между переменным и константным доменами, соответственно, на уровне последовательности. Переходную зону между доменами можно идентифицировать, поскольку приблизительный размер доменов иммуноглобулина хорошо известен. Точное местоположение переход-

ной зоны доменов можно определить путем определения положения пептидных отрезков, которые не образуют элементов с вторичной структурой, такой как бета-слои или альфа-спирали, как показано с помощью экспериментальных данных или как можно предположить с помощью методик моделирования или предсказания вторичной структуры. Линкеры, описываемые в контексте настоящего изобретения, представляют собой линкеры L_1 , L_2 , L_3 , L_4 и L_5 . L_1 расположен между N-концом V_{D1} -домена и V_{D2} -доменом; L_2 расположен между V_{D2} -доменом и C-концом C_L -домена. Линкеры L_3 и L_4 расположены в полипептиде, определяемом согласно формуле II или III антителоподобных белков. Более точно, L_3 расположен между N-концом V_{D3} -домена и V_{D4} -доменом, а L_4 расположен между V_{D4} -доменом и C-концом C_{H1} -Fc-домена. L_5 расположен между C_L и N-концом Fc_2 . Линкеры L_1 , L_2 , L_3 , L_4 и L_5 являются независимыми, но в некоторых вариантах осуществления они имеют одинаковую последовательность и/или длину.

В некоторых антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_3 по меньшей мере в два раза превышает длину L_1 . В других антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_4 по меньшей мере в два раза превышает длину L_2 . В некоторых антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_1 по меньшей мере в два раза превышает длину L_3 . В других антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_2 по меньшей мере в два раза превышает длину L_4 .

В одном варианте осуществления линкеры L_1 , L_2 , L_3 и L_4 содержат 0-20 аминокислот. В одном варианте осуществления L_5 содержит 0-10 аминокислот.

В некоторых антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_1 составляет 3-12 аминокислотных остатков, длина L_2 составляет 3-14 аминокислотных остатков, длина L_3 составляет 1-8 аминокислотных остатков, а длина L_4 составляет 1-3 аминокислотных остатка. В других антителоподобных связывающих белках длина L_1 составляет 5-10 аминокислотных остатков, длина L_2 составляет 5-8 аминокислотных остатков, длина L_3 составляет 1-5 аминокислотных остатков, а длина L_4 составляет 1-2 аминокислотных остатка. В предпочтительном антителоподобном связывающем белке длина L_1 составляет 7 аминокислотных остатков, длина L_2 составляет 5 аминокислотных остатков, длина L_3 составляет 1 аминокислотный остаток, а длина L_4 составляет 2 аминокислотных остатка.

В некоторых антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_1 составляет 1-3 аминокислотных остатка, длина L_2 составляет 1-4 аминокислотных остатка, длина L_3 составляет 2-15 аминокислотных остатков, а длина L_4 составляет 2-15 аминокислотных остатков. В других антителоподобных связывающих белках длина L_1 составляет 1-2 аминокислотных остатка, длина L_2 составляет 1-2 аминокислотных остатка, длина L_3 составляет 4-12 аминокислотных остатков, а длина L_4 составляет 2-12 аминокислотных остатков. В предпочтительном антителоподобном связывающем белке длина L_1 составляет 1 аминокислотный остаток, длина L_2 составляет 2 аминокислотных остатка, длина L_3 составляет 7 аминокислотных остатков, а длина L_4 составляет 5 аминокислотных остатков.

В некоторых антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению длина L_1 , L_3 или L_4 может быть равной нулю. Однако в антителоподобных связывающих белках, в которых длина L_3 или L_4 равна нулю, соответствующая длина переходного линкера между вариабельной областью и константной областью или между двумя вариабельными доменами в другой цепи не может быть равна нулю. В некоторых вариантах осуществления длина L_1 равна нулю, а L_3 составляет 2 или более аминокислотных остатков, длина L_3 равна нулю, а длина L_1 равна 1 или более аминокислотным остаткам, или длина L_4 равна 0, а L_2 составляет 3 или более аминокислотных остатков.

В некоторых антителоподобных связывающих белках по настоящему изобретению по меньшей мере один из линкеров, выбранных из группы, состоящей из L_2 , L_3 и L_4 , содержит по меньшей мере один цистеиновый остаток.

Примеры подходящих линкеров включают одиночный глициновый, треониновый или сериновый остаток; дипептид, такой как диглициновый пептид, гистидиново-треониновый пептид или глициново-сериновый дипептид; трипептид из трех остатков глицина, трипептид Thr-His-Thr, трипептид Gly-Gly-Ser; пептид из четырех глициновых остатков; пептид из пяти глициновых остатков; пептид из шести глициновых остатков; пептид из семи глициновых остатков; пептид из восьми глициновых остатков. Можно использовать другие комбинации аминокислотных остатков, такие как пептид Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 354), пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 344), пептид Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 355), пептид Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 356), пептид Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 357), пептид Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 358) и пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 345). Другие подходящие линкеры включают одиночный Ser и Val остаток; дипептид Arg-Thr, Gin-Pro, Ser-Ser, Thr-Lys, и Ser-Leu; Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 359); Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 360); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 361); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 362); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 363); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro (SEQ ID NO: 364); Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 365); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Ser (SEQ ID NO: 366); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 367); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 368); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 369); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-

Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 370); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 371); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 372); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 373); Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 374); Thr-Val-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 346), Gln-Pro-Lys-Ala-Ala (SEQ ID NO: 347), Gln-Arg-Ile-Glu-Gly (SEQ ID NO: 348); Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 349), Arg-Thr-Val-Ala-Ala-Pro-Ser (SEQ ID NO: 350), Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 307), Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 309), His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys (SEQ ID NO: 351), и Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 389). Примеры, перечисленные выше, не предусмотрены для какого-либо ограничения объема настоящего изобретения, и было показано, что линкеры, содержащие случайным образом выбранные аминокислоты, выбранные из группы, состоящей из валина, лейцина, изолейцина, серина, треонина, лизина, аргинина, гистидина, аспартата, глутамата, аспарагина, глутамина, глицина и пролина, подходят для антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению.

Состав и последовательность аминокислотных остатков в линкере может меняться в зависимости от типа элемента вторичной структуры, который необходимо достигнуть при помощи линкера. Например, глицин, серин и аланин являются самыми подходящими для линкеров, характеризующихся максимальной гибкостью. Некоторые комбинации глицина, пролина, треонина и серина применимы, если необходим более жесткий и удлиненный линкер. При необходимости любой аминокислотный остаток может рассматриваться как линкер в комбинации с другими аминокислотными остатками для конструирования более длинных пептидных линкеров, в зависимости от требуемых свойств.

В одном варианте осуществления линкер L_1 имеет последовательность Gly-Gln-Pro-Lys-Ala-Ala-Pro (SEQ ID NO: 307), линкер L_2 имеет последовательность Thr-Lys-Gly-Pro-Ser (SEQ ID NO: 309), линкер L_3 имеет последовательность "S", а линкер L_4 имеет последовательность "RT".

В дополнительном варианте осуществления последовательности линкеров L_1 , L_2 , L_3 и L_4 выбраны из группы, состоящей из треонина; дипептида, такого как гистидиново-терониновый пептид; трипептида Thr-His-Thr, Lys-Thr-His-Thr (SEQ ID NO: 359); Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 360); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser (SEQ ID NO: 361); Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 362); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro (SEQ ID NO: 363); Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro (SEQ ID NO: 364); Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 365); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser (SEQ ID NO: 366); Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 367); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro (SEQ ID NO: 368); Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly (SEQ ID NO: 369); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 370); Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 371); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly (SEQ ID NO: 372); Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 373) и Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 374). В одном варианте осуществления последовательность линкера L_5 выбрана из группы, состоящей из одиночного серинового остатка, дипептида, такого как глициново-сериновый дипептид; трипептида Gly-Gly-Ser, пептида Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 354), пептида Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 344), пептида Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 355), пептида Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 356), пептида Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 357), пептида Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 358), пептида Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 345) и пептида Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO: 389).

Термин "Fc-домен", как используется в данном документе, охватывает нативный Fc, а также варианты Fc и последовательности, определяемые выше. Что касается вариантов Fc и нативных молекул Fc, термин "Fc-домен" включает молекулы в мономерной или мультимерной форме, вне зависимости от того, образованы ли они расщеплением целого антитела или получены другими способами.

Термином "нативный Fc", как используется в данном документе, называют молекулу, содержащую последовательность, не являющуюся антигенсвязывающим фрагментом, которая получена в результате расщепления антитела или получена другими способами, вне зависимости от того, находится ли она в мономерной или мультимерной форме, и она может содержать шарнирную область. Исходный иммуноглобулиновый источник нативного Fc, в частности, происходит от человека и может представлять собой любой из иммуноглобулинов, хотя предпочтительными являются IgG1 и IgG2. Нативные молекулы Fc составлены из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т.е. дисульфидных связей) и нековалентной связи. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами нативных молекул Fc варьирует от 1 до 4, в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgGA2). Одним примером нативного Fc является димер с дисульфидной связью, образуемый в результате расщепления IgG папаином. Термин "нативный Fc", как используется в данном документе, является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

Термином "вариант Fc", как используется в данном документе, называют молекулу или последовательность, которая модифицирована по сравнению с нативным Fc, но все еще содержит участок связыва-

ния для рецептора реутилизации, FcRn (неонатального Fc-рецептора). Иллюстративные варианты Fc и их взаимодействие с рецептором реутилизации известны из уровня техники. Таким образом, термин "вариант Fc" может предусматривать молекулу или последовательность, которая является гуманизированной на основе нативного Fc, который получен из молекулы, не относящейся к человеку. Кроме того, нативный Fc содержит области, которые можно удалить, поскольку они обеспечивают структурные признаки или биологическую активность, которые не требуются для антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению. Таким образом, термин "вариант Fc" предусматривает молекулу или последовательность, в которой отсутствует один или несколько участков или остатков нативного Fc или в которой были модифицированы один или несколько участков или остатков Fc, воздействующих на или вовлеченных в: (1) образование дисульфидной связи, (2) несовместимость с выбранной клеткой-хозяином, (3) N-концевую гетерогенность при экспрессии в выбранной клетке-хозяине, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с комплементом, (6) связывание с Fc-рецептором, иным чем рецептор реутилизации, или (7) антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC).

В некоторых вариантах осуществления, когда антителоподобный связывающий белок содержит два Fc-домена, т.е. у CODV-Ig (Fc и Fc₂), CODV-Fab-TL (два Fc-домена) и CODV-Fab-OL (Fc и Fc₃), два Fc-домена принадлежат к одному изотипу или подклассу изотипа иммуноглобулинов. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления оба Fc и Fc₂ из CODV-Ig, или оба Fc-домена из CODV-Fab-TL, или оба Fc и Fc₃ из CODV-Fab-OL принадлежат к подклассу IgG1, или подклассу IgG2, или подклассу IgG3, или подклассу IgG4.

Все антителоподобные связывающие белки, описываемые в данном документе, не обладают эффекторной функцией. Это означает, что когда антителоподобный связывающий белок содержит один или несколько Fc-доменов (т.е. Fc в формуле [III], Fc₂ в формуле [IV] и/или Fc₃), принадлежащих к подклассу IgG1, то указанный один или несколько Fc-доменов с остовом IgG1 содержат двойную мутацию L234A и L235A (называемую "мутация LALA"), которая нарушает эффекторную функцию Fc. Fc с двойной мутацией L234A и L235A не связывается FcγR или C1q, и обе ADCC и CDC функции Fc-домена подкласса IgG1 нарушены (Hezareh, M. et al., J Virol. 2001 Dec; 75(24): 12161-12168).

В одном примере Fc-область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 330, SEQ ID NO: 394 или SEQ ID NO: 396. В одном варианте осуществления Fc₂-область содержит две аминокислотные замены в пределах CH3-домена, H435R и Y436F, как описано в Jendeborg, L. et al. (1997, J. Immunological Meth. 201: 25-34). Соответственно, в одном варианте осуществления Fc₂-область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 327. В другом варианте осуществления Fc₂-область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 392.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "7G3×20G6", содержит один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGFS
DRFGSGSGSGTDFTLKISRVD PDDLGVYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIK GOPKAAPDFVMTQSPS
SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
GTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKEIK TKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 306, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 9, L₁ с последовательностью под SEQ ID NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L₂ с последовательностью под SEQ ID NO: 309 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDII PSNGATFYNQKF
KGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTSAS SEVQLVET
GGSLVQPGKSLKLT CATSGFTFTKAWMHVWRQSPEKQLEWVAQIKDKSNSYATYYAESVKGRFT
ISRDDSKSTIYLMNSLKEEDTAIYYCRGVYYALSPFDYWGQGVMTVSS RTASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 311, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L₃ с аминокислотной последовательностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 5, L₄ с аминокислотной последовательностью "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "7G3×4E7", содержит один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DVVMQTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLHNNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIYKVSNRFSGIS
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGPGTKLELKGOPKAAPDFVMTQSPS
 SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
 GTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKEIKTKGPSRTVAAPSVFI FPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 314, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчерки-
 ты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 21, L_1 с последовательностью под SEQ ID
 NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 309
 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGATFYNQKF
 KGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSASEVQVVET
 GGSILVQPGKSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNNYATYYAESLKGRT
 ISRDDPKRSIYLMNSLREEDTAIYYCRYVHYGIGYAMDAGQGTSTVTVSSRTASTKGPSVFPL
 APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS
 LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 315, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчерки-
 ты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L_3 с аминокислотной последователь-
 ностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 18, L_4 с аминокислотной последовательностью
 "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "7G3×4B4", содержит:

один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DVVMQTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQRPQSPQVLIYKVSNRFSGIS
 DRFTGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKLEIKGOPKAAPDFVMTQSPS
 SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
 GTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKEIKTKGPSRTVAAPSVFI FPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 316, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчерки-
 ты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 16, L_1 с последовательностью под SEQ ID
 NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 309
 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGATFYNQKF
 KGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTLVTVSASEVQLVET
 GGRLVQPGKSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKARSNNYATYYAESVKGRFT
 ISRDDSKSTIYLMNSLKEEDTAIYYCRGTYASKPFYWGQGMVTVSSRTASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 317, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчерки-
 ты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L_3 с аминокислотной последователь-
 ностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 12, L_4 с аминокислотной последовательностью
 "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "7G3×18F5", содержит

один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DVLMQTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHTNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRSLGIS
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLELKGOPKAAPDFVMTQSPS
 SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS
 GTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKEIKTKGPSRTVAAPSVFI FPPSDEQLK
 SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHK
 VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 318, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчерки-
 ты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 26, L_1 с последовательностью под SEQ ID

NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L₂ с последовательностью под SEQ ID NO: 309 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIIPNGATFYNQKF
KGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSASEVQVET
GGSLVQPGKSLKLTCAATSGFTFTNAWMHVVRRSPEKQLEWVAQIKDKSNYATYYAESVKGRFT
ISRDDSKSSIYLMNSLKEEDTAIYYCRYVHYRFAYALDAWGRGTSVSVSSRTASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSS
LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 319, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L₃ с аминокислотной последовательностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 23, L₄ с аминокислотной последовательностью "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "hz20G6×7G3", содержит

один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNGNQLYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKGQPKAAPDIVMTQTP
LSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLIYKVSNNRFSVGPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGGTQYPFTFGSGTKVEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 320, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L₁ с последовательностью под SEQ ID NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 143, L₂ с последовательностью под SEQ ID NO: 309 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

QVQLVESGGGVQPGKSLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKQLEWVAQIKDKSNYSYATYYAD
SVKGRFTISRDDSKNTLYLMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGQGLTVTVSSSEVQLQQ
SGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIIPNGATFYNQKFKGKATL
TVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSARTASTKGPSVFPLA
PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL
GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 321, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, L₃ с аминокислотной последовательностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L₄ с аминокислотной последовательностью "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "7G3×hz4B4", содержит

один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DVVMVTQTPVSLSVSGGRVSISSCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGKSPKVLIIYKVSNNRFSGV
SRFTGSGSGTDFTLKISSVQPDGLGVYYCGGTQYPFTFGSGTKLEIKGQPKAAPDFVMTQSPS
SLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNGNQLYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFTGSGS
GTDFTLTISVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 322, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 158, L₁ с последовательностью под SEQ ID NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L₂ с последовательностью под SEQ ID NO: 309 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDII PSNGATFYNQKF
 KGKATLTVDSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLTVTVSASGVQLVET
 GGGVLKPGQSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWVRQSPKGLEWVAQIKARSNNYATYYAESVKGRFT
 ISRDDSKSTIYLMNSLTPEDTAIYYCRGTYASKPFQDYWGQGMVTVSSRTASTKGPSVFPLA
 PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 323, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L_3 с аминокислотной последовательностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 171, L_4 с аминокислотной последовательностью "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "hz4B4×3E3", содержит один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

QFVLTPQNSVSTNLGSTVKLSCKRNTGNIGSNYVNWYQQHEGRSPTTMIYRDDKRPDGVDPDRFS
 GSIDRSSNSALLTINNVQTEDEADYFCQSYSSGINII FGGGTKLTVLGQPKAAPDVVMVTQTPVS
 LSVSVGGRRVSISSCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGKSPKVLIVKVSNRFSVSSRFTGSGSGT
 DFTLKISSVQPDGLGVYCGQGTQYPTFGSGTKLEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY
 ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 324, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 230, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 158, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 309 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле II с аминокислотной последовательностью

QVQLVETGGGLVKPGQSLKLTCAATSGFTFSNAWMHWVRQSPKGLEWVAQIKARSNNYATYYAE
 SVKGRFTISRDDSKSTIYLMNSLTPEDTAIYYCRGTYASKPFQDYWGQGMVTVSSSGVQLQE
 SGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTVDVHWVRQPPGKLEWMGRIGNGITDYNALKSRLLIS
 RDTSKSQVFLKMNVSQTEDTAMYFCAKTGSYFYAFDHWGQGLTVTVSSRTASTKGPSVFPLAPS
 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
 QTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 325, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 171, L_3 с аминокислотной последовательностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 226, L_4 с аминокислотной последовательностью "RT" и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", содержит

один полипептид согласно формуле [I], фактически состоящий из аминокислотной последовательности

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLLSNGNQKNYLTWYQQKPGQPPLIYWAST
 RESGVDPDRFSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKCGSGSSGSGG
 DIVMTQTPSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIVKVSNRFSVGP
 DRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDGVYCGQGTQYPTFGSGTKVEIKCGSGSSGSGGRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 388, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, и

один полипептид согласно формуле [II], фактически состоящий из аминокислотной последовательности

QVQLVESGGGVVQPGSRSLRSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSNSYA
 TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLMNSLRADTAIVYCRGVYALSPFDYWGQGLTVTVSSEV
QLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWAROMPGKLEWMGDIIPSSGATFYNQKFKG
QVTISADKSIISTYQLQWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGQGMVTVSSASTKGPSVF
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

(SEQ ID NO: 390), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383 (выделено курсивом и подчеркнуто), причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313.

В другом примере полипептиды согласно форме II из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3" и "hz20G6×hz7G3", дополнительно содержат последовательность EPKSCDKTHTHHHHHH (SEQ ID NO: 352), которая соответствует применяемым последовательности шарнира и His-метки, например, для очистки.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab "hz20G6×7G3-TL4" (также под названием CODV-Fab-TL4 "hz20G6×7G3"), содержит:

один полипептид согласно формуле [IV], фактически состоящий из аминокислотной последовательности

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNGNQNLYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGV
PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIKGQPKAAPDIVMTQTP
LSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKTKGPSRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECESKYGPCCPAPAFEGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCTVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKK
VSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNRFQKSLSLSLG

(SEQ ID NO: 326, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 308, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 307, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 143, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 309, C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310 и F_{c2} (подчеркнуто) с последовательностью под SEQ ID NO: 327, и

один полипептид согласно формуле [III] с аминокислотной последовательностью

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKSNSYATYYAD
SVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYYALSPFDYWGGTGLVTVSSSEVQLQQ
SGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNQATFYNQKFKGKATL
TVDRSSSTAYMHLNLSLTSEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGTGLVTVSARTASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAFEGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVS
NKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG

(SEQ ID NO: 328, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, L_3 с аминокислотной последовательностью "S", V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 312, L_4 с аминокислотной последовательностью "RT", а также C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 329 и F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 330.

В вышеупомянутом антителоподобном связывающем белке CODV-Fab-TL4 "hz20G6×7G3" F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 330 и F_{c2} с последовательностью под SEQ ID NO: 327 получены из остова IgG4. Указанный антителоподобный связывающий белок находится в формате CODV-Fab-TL и содержит или состоит из одного полипептида формулы III и одного полипептида формулы IV.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3", содержит один полипептид согласно формуле IV с аминокислотной последовательностью

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGSGSSGSGG
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGGSGSSGSGGRTVAAP
 SVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTQK
SLSLSPG

(SEQ ID NO: 391, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, L_5 , который содержит 0 аминокислот, и F_{c2} с последовательностью под SEQ ID NO: 392; и

один полипептид согласно формуле III с аминокислотной последовательностью

QVQLVESGGGVVQPGSRSLRLSCAASGFTFTKAWMHWRQAPGKQLEWVAQIKDKNSYA
 TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYALSPFDYWGQGTLVTVSSEV
 QLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMDIIPSSGATFYNQKFKG
 QVTISADKSIISTYLQWSSLKASDTAMYCARSHLLRASWFAYWGQGTMTVTVSSASTKGPSVF
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
 SLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHTQKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 393), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383 (выделено курсивом), причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313 и F_c (подчеркнуто) с последовательностью под SEQ ID NO: 394.

В антителоподобном связывающем белке CODV-Fab-TL1 "hz20G6×7G3" F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 394 и F_{c2} с последовательностью под SEQ ID NO: 392 получены из остова IgG1. Указанный антителоподобный связывающий белок находится в формате CODV-Fab-TL. Он содержит или состоит из одного полипептида формулы IV и одного полипептида формулы III.

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3", содержит один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGSGSSGSGG
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGGSGSSGSGGRTVAAP
 SVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLS
 TLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 388, при этом линкеры показаны символами с полужирным начертанием и подчеркнуты), содержащий V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310; и

один полипептид согласно формуле III с аминокислотной последовательностью

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKLEWVAQIKDKSNSYA
 TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYALSPFDYWGQGLTVTVSSEV
QLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIPSSGATFYNQKFKG
QVTISADKSIISTYLOWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGQGMVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNRFTOKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 395), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383 (выделено курсивом и подчеркнуто), причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313 и F_c (подчеркнуто) с последовательностью под SEQ ID NO: 396;

и где антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3", дополнительно содержит Fc-stump (F_{c3}) с аминокислотной последовательностью

GSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LVSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNYTOKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 397) и который образует гетеродимер с Fc-областью полипептида согласно формуле III.

Указанный антителоподобный связывающий белок находится в формате CODV-Fab-OL, т.е. он содержит или состоит из одного полипептида формулы I, одного полипептида формулы III и одного Fc-stump. Его последовательности F_c и F_{c3} были сконструированы согласно технологии "выступ-во-впадину" и дополнительно содержат двойную мутацию L234A и L235A.

Последовательность F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 396 была разработана так, чтобы содержать остатки RF в положениях 200-221 (символы с полужирным начертанием выше), вместо остатков HY, которые в ином случае присутствовали бы в этой Fc-области. Мутация $HY > RF$ (т.е. H435R и Y436F в CH3-домене, как описано в Jendeborg, L. et al. 1997, J. Immunological Meth., 201: 25-34) имеет преимущество для целей очистки, поскольку она нарушает связывание с белком А. В случае CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3" Fc-stump с последовательностью под SEQ ID NO: 397 содержит остатки HY в положениях 217-218 (символы с полужирным начертанием выше).

Антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab-OL1a "hz20G6×hz7G3", содержит один полипептид согласно формуле I с аминокислотной последовательностью

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCESSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKPLIYWAST
 RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPYTFGQGTKLEIKGGSGSSGSGG
 DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLVHNNTANTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRFSGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYCGQGTQYPFTFGSGTKVEIKGGSGSSGSGGRTVAAP
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRKAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLS
 TLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 388), который содержит V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310;

один полипептид согласно формуле III с аминокислотной последовательностью

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTKAWMHVVRQAPGKLEWVAQIKDKSNSYA
 TYYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCRGVYALSPFDYWGQGLTVTVSSEV
QLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTDYMKWARQMPGKGLEWMGDIIPSSGATFYNQKFKG
QVTISADKSIISTYLOWSSLKASDTAMYYCARSHLLRASWFAYWGQGMVTVSSASTKGPSVFP
 LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
 SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNYTOKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 399), содержащий V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383 (выделено курсивом и подчеркнуто), причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO:

313 и F_c (подчеркнуто) с последовательностью под SEQ ID NO: 400;

и где антителоподобный связывающий белок, называемый CODV-Fab-OL1a "hz20G6×hz7G3", дополнительно содержит Fc-stump (F_{c3}) с аминокислотной последовательностью

GSDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW

YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

QPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF

LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN**RF**TQKSLSLSPG

(SEQ ID NO: 398), который образует гетеродимер с Fc-областью полипептида согласно формуле III.

F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 400 содержит остатки H_Y в положениях 200-221 (символы с полужирным начертанием выше), в то время как F_c-stump с последовательностью под SEQ ID NO: 398 содержит остатки RF в положениях 217-218 (символы с полужирным начертанием выше).

Указанный антителоподобный связывающий белок находится в формате CODV-Fab-OL, т.е. он содержит или состоит из одного полипептида формулы I, одного полипептида формулы III и одного Fc-stump. Его последовательности F_c и F_{c3} были сконструированы согласно технологии "выступ-во-впадину" и содержат двойную мутацию L234A и L235A.

В одном варианте осуществления первый иммуноглобулин или второй иммуноглобулин представляют собой одно антитело к CD123, выбранное из антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", и "9F6-G3", или их гуманизированной формы, или антитела к CD123 "7G3", описанного в данном документе ниже, например, антител к CD123 "3E3-D3" или "7G3" или их гуманизированной формы.

В одном варианте осуществления первый иммуноглобулин или второй иммуноглобулин представляют собой одно антитело к CD3, выбранное из антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2", и "8H2", или их гуманизированной формы, например, антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10" и "hz20G6", например антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7".

Соответственно, V_{D1} и V_{D4} или V_{D2} и V_{D3} представляют собой переменные домены тяжелой или легкой цепи антитела к CD3, где указанное антитело к CD3 содержит:

а) переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 6, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 7, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 8, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 142, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

б) переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 14, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 15, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 184, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

в) переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 13, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 20, и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 22, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11; или

г) переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 24, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 19, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 27, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 28, и

где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой цепи, как определено выше, если V_{D4} представляет собой переменный домен легкой цепи, или V_{D1} представляет собой переменный домен легкой цепи, определяемый выше, если V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой цепи, или

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой цепи, как определено выше, если V_{D3} представляет собой переменный домен легкой цепи, или V_{D2} представляет собой переменный домен легкой цепи, определяемый выше, если V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой цепи.

В дополнительном варианте осуществления V_{D1} и V_{D4} или V_{D2} и V_{D3} представляют собой переменные домены тяжелой или легкой цепи антитела к CD3, где указанное антитело к CD3 представляет собой гуманизированное антитело и содержит:

а) переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 138 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 143 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

b) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 171 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 158 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

c) вариабельный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 176 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, и/или вариабельный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 164 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей; или

где V_{D1} представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, как определено выше, если V_{D4} представляет собой вариабельный домен легкой цепи, или V_{D1} представляет собой вариабельный домен легкой цепи, определяемый выше, если V_{D4} представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, или

V_{D2} представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи, как определено выше, если V_{D3} представляет собой вариабельный домен легкой цепи, или V_{D2} представляет собой вариабельный домен легкой цепи, определяемый выше, если V_{D3} представляет собой вариабельный домен тяжелой цепи.

В указанной последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 164, последовательности 6 CDR являются неизменными по сравнению с 6 CDR, присутствующими в эталонной последовательности под SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 164.

В варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению связывается с CD3 человека. В другом варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению дополнительно связывается с CD3 *Macaca fascicularis*. В частности, антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом CD3 человека или CD3 как человека, так и *Macaca fascicularis*. Более конкретно, антитело связывается с CD3ε. Более конкретно, антителоподобный связывающий белок связывается с внеклеточным доменом CD3ε человека или человека и *Macaca fascicularis*. Антителоподобный связывающий белок связывается с CD3ε, когда он присутствует в форме комплекса, такого как CD3ε/δ-комплекс, или когда он присутствует в качестве отдельного белка, не важно экспрессируется ли он в виде выделенной формы или присутствует в виде растворимого внеклеточного домена или полноразмерного заякоренного в мембране CD3ε, представленного, например, в Т-клетках. Антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению является специфическим в отношении поверхностного белка CD3 человека или белков CD3 как человека, так и *Macaca fascicularis*, в частности, в отношении CD3ε.

Антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению характеризуется соотношением аффинности к CD3 *Macaca fascicularis* и аффинности к CD3 человека $KD(\text{Macaca fascicularis})/KD(\text{человек})$, которое составляет ≤ 10 , в частности ≤ 6 , ≤ 5 , ≤ 4 , ≤ 3 , ≤ 2 , ≤ 1 или $\leq 0,5$. Таким образом, антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению можно применять в токсикологических исследованиях, проводимых на обезьянах, поскольку профиль токсичности, наблюдаемый на обезьянах, соответствует ожидаемым потенциальным неблагоприятным эффектам у человека.

Кроме того, антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению характеризуется аффинностью (KD) к CD3 человека или CD3 *Macaca fascicularis*, или обоим, которая составляет ≤ 50 нМ, ≤ 40 нМ или ≤ 30 нМ, например ≤ 20 нМ, например, аффинность составляет от 0,1 до 30 нМ, в частности, составляет от 0,4 до 20 нМ или составляет от 0,4 до 15 нМ.

В одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению характеризуется активацией Т-клеток, которая составляет менее 20%, менее 18%, менее 16%, менее 14%, менее 12%, менее 10% в отсутствие целевых клеток.

В одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению характеризуется активацией Т-клеток, которая превышает 55%, превышает 60%, превышает 62%, превышает 64%, превышает 66%, превышает 68%, превышает 70% в присутствии целевых клеток.

"Низкой активацией Т-клеток" в контексте антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению называют активацию Т-клеток, которая составляет менее 20%, менее 18%, менее 16%, менее 14%, менее 12%, менее 10%.

"Целевыми клетками" в данном документе называют клетки, которые экспрессируют второй антиген, в одном примере целевыми клетками в данном документе называют клетки, экспрессирующие CD123, такие как клетки THP-1.

"Высокой активацией Т-клеток" в данном документе называют активацию Т-клеток, которая превышает 50%, превышает 55%, превышает 60%, превышает 62%, превышает 64%, превышает 66%, превышает 68%, превышает 70%.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к антителоподобному связывающему белку, характеризующемуся биологической и иммунологической специфичностью в отношении по меньшей мере одного дополнительного целевого антигена.

Следовательно, в одном аспекте настоящего изобретения антителоподобный связывающий белок по

настоящему изобретению связывается дополнительно по меньшей мере с одним целевым антигеном. Соответственно, в одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению является биспецифическим и способен связывать два различных антигена-мишени или эпитопа.

Соответственно, в одном варианте осуществления первый иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин, направленный против по меньшей мере одной дополнительной мишени, если второй иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD123, как определено в разделе "Антитела к CD123" выше, или второй иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин, направленный против по меньшей мере одной дополнительной мишени, если первый иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD123, как определено в разделе "Антитела к CD123" выше.

В одном дополнительном варианте осуществления первый иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин, направленный против по меньшей мере одной дополнительной мишени, если второй иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD3, как определено в разделе "Антитела к CD3" выше, или второй иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин, направленный против по меньшей мере одной дополнительной мишени, если первый иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD3, как определено в разделе "Антитела к CD3" выше.

Антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению характеризуется эффектом вовлечения Т-клеток. Такой эффект вовлечения Т-клеток индуцирует цитотоксичность в отношении целевой клетки. В одном варианте осуществления целевая клетка представляет собой клетку, экспрессирующую CD123, такую как раковая клетка, экспрессирующая CD123, например, THP-1 или TF-1.

Соответственно, в одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению способен вовлекать первичные Т-клетки и приводить к лизису целевых клеток *in vitro*, при этом (EC_{50}) составляет ≤ 40 пМ, ≤ 35 пМ, например, ≤ 30 пМ.

"Цитотоксичностью" в данном документе называют качество соединения, такого как антителоподобный связывающий белок или антитело к CD123 по настоящему изобретению, быть токсичным в отношении клеток. Цитотоксичность можно индуцировать с помощью различных механизмов действия и, таким образом, ее можно разделять на клеточно-опосредованную цитотоксичность, апоптоз, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC).

"Антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью" или "ADCC" называют механизм опосредованной клетками иммунной защиты, при котором эффекторная клетка иммунной системы активно лизует целевую клетку, у которой антигены, расположенные на поверхности мембраны, были связаны специфическими антителами.

"Комплемент-зависимой цитотоксичностью" или "CDC", в контексте настоящего изобретения, называют лизис целевой клетки в присутствии белков системы комплемента.

"Клеточно-опосредованной цитотоксичностью" называют цитолиз целевой клетки эффекторными лимфоцитами, такими как цитотоксические Т-лимфоциты или естественные клетки-киллеры, и, таким образом, ее можно разделять на цитотоксичность, опосредованную Т-клетками, и цитотоксичность под действием NK-клеток.

В одном варианте осуществления цитотоксичностью в данном документе называют клеточно-опосредованную цитотоксичность, например цитотоксичность, опосредованную Т-клетками.

Кроме того, в одном варианте осуществления клеточно-опосредованной цитотоксичностью называют клеточно-опосредованную цитотоксичность под действием Т-клеток.

Соответственно, антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению индуцирует клеточно-опосредованную цитотоксичность в целевой клетке, которая опосредуется Т-клетками.

Способы измерения цитотоксичности известны специалисту в данной области и включают применение анализа высвобождения 51-хрома (Cr), окрашивание целевых клеток в отношении живых/погибших клеток, включая окрашивание йодидом пропидия, 7-AAD и другими красителями, которые известны специалисту в данной области, обнаружение литических молекул, высвобождаемых Т-клетками, в том числе гранзима и перфорины, с помощью проточной цитометрии или ELISA, обнаружение лактатдегидрогеназы (LDH), высвобождаемой в среду из поврежденных клеток, в качестве биомаркера клеточной цитотоксичности и цитолиза, обнаружение перехода CD107a на поверхность клетки, окрашивание с помощью аннексина V (кальций-зависимые фосфолипид-связывающие белки) апоптотических целевых клеток и, например, обнаружение активированной каспазы-3 (CASP3). Кроме того, специалист в данной области сможет отличить различные механизмы цитотоксичности на основании выбранного теста и на основании экспериментальной установки.

В одном примере клеточно-опосредованную цитотоксичность, например, можно измерять с применением CFSE для мечения целевых клеток и 7-AAD для мечения погибших клеток, как описано, например, в примере 3.2.

В дополнительном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок способен связываться с CD3 и по меньшей мере одним дополнительным антигеном-мишенью, например CD123.

В одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок способен подавлять

функционирование этого дополнительного антигена-мишени, например CD123.

В одном аспекте настоящего изобретения антителоподобный связывающий белок связывается с CD123 человека. В другом варианте осуществления антителоподобный связывающий белок дополнительно связывается с CD123 *Macaca fascicularis*. В частности, антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению связывается с внеклеточным доменом CD123 человека или CD123 как человека, так и *Macaca fascicularis*. Более конкретно, антителоподобный связывающий белок связывается с дистальным фрагментом CD123, например с аминокислотами, начиная от положения 19 до 49 CD123 человека с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 104. Антителоподобный связывающий белок связывается с CD123, не важно экспрессируется ли он в виде выделенной формы или присутствует в виде растворимого внеклеточного домена или полноразмерного заякоренного в мембране CD123, представленного в клетках, экспрессирующих CD123, таких как клетки AML или клетки, трансфицированные с помощью CD123. Антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению является специфическим в отношении клеток, которые экспрессируют белки CD123 человека или человека и *Macaca fascicularis* на своей поверхности, например, раковых клеток, экспрессирующих CD123.

Соответственно, антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению характеризуется аффинностью (KD) в отношении CD123 человека или CD123 *Macaca fascicularis*, или обоих, которая составляет ≤ 20 nM, ≤ 15 nM или ≤ 10 nM, например ≤ 5 nM, например аффинность составляет от 0,01 до 5 nM, в частности составляет от 0,1 до 5 nM.

Соответственно, в одном варианте осуществления первый иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD3, выбранное из антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2", и "8H2", или их гуманизированной формы, например антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "hz4B4" и "hz20G6", а второй иммуноглобулин представляет собой антитело к CD123, выбранное из антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", и "9F6-G3".

Соответственно, в дополнительном варианте осуществления второй иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD3, выбранное из антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "12D2-E5", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "18H11-F10", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "3G5-E10", "9D7-F3", "8C2-F7", "20E5-F10", "20B5-F10", "6C9-C9", "3E8-G1", "3H6-D2", и "8H2", или их гуманизированной формы, например антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "hz4B4" и "hz20G6", а первый иммуноглобулин представляет собой одно антитело к CD123, выбранное из антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", и "9F6-G3".

Соответственно, в одном варианте осуществления V_{D1} и V_{D4} или V_{D2} и V_{D3} содержат вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, причем каждый из них определяется либо последовательностями трех CDR, либо последовательностями вариабельного домена тяжелой и легкой цепей из одного из 13 антител к CD123, называемых "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", и "9F6-G3", определяемых выше, где оба V_{D1} и V_{D4} содержат последовательности трех CDR из последовательностей вариабельного домена тяжелой и легкой цепей одного антитела к CD123, как определено выше, если оба V_{D2} и V_{D3} содержат последовательности трех CDR из последовательностей вариабельного домена тяжелой и легкой цепей одного из антител к CD3, определяемых выше, или где оба V_{D2} и V_{D3} содержат три CDR из последовательностей вариабельного домена тяжелой и легкой цепи одного антитела к CD123, как определено выше, если V_{D1} и V_{D4} содержат последовательности CDR из последовательностей вариабельного домена тяжелой и легкой цепей одного из антител к CD3, определяемых выше.

Соответственно, в одном варианте осуществления V_{D1} и V_{D4} представляют собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепей антитела к CD3, где указанное антитело к CD3 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 6, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 7, CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 8, и вариабельный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 142, CDR2-L с последовательностью "KVS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 11, а V_{D2} и V_{D3} представляют собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи антитела к CD123, выбранного из группы, состоящей из антител к CD123, "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3", как описано выше в разделе "Антитела к CD123", при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой вариабельные домены легких цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой вариабельные домены тяжелых цепей, или оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой вариабельные домены тяжелых цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой вариабельные домены легких цепей.

Соответственно, в дополнительном варианте осуществления V_{D2} и V_{D3} представляют собой вариабельные домены легких цепей.

домен тяжелой или легкой цепи антитела к CD123, выбранного из группы, состоящей из антител к CD123, "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3", как описано выше в разделе "Антитела к CD123",

при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, или оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей.

В дополнительном варианте осуществления V_{D2} и V_{D3} представляют собой переменный домен тяжелой или легкой цепи гуманизованного антитела к CD3, где указанное антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 171 и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 158, а V_{D1} и V_{D4} представляют собой переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела к CD123, выбранного из группы, состоящей из антител к CD123, "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3", как описано выше в разделе "Антитела к CD123", при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, или оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей.

В дополнительном варианте осуществления V_{D1} и V_{D4} представляют собой переменный домен тяжелой или легкой цепи гуманизованного антитела к CD3, где указанное антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 176 и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 164, а V_{D2} и V_{D3} представляют собой переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела к CD123, выбранного из группы, состоящей из антител к CD123, "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3", как описано выше в разделе "Антитела к CD123", при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, или оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей.

В дополнительном варианте осуществления V_{D2} и V_{D3} представляют собой переменный домен тяжелой или легкой цепи гуманизованного антитела к CD3, где указанное антитело к CD3 содержит переменный домен тяжелой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 176 и/или переменный домен легкой цепи с последовательностью под SEQ ID NO: 164, а V_{D1} и V_{D4} представляют собой переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела к CD123, выбранного из группы, состоящей из антител к CD123, "3E3-D3", "1E1-G5", "2B8-F3", "2F8-D6", "3B10-E6", "5A5-B4", "6B10-E4", "6C10-C4", "6D6-B8", "8B11-B7", "9B8-G6", "9D7-C8", "9F6-G3", как описано выше в разделе "Антитела к CD123", при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, или оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей.

Согласно дополнительному аспекту настоящего изобретения первый или второй иммуноглобулин представляет собой антитело к CD123, 7G3. Следовательно, в одном варианте осуществления V_{D1} и V_{D4} или V_{D2} и V_{D3} содержат переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, как определено по последовательностям CDR из последовательностей переменного домена тяжелой и легкой цепи, антитела 7G3, как определено в данном документе ниже. В одном варианте осуществления V_{D1} и V_{D4} или V_{D2} и V_{D3} содержат переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи антитела 7G3, описываемого в патентной заявке WO2013/173820, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Соответственно, антитело к CD123, называемое в данном документе "7G3", содержит переменный домен тяжелой цепи, состоящий из последовательности

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYMKWKQSHGKSLEWIGDIIIPSNGATFYNQKF

KGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSLLRASWFAYWGQGLTVTSA

(SEQ ID NO: 312, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-H с последовательностью под SEQ ID NO: 375, CDR2-H с последовательностью под SEQ ID NO: 376 и CDR3-H с последовательностью под SEQ ID NO: 377, и

переменный домен легкой цепи, состоящий из последовательности

DFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSGNQKNYLTWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGV

PDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPYTFGGGTKLEIK

(SEQ ID NO: 308, при этом CDR показаны символами с полужирным начертанием), содержащий CDR1-L с последовательностью под SEQ ID NO: 378, CDR2-L с последовательностью "WAS" и CDR3-L с последовательностью под SEQ ID NO: 379.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения антитело 7G3 также может быть гуманизованным антителом или фрагментом гуманизованного антитела. Соответственно, в одном варианте осуществления антитело 7G3 по настоящему изобретению представляет собой гуманизованное анти-

В варианте осуществления антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с CD3ε человека и CD123 человека, содержит или фактически состоит из:

а) одного полипептида формулы [I], состоящего из последовательности под SEQ ID NO: 388 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310),

или последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 388, в которой 3 CDR из последовательности под SEQ ID NO: 378, последовательности "WAS" и последовательности под SEQ ID NO: 379 из варибельного домена легкой цепи hz7G3 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385) и 3 CDR с последовательностью под SEQ ID NO: 142, последовательностью "KVS" и последовательностью под SEQ ID NO: 11 из варибельного домена легкой цепи hz20G6 (V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141) являются неизменными; и

б) одного полипептида формулы [II], состоящего из последовательности под SEQ ID NO: 390 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383, L_4 представляет собой 0 аминокислот, и C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313), или

последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 390, в которой 3 CDR из последовательностей под SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384 и SEQ ID NO: 382 из варибельного домена тяжелой цепи hz7G3 (V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383) и 3 CDR с последовательностями под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 из варибельного домена тяжелой цепи hz20G6 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138) являются неизменными;

и при этом полипептид формулы [I] и полипептид формулы [II] образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи.

В варианте осуществления антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с CD3ε человека и CD123 человека, содержит или фактически состоит из:

а) одного полипептида согласно формуле [IV] с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 391 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310, L_5 , который содержит 0 аминокислот, и F_{c2} с последовательностью под SEQ ID NO: 392), или

последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 391, в которой 3 CDR из последовательности под SEQ ID NO: 378, последовательности "WAS" и последовательности под SEQ ID NO: 379 из варибельного домена легкой цепи hz7G3 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385) и 3 CDR с последовательностью под SEQ ID NO: 142, последовательностью "KVS" и последовательностью под SEQ ID NO: 11 из варибельного домена легкой цепи hz20G6 (V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141) являются неизменными; и

б) одного полипептида согласно формуле [III] с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 393 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383, причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313 и F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 394), или

последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 393, в которой 3 CDR из последовательностей под SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384 и SEQ ID NO: 382 из варибельного домена тяжелой цепи hz7G3 (V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383) и 3 CDR с последовательностями под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 из варибельного домена тяжелой цепи hz20G6 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138) являются неизменными;

и при этом полипептид формулы [IV] и полипептид формулы [III] образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи.

В указанном антителоподобном связывающем белке полипептидные цепи, представленные формулами [III] и [IV], образуют димер с помощью своих соответствующих областей F_{c2} и F_c .

В варианте осуществления антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с CD3ε человека и CD123 человека, содержит или фактически состоит из:

а) одного полипептида согласно формуле [I], состоящего из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 388 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310); или

последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 388, в которой 3 CDR из последовательности под SEQ ID NO: 378, последовательности "WAS" и последовательности под SEQ ID NO: 379 из варибельного домена легкой цепи hz7G3 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385) и 3 CDR с последовательностью под SEQ ID NO: 142, последовательностью "KVS" и последовательностью под SEQ ID NO: 11 из варибельного домена легкой цепи hz20G6 (V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141) являются неизменными; и

б) одного полипептида согласно формуле [III] с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 395 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383, причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313 и F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 396), или

последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 395, в которой 3 CDR из последовательностей под SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384 и SEQ ID NO: 382 из варибельного домена тяжелой цепи hz7G3 (V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383) и 3 CDR с последовательностями под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 из варибельного домена тяжелой цепи hz20G6 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138) являются неизменными; и

с) одного Fc-stump (полипептид F_{c3}) с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 397 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, где указанный F_{c3} -stump или последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична ему, образует гетеродимер с Fc-областью полипептида согласно формуле [III];

и при этом полипептид формулы [I] и полипептид формулы [III] образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи.

В варианте осуществления антителоподобный связывающий белок, который специфически связывается с CD3ε человека и CD123 человека, содержит или фактически состоит из:

а) одного полипептида согласно формуле [I], состоящего из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 388 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385, L_1 с последовательностью под SEQ ID NO: 389, V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141, L_2 с последовательностью под SEQ ID NO: 389 и C_L с последовательностью под SEQ ID NO: 310) или

последовательности, которая по меньшей мере на 85% идентична последовательности под SEQ ID NO: 388, в которой 3 CDR из последовательности под SEQ ID NO: 378, последовательности "WAS" и последовательности под SEQ ID NO: 379 из варибельного домена легкой цепи hz7G3 (V_{D1} с последовательностью под SEQ ID NO: 385) и 3 CDR с последовательностью под SEQ ID NO: 142, последовательностью "KVS" и последовательностью под SEQ ID NO: 11 из варибельного домена легкой цепи hz20G6 (V_{D2} с последовательностью под SEQ ID NO: 141) являются неизменными;

б) полипептида согласно формуле III с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 399 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138, причем L_3 представляет собой 0 аминокислот, V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383, причем L_4 представляет собой 0 аминокислот, C_{H1} с последовательностью под SEQ ID NO: 313 и F_c с последовательностью под SEQ ID NO: 400), или

последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, в которой 3 CDR с последовательностями под SEQ ID NO: 381, SEQ ID NO: 384 и SEQ ID NO: 382 из варибельного домена тяжелой цепи hz7G3 (V_{D4} с последовательностью под SEQ ID NO: 383) и 3 CDR с последовательностями под SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 из варибельного домена тяжелой цепи hz20G6 (V_{D3} с последовательностью под SEQ ID NO: 138) являются неизменными; и

с) одного Fc-stump (полипептид F_{c3}) с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 398 или последовательностью, которая по меньшей мере на 85% идентична ей, где указанный F_{c3} -stump или последовательность, которая по меньшей мере на 85% идентична ему, образует гетеродимер с Fc-областью полипептида согласно формуле [III];

и при этом полипептид формулы [I] и полипептид формулы [III] образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи.

Иммуноконъюгаты.

В одном варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению является конъюгированным или связанным со средством для подавления роста, цитотоксическим средством или ферментом, активирующим пролекарство. В частности, антитела к CD123 по настоящему изобретению действительно применимы для нацеливания указанного средства для подавления роста, цитотоксического средства или пролекарства на раковые клетки, экспрессирующие или сверхэкспрессирующие CD123 на своей поверхности.

Нуклеиновые кислоты, векторы и рекомбинантные клетки-хозяева.

Дополнительная цель настоящего изобретения относится к последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей или состоящей из последовательности, кодирующей антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок, определяемые выше.

Как правило, указанная нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК, которую можно включать в любой подходящий вектор, такой как плазида, космида, эписома, искусственная хромосома, фаг или вирусный вектор.

Термины "вектор", "клонированный вектор" и "вектор экспрессии" означают носитель, при помощи которого последовательность ДНК или РНК (например, чужеродный ген) можно вводить в клетку-хозяина для того, чтобы трансформировать хозяина и стимулировать экспрессию (например, транскрипцию и трансляцию) введенной последовательности.

Так, дополнительная цель настоящего изобретения относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению.

Такие векторы могут содержать регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, терминатор и т.п., которые вызывают или управляют экспрессией указанного полипептида после введения субъекту. Примеры промоторов и энхансеров, применяемых в векторе экспрессии для животной клетки, включают ранний промотор и энхансер SV40 (Mizukami T. et al. 1987), LTR-промотор и энхансер вируса мышинного лейкоза Молони (Kuwana Y. et al. 1987), промотор (Mason J.O. et al. 1985) и энхансер (Gillies S.D. et al. 1983) H-цепи иммуноглобулина и т.п.

Можно применять любой вектор экспрессии для животной клетки, при условии, что ген, кодирующий С-область антитела человека, может быть вставлен и экспрессирован. Примеры подходящих векторов включают pAGE107 (Miyaji H. et al. 1990), pAGE103 (Mizukami T. et al. 1987), pHSG274 (Brady G. et al. 1984), pKCR (O'Hare K. et al. 1981), pSG1 бета-d2-4-(Miyaji H. et al. 1990) и т.п. Другие примеры плазмид включают реплицирующиеся плазмиды, содержащие точку начала репликации, или интегративные плазмиды, такие как, например, pUC, pcDNA, pBR и т.п.

Другие примеры вирусных векторов включают векторы на основе аденовируса, ретровируса, вируса герпеса и AAV. Такие рекомбинантные вирусы можно получить при помощи методик, известных из уровня техники, как, например, при помощи трансфекции в упаковывающие клетки или посредством транзientной трансфекции хелперными плазмидами или вирусами. Типичные примеры клеток, упаковывающих вирус, включают клетки PA317, клетки PsiCRIP, клетки GPenv+, клетки 293 и т.д. Подробные протоколы получения таких рекомбинантных вирусов, дефектных по репликации, можно, например, найти в WO 95/14785, WO 96/22378, US 5882877, US 6013516, US 4861719, US 5278056 и WO 94/19478.

Дополнительная цель настоящего изобретения относится к клетке, которая была трансфицирована, инфицирована или трансформирована нуклеиновой кислотой и/или вектором согласно настоящему изобретению.

Термин "трансформация" означает введение "чужеродного" (т.е. постороннего) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина таким образом, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенные ген или последовательность с получением требуемого вещества, как правило белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Клетка-хозяин, которая получила и экспрессирует введенную ДНК или РНК, становится "трансформированной".

Нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению можно применять для получения рекомбинантного антитела по настоящему изобретению в подходящей системе экспрессии. Термин "система экспрессии" означает клетку-хозяина и совместимый вектор в условиях, подходящих, например, для экспрессии белка, закодированного чужеродной ДНК, которая находится в векторе и вводится в клетку-хозяина.

Стандартные системы экспрессии включают клетки-хозяева *E.coli* и плазмидные векторы, клетки-хозяева насекомых и векторы на основе бакуловируса, а также клетки-хозяева млекопитающих и векторы для экспрессии у них. Другие примеры клеток-хозяев включают без ограничений прокариотические клетки (такие как бактерии) и эукариотические клетки (такие как клетки дрожжей, клетки млекопитающих, клетки насекомых, растительные клетки и т.д.). Конкретные примеры включают *E.coli*, дрожжи *Kluyveromyces* или *Saccharomyces*, линии клеток млекопитающих (например, клетки Vero, клетки CHO, клетки 3T3, клетки COS и т.д.), а также первичные или устойчивые культуры клеток млекопитающих (например, полученные из лимфоцитов, фибробластов, эмбриональных клеток, эпителиальных клеток, нервных клеток, адипоцитов и т.д.). Примеры также включают клетку мыши SP2/0-Ag14 (ATCC CRL1581), клетку мыши P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL1580), клетку CHO, в которой ген дигидрофолатредуктазы (называемый далее "ген DHFR") является дефектным (Urlaub G et al; 1980), клетку крысы YB2/3H.L.P2.G11.16Ag.20 (ATCC CRL1662, называемую далее "клетка YB2/0") и т.п. Клетка YB2/0 является предпочтительной, поскольку активность ADCC химерных или гуманизированных антител усиливается при экспрессии в этой клетке.

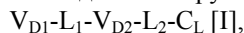
В частности, для экспрессии гуманизированного антитела или антителоподобного связывающего белка вектор экспрессии может принадлежать или к типу, у которого ген, кодирующий тяжелую цепь антитела, и ген, кодирующий легкую цепь антитела, расположены на отдельных векторах, или к типу, у которого оба гена расположены на одном векторе (тандемный тип). В связи с более простым конструированием вектора экспрессии для гуманизированного антитела и антителоподобного связывающего белка, более простым введением в животные клетки и балансом между уровнями экспрессии H- и L-цепей антитела в животных клетках тандемный тип вектора экспрессии для гуманизированного антитела является предпочтительным (Shitara K. et al. *J. Immunol. Methods*. 1994 Jan. 3;167 (1-2):271-8). Примеры тандемного типа вектора экспрессии для гуманизированного антитела включают pKANTEX93 (WO 97/10354), pEE18 и т.п.

Настоящее изобретение также относится к способу получения рекомбинантной клетки-хозяина, экспрессирующей антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению, причем указанный способ включает стадии, состоящие из: (i) введения *in vitro* или *ex vivo* рекомбинантной нуклеиновой кислоты или вектора, описываемых выше, в компетентную клетку-хозяина, (ii) культивирования *in vitro* или *ex vivo* полученной рекомбинантной клетки-хозяина и (iii), необязательно, отбора клеток, которые экспрессируют и/или секретируют указанное антитело.

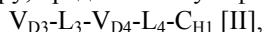
Такие рекомбинантные клетки-хозяева можно применять для получения антитела к CD3, по меньшей мере одного антитела к CD123 или по меньшей мере одного антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению.

Способы получения антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрен способ получения антителоподобного связывающего белка, содержащего две полипептидные цепи, которые образуют два антигенсвязывающих участка, где первый полипептид имеет структуру, представленную формулой [I]:



а второй полипептид имеет структуру, представленную формулой [II]



где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

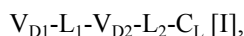
C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;

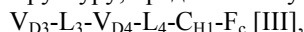
и при этом первый и второй полипептиды образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а

оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения антителоподобного связывающего белка, содержащего четыре полипептидные цепи, который образуют четыре антигенсвязывающих участка, где две полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулой [I]:



а две полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулой (III)



где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

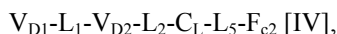
F_c представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены C_{H2} , C_{H3} тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;

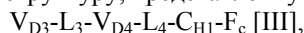
и при этом полипептиды формулы I и полипептиды формулы III образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и

при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей.

В дополнительном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ получения антителоподобного связывающего белка, содержащего четыре полипептидные цепи, который образуют четыре антигенсвязывающих участка, где две полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулой [IV]



а две полипептидные цепи имеют структуру, представленную формулой [III]



где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_c представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

F_{c2} представляет собой шарнирную область иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина из иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 , L_4 и L_5 представляют собой аминокислотные линкеры;

и при этом полипептиды формулы I и полипептиды формулы III образуют кроссоверную пару легкой цепи-тяжелой цепи, и

при этом оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой или переменные домены легких цепей, или переменные домены тяжелых цепей, а оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелых цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены легких цепей, или оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легких цепей, если V_{D1} и V_{D2} представляют собой переменные домены тяжелых цепей.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения первый иммуноглобулин или второй иммуноглобулин представляют собой одно антитело к CD3, как определено в разделе "Антитела к CD3" выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения первый иммуноглобулин или второй иммуноглобулин представляют собой одно антитело к CD123, как определено в разделе "Антитела к CD123" выше.

Антитело к CD3, антитело к CD123 и/или антителоподобные связывающие белки по настоящему изобретению можно получать с помощью любой методики, известной из уровня техники, такой как без ограничений любая химическая, биологическая, генетическая или ферментативная методика, либо отдельно, либо в комбинации.

Зная аминокислотную последовательность необходимой последовательности, специалист в данной области может легко получить указанные антитела или цепи иммуноглобулина с помощью стандартных методик для получения полипептидов. Например, их можно синтезировать с применением хорошо известного твердофазного метода, в частности, с применением коммерчески доступного устройства для пептидного синтеза (такого как производимый Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния), и следуя инструкциям производителя. В качестве альтернативы антитела, цепи иммуноглобулинов и антителоподобные связывающие белки по настоящему изобретению можно синтезировать с помощью методики рекомбинантной ДНК, хорошо известной из уровня техники. Например, эти фрагменты можно получать в качестве продуктов экспрессии ДНК после внедрения последовательностей ДНК, кодирующих необходимый (поли)пептид, в векторы экспрессии и введения таких векторов в подходящих эукариотических или прокариотических хозяев, которые будут экспрессировать необходимый полипептид, из которых их позже можно выделять с применением хорошо известных методик.

В частности, настоящее изобретение дополнительно относится к способу получения антител к CD3, антител к CD123 и/или антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению, причем указанный способ включает стадии, состоящие из: (i) культивирования трансформированной клетки-хозяина согласно настоящему изобретению; (ii) обеспечения экспрессии указанного антитела или полипептида и (iii) извлечения экспрессированного антитела или полипептида.

Антитела к CD3, антитела к CD123 и/или антителоподобные связывающие белки по настоящему изобретению надлежащим образом отделяются от культуральной среды с помощью традиционных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, белок А-сефароза, хроматография с гидроксипатитом, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография.

В конкретном варианте осуществления гуманизованное химерное антитело к CD3 и/или антитело к CD123 по настоящему изобретению можно получать путем получения нуклеиновых последовательностей, кодирующих VL- и VH-домены, гуманизованные как описано ранее, конструирования вектора экспрессии для химерного антитела человека путем вставки их в вектор экспрессии для животной клетки, который несет гены, кодирующие CH антитела человека и CL антитела человека, и обеспечения экспрессии кодирующей последовательности путем введения вектора экспрессии в животную клетку. По аналогии с ним, гуманизованный антителоподобный связывающий белок можно получать с применением вместо переменного домена тяжелой или легкой цепи первого гуманизованного иммуноглобулина (V_{D1}), вместо переменного домена тяжелой или легкой цепи второго гуманизованного иммуноглобулина (V_{D2}), вместо переменного домена тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина (V_{D3}) и вместо переменного домена тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина переменные домены тяжелой и легкой цепей двух гуманизованных антител.

В качестве CH-домена химерного антитела человека или CH-домена антителоподобного связываю-

щего белка по настоящему изобретению может выступать любая область, которая принадлежит тяжелым цепям иммуноглобулина человека, но подходящими являются относящиеся к классу IgG, и также можно использовать относящиеся к любому из подклассов, принадлежащих к классу IgG, таких как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Также, в качестве CL химерного антитела человека или CL антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению может служить любая область, которая принадлежит к легким цепям иммуноглобулина человека, и можно использовать цепи, относящиеся к классу каппа или лямбда.

Способы получения гуманизированных или химерных антител включают традиционные методики рекомбинантной ДНК и трансфекции генов, известные из уровня техники (см. Morrison S.L. et al. (1984) и патентные документы US 5202238 и US 5204244).

Способы получения гуманизированных антител на основе традиционных методик рекомбинантной ДНК и трансфекции генов хорошо известны из уровня техники (см., например, Riechmann L. et al. 1988; Neuberger M.S. et al. 1985). Антитела можно гуманизировать с применением разнообразных методик, известных из уровня техники, в том числе, например, методики, раскрытой в заявке WO 2009/032661, привития CDR (EP 239400; публикации согласно PCT WO 91/09967; патенты США № 5225539; 5530101 и 5585089), маскировки поверхностных остатков или изменения поверхности (EP 592106; EP 519596; Padlan E.A. (1991); Studnicka G.M. et al. (1994); Roguska M.A. et al. (1994)) и шаффлинга цепей (патент США № 5565332). Общая технология рекомбинантной ДНК для получения таких антител также известна (см. европейскую патентную заявку EP 125023 и международную патентную заявку WO 96/02576).

Fab по настоящему изобретению можно получать путем обработки антитела, которое специфически реагирует с CD3 или CD123, протеазой, такой как папаин. Также Fab можно получать путем вставки последовательностей ДНК, кодирующих обе цепи Fab из антитела, в вектор для экспрессии в эукариотической клетке или для экспрессии в эукариотической клетке и введения вектора в прокариотические или эукариотические клетки (в соответствующих случаях) для экспрессии Fab.

F(ab')₂ по настоящему изобретению можно получать обработкой антитела, которое специфически реагирует с CD3 или CD123, протеазой, такой как пепсин. Также F(ab')₂ можно получать путем связывания Fab', описанного ниже, с помощью тиоэфирной связи или дисульфидной связи.

Fab' по настоящему изобретению можно получать обработкой F(ab')₂, который специфически реагирует с CD3 или CD123, восстанавливающим средством, таким как дитиотреитол. Также Fab' можно получать путем вставки последовательностей ДНК, кодирующих цепи Fab' из антитела, в вектор для экспрессии в эукариотической клетке или в вектор для экспрессии в эукариотической клетке и введения вектора в прокариотические или эукариотические клетки (в соответствующих случаях) для осуществления его экспрессии.

scFv по настоящему изобретению можно получать путем определения последовательностей CDR или VH- и VL-доменов, описываемых ранее, конструирования ДНК, кодирующей scFv-фрагмент, вставки ДНК в вектор экспрессии для прокариотической или эукариотической клетки и затем введения вектора экспрессии в прокариотические или эукариотические клетки (в соответствующих случаях) для экспрессии scFv. Для получения гуманизированного scFv-фрагмента можно применять хорошо известную технологию, называемую привитие CDR, которая предусматривает отбор областей, определяющих комплементарность (CDR), согласно настоящему изобретению и привития их на каркас scFv-фрагмента человека с известной трехмерной структурой (см., например, WO 98/45322; WO 87/02671; US 5859205; US 5585089; US 4816567; EP 0173494).

Модификация антител по настоящему изобретению.

Предусмотрена(ы) модификация(и) аминокислотной последовательности антител или антителоподобных связывающих белков, описываемых в данном документе. Например, может потребоваться усилить аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела или антителоподобного связывающего белка. Например, известно, что когда гуманизированное антитело получают путем простого привития только CDR из VH и VL антитела, полученного из отличного от человека животного, в FR из VH и VL антитела человека, антигенсвязывающая активность может снижаться по сравнению с таковой исходного антитела, полученного из отличного от человека животного. Считается, что некоторые аминокислотные остатки VH и VL антитела животного, отличного от человека, не только в CDR, но также в FR, могут быть непосредственно или опосредованно ассоциированы с антигенсвязывающей активностью. Следовательно, замена этих аминокислотных остатков на другие аминокислотные остатки, происходящие от FR из VH и VL антитела человека, будут снижать активность связывания. Чтобы решить эту проблему, касающуюся антител человека с привитыми CDR из антител отличных от человека животных, были сделаны попытки идентифицировать в аминокислотных последовательностях FR из VH и VL антител человека аминокислотный остаток, который непосредственно ассоциирован со связыванием антитела, или который взаимодействует с аминокислотным остатком CDR, или который поддерживает трехмерную структуру антитела и который непосредственно ассоциирован со связыванием с антигеном. Сниженную антигенсвязывающую активность можно повышать путем замещения идентифицированных аминокислот аминокислотными остатками из исходного антитела, полученного из отличного от человека животного. Антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению может содержать вариабельные области гуманизированного антитела и, следовательно, рассуждения, упомянутые в данном

документе, в равной степени применимы к антителоподобным связывающим белкам по настоящему изобретению.

Модификации и изменения можно проводить в структуре антител по настоящему изобретению и в последовательностях ДНК, кодирующих их, и при этом все еще получают функциональное антитело, антителоподобный связывающий белок или полипептид с требуемыми характеристиками.

При осуществлении изменений в аминокислотных последовательностях полипептида можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Важность индекса гидропатичности аминокислот в обеспечении биологической функции взаимодействия белка в целом понятна из уровня техники. Принято, что особенность относительной гидропатичности аминокислоты вносит вклад во вторичную структуру полученного белка, которая, в свою очередь, определяет взаимодействие белка с другими молекулами, например, ферментами, субстратами, рецепторами, ДНК, антителами, антигенами и т.п. Каждой аминокислоте был присвоен индекс гидропатичности на основе их характеристик гидрофобности и заряда, который составляет: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-3,2); гистидин (-3,5); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Дополнительная цель настоящего изобретению также охватывает варианты с консервативной функцией полипептидов антител к CD3, антител к CD123 и антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению.

Например, определенные аминокислоты можно замещать другими аминокислотами в структуре белка без существенной потери активности. Поскольку способность к взаимодействию и природа белка определяют его биологическую функциональную активность, можно производить определенные аминокислотные замены в белковой последовательности и, конечно же, в его кодирующей последовательности ДНК, при этом все же получая белок с аналогичными свойствами. Таким образом, подразумевается, что можно производить различные изменения в последовательностях антител по настоящему изобретению или соответствующих последовательностях ДНК, которые кодируют указанные полипептиды без существенной потери их биологической активности.

Из уровня техники известно, что определенные аминокислоты можно заменять другими аминокислотами, характеризующимися аналогичным индексом или баллом гидропатичности, и при этом все еще получать белок с аналогичной биологической активностью, т.е. все еще получать белок с эквивалентной биологической функцией. Также возможно применять хорошо известные технологии, такие как подходы аланинового сканирования, для идентификации в антителе или полипептиде по настоящему изобретению всех аминокислот, которые можно заменить без значительной потери связывания с антигеном. Такие остатки можно характеризовать как нейтральные, поскольку они не вовлечены в связывание антигена или в поддержание структуры антитела. В одно или несколько этих нейтральных положений можно вводить замену на аланин или другую аминокислоту без изменения основных характеристик антитела или полипептида по настоящему изобретению.

Как указывалось выше, аминокислотные замены, следовательно, в целом основаны на относительном сходстве заместителей в боковой цепи аминокислоты, например их гидрофобности, гидрофильности, заряде, размере и т.п. Иллюстративные замены, которые учитывают различные из вышеприведенных особенностей, хорошо известны специалистам в данной области и включают: аргинин и лизин; глутамат и аспартат; серин и треонин; глутамин и аспарагин; а также валин, лейцин и изолейцин.

Также может потребоваться модифицировать антитело к CD3, антитело к CD123 и антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению с учетом эффекторной функции, например, чтобы усилить или снизить антиген-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) антитела. Этого можно достичь путем введения одной или нескольких аминокислотных замен в Fc-область антитела, в данном документе это приводит к так называемым Fc-вариантам в контексте антителоподобных связывающих белков по настоящему изобретению. В качестве альтернативы или дополнительно в Fc-область можно вводить цистеиновый остаток(ки), тем самым обеспечивая образование дисульфидной связи между цепями в данной области. Полученное таким образом гомодимерное антитело может характеризоваться усиленной или сниженной способностью к интернализации и/или повышенным опосредованным комплементом цитолизом и/или антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (Caron P.C. et al. 1992; и Shopes B. 1992).

Другой тип модификации аминокислот в антителе к CD3, антителе к CD123 и антителоподобном связывающем белке по настоящему изобретению может быть пригоден для изменения исходного паттерна гликозилирования антитела к CD3, антитела к CD123 и антителоподобного связывающего белка, т.е. путем удаления одного или нескольких углеводных фрагментов, находящихся в антителе к CD3, антителе к CD123 и антителоподобном связывающем белке, и/или путем добавления одного или нескольких участков гликозилирования, которые не присутствовали в антителе к CD3, антителе к CD123 и антителоподобном связывающем белке. Присутствие либо трипептидных последовательностей аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, в которых Х представляет собой любую аминокислоту за исключением пролина, создает потенциальный участок гликозилирования. Добавление участков гликозилирования в

антитело к CD3, антитело к CD123 и антителоподобный связывающий белок или удаление из них удобно осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности, чтобы она содержала один или несколько из вышеописанных трипептидных последовательностей (в случае участков N-сцепленного гликозилирования).

Другой тип модификации предусматривает удаление последовательностей, идентифицированных либо *in silico*, либо экспериментальным путем, как потенциально приводящих к продуктам распада в препаратах на основе антитела к CD3, антитела к CD123 и антителоподобного связывающего белка или их гетерогенности. В качестве примеров, дезамидирование аспарагинового и глутаминового остатков может происходить в зависимости от факторов, таких как pH и нахождение на поверхности. Аспарагиновые остатки особенно подвержены дезамидированию, в первую очередь когда находятся в последовательности Asn-Gly, и в меньшей степени в других дипептидных последовательностях, таких как Asn-Ala. Когда такой участок дезамидирования, в частности Asn-Gly, присутствует в антителе к CD3, антителе к CD123 и антителоподобном связывающем белке или полипептиде по настоящему изобретению, следовательно, может потребоваться удалить данный участок, как правило, путем осуществления консервативной замены для удаления одного из участвующих остатков. Подразумевается, что такие замены в последовательности для удаления одного или нескольких участвующих остатков также охватываются настоящим изобретением.

Другой тип ковалентной модификации предусматривает химическое или ферментативное связывание гликозидов с антителом к CD3, антителом к CD123 и антителоподобным связывающим белком. Эти процедуры имеют преимущество в том, что для них не требуется получение антитела к CD3, антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка в клетке-хозяине, которые обладают способностью к гликозилированию с целью N- или O-сцепленного гликозилирования. В зависимости от применяемого режима связывания сахар(а) можно прикреплять к (а) аргинину и гистидину, (b) свободным карбоксильным группам, (c) свободным сульфгидрильным группам, таким как группы цистеина, (d) свободным гидроксильным группами, таким как группы серина, треонина или гидроксипролина, (e) ароматическим остаткам, таким как фенилаланин, тирозин или триптофан, или (f) амидной группе глутамин. Например, такие способы описаны в WO 87/05330.

Удаление любых углеводных фрагментов, присутствующих на антителе к CD3, антителе к CD123 или антителоподобном связывающем белке, можно осуществлять химическим или ферментативным путем. Для химического дегликозилирования требуется воздействие на антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок соединения трифторметансульфоновая кислота или эквивалентного соединения. Эта обработка приводит к отщеплению большинства или всех сахаров, за исключением сшивающий сахаров (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин), при этом оставляя антитело интактным. Химическое дегликозилирование описано в Sojahr H. et al. (1987) и в Edge A.S. et al. (1981). Ферментативное отщепление углеводных фрагментов антител может достигаться с помощью применения различных эндо- и экзогликозидаз, описываемых в Thotakura N.R. et al. (1987).

Другой тип ковалентной модификации антитела к CD3, антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка включает связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например, полиэтиленгликолем, полипропиленгликолем или полиоксикалканами, с помощью способов, изложенных в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192 или 4179337.

Фармацевтические композиции.

Антитело к CD3, антитело к CD123 и/или антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению можно объединять с фармацевтически приемлемыми наполнителями и, необязательно, матриксами для замедленного высвобождения, такими как биоразлагаемые полимеры, для образования терапевтических композиций.

Таким образом, другая цель настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к антителу к CD3, антителу к CD123 или антителоподобному связывающему белку согласно настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в качестве лекарственного препарата.

Терминами "фармацевтическая композиция" или "терапевтическая композиция", как используется в данном документе, называют соединение или композицию, способные индуцировать необходимый терапевтический эффект при введении должным образом пациенту.

Такие терапевтические или фармацевтические композиции могут содержать терапевтически эффективное количество антитела к CD3, антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка или их конъюгатов с лекарственным средством, в смеси с фармацевтически или физиологически приемлемым средством для составления, выбранным в соответствии с режимом введения.

"Фармацевтическими" или "фармацевтически приемлемыми" называют молекулярные объекты и композиции, не вызывающие побочную, аллергическую или другую нежелательную реакцию при введении млекопитающему, в частности человеку, в соответствующих случаях. Фармацевтически приемле-

мым носителем или наполнителем называют нетоксичный твердый, полутвердый или жидкий наполнитель, разбавитель, инкапсулирующий материал или вспомогательное вещество для состава любого типа.

Как используется в данном документе, "фармацевтически приемлемые носители" включают все возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры подходящих носителей, разбавителей и/или наполнителей включают один или несколько из воды, аминокислот, солевого раствора, забуференного фосфатами солевого раствора, декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также их комбинаций. Во многих случаях предпочтительным будет включение в композицию изотонических средств, таких как сахара, многоатомные спирты или хлорид натрия, и состав может также содержать антиоксидант, такой как триптамин, и стабилизирующее средство, такое как Tween 20.

Форма фармацевтических композиций, путь введения, дозировка и схема, разумеется, зависят от состояния, подлежащего лечению, тяжести болезни, возраста, массы и пола пациента и т.д.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно составлять для местного, перорального, парентерального, интраназального, внутривенного, внутримышечного, подкожного или внутривидеального введения и т.п.

В частности, фармацевтические композиции содержат основы, которые являются фармацевтически приемлемыми для состава, который подлежит инъекционному введению. Они могут представлять собой, в частности, изотонические стерильные солевые растворы (фосфат мононатрия или динатрия, хлорид натрия, калия, кальция или магния и т.п. или смеси таких солей) или сухие, в частности, высушенные сублимацией, композиции, которые при добавлении, в зависимости от случая, стерилизованной воды или физиологического раствора обеспечивают получение инъекционных растворов.

Дозы, применяемые для введения, можно адаптировать в зависимости от различных параметров и, в частности, в зависимости от применяемого режима введения, от соответствующей патологии или, в качестве альтернативы, от необходимой продолжительности лечения.

Для получения фармацевтических композиций эффективное количество антитела или иммуноконъюгата по настоящему изобретению можно растворить или диспергировать в фармацевтически приемлемом носителе или водной среде.

Фармацевтические формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии, составы, включающие кунжутное масло, арахисовое масло или водный раствор пропиленгликоля; а также стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий для немедленного приема. Во всех случаях форма должна быть стерильной и должна быть текучей до такой степени, чтобы сохранялась возможность ее легкого введения через шприц. Она должна быть стабильной при условиях производства и хранения, и ее необходимо предохранять от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы.

Растворы активных соединений в виде свободного основания или фармакологически приемлемых солей можно получать в воде путем смешивания надлежащим образом с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии также можно получать в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В случае обычных условий хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению можно составлять в композицию в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислот (образованные с помощью свободных аминогрупп белка), и они образуются с помощью неорганических кислот, таких как, например, соляная или фосфорная кислоты, или таких органических кислот, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные с помощью свободных карбоксильных групп, также могут быть получены за счет неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, глицин, гистидин, прокаин и т.п.

Носитель также может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращения действия микроорганизмов можно достичь с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимерозала и т.п. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические средства, например сахара или хлорид натрия. Длительного всасывания инъекционных композиций можно добиться путем применения в композициях средств, задерживающих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъекционные растворы получают путем включения активных соединений в требуемом количестве в соответствующий растворитель вместе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, в случае необходимости, с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную основу, которая содержит основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из

перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов предпочтительные способы получения представляют собой методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые обеспечивают получение порошковой формы активного ингредиента с любым дополнительным необходимым ингредиентом из его раствора, предварительно подвергнутого стерилизации путем фильтрации.

Также предусмотрен препарат с более концентрированными или высококонцентрированными растворами для непосредственной инъекции, при этом считается, что применение DMSO в качестве растворителя приводит к очень быстрому проникновению, доставке высоких концентраций активных средств в небольшой участок опухоли.

После составления растворы будут вводить способом, совместимым с дозированным составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы без труда вводят в разнообразных лекарственных формах, как, например, типах инъекционных растворов, описанных выше, но капсулы с высвобождением лекарственного средства и т.п. также можно использовать.

Для парентерального введения в виде водного раствора, например, при необходимости, раствор следует надлежащим образом забуферить, а жидкий разбавитель вначале сделать изотоническим с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим стерильные водные среды, которые можно использовать, будут известны специалистам в данной области в свете настоящего раскрытия. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для гиподермоклизиса, либо инъектировать в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15-е издание, стр. 1035-1038 и 1570-1580). Неизбежно будет иметь место некоторое изменение дозы в зависимости от состояния субъекта, подлежащего лечению. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять соответствующую дозу для отдельного субъекта.

В одном варианте осуществления антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению составляют в терапевтическую смесь, содержащую приблизительно 0,01-100 мг на дозу или около того.

В добавление к антителу к CD3, антителу к CD123 или антителоподобному связывающему белку, составленным для парентерального введения, такого как внутривенная или внутримышечная инъекция, другие фармацевтически приемлемые формы включают, например, таблетки или другие твердые вещества для перорального введения; капсулы с замедленным высвобождением и любую другую форму, применяемую в настоящее время.

В определенных вариантах осуществления применение липосом и/или наночастиц предусмотрено для введения полипептидов, таких как антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок, в клетки-хозяева. Состав и применение липосом и/или наночастиц известны специалистам в данной области.

Нанокapsулы обычно могут удерживать соединения стабильным и воспроизводимым способом. Чтобы избежать побочных эффектов, обусловленных внутриклеточной перегрузкой полимером, обычно разрабатывают такие сверхмелкие частицы (размером около 0,1 мкм) с применением полимеров, которые могут распадаться *in vivo*. Биоразлагаемые полиалкил-цианокрилатные наночастицы, которые удовлетворяют этим требованиям, предусмотрены для применения в настоящем изобретении, и такие частицы можно легко получить.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и самопроизвольно образуют многослойные концентрические двуслойные везикулы (также называемые многослойные везикулы (MLV)). MLV обычно имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию малых однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне 200-500 Å, содержащих водный раствор в сердцевине. Физические характеристики липосом зависят от pH, ионной силы и присутствия двухвалентных катионов.

После того как фармацевтическая композиция составлена, ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или в виде обезвоженного или лиофилизированного порошка. Такие составы можно хранить либо в готовой к употреблению форме или в форме (например, лиофилизированной), требующей восстановления перед введением.

Терапевтические способы и способы применения.

Авторы настоящего изобретения показали для некоторых биспецифических соединений по настоящему изобретению, таких как "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3" и "hz20G6×7G3-TL4", цитотоксичность, опосредованную Т-клетками на модели линии клеток рака, положительных по CD123. Кроме того, авторы настоящего изобретения продемонстрировали способность некоторых биспецифических соединений по настоящему изобретению активировать Т-клетки в присутствии целевых клеток, что приводит к цитотоксичности в отношении опухолевых клеток. Авторы настоящего изобретения также продемонстрировали низкую активацию Т-клеток или отсутствие активации Т-клеток в отсутствие целевых клеток.

Хорошо известно, что терапевтические моноклональные антитела к CD123 могут приводить к ис-

тощению популяции клеток, несущих антиген, специфически распознаваемый антителом. Данное истощение популяции может опосредоваться, по меньшей мере, с помощью трех механизмов: антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (ADCC), комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC) и непосредственное подавление роста опухоли с помощью сигналов, передаваемых через антиген, на который нацелено антитело. В одном варианте осуществления антитела к CD123 по настоящему изобретению индуцируют цитотоксичность в клетках, экспрессирующих CD123, посредством антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

"Комплемент-зависимой цитотоксичностью" или "CDC" называют лизис целевой клетки в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется путем связывания первого компонента системы комплемента с антителами, которые связались с их соответственным антигеном. Для оценки активации комплемента можно проводить CDC-анализ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al. (1997).

"Антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью" или "ADCC" называют форму цитотоксичности, при которой секретируемые антитела, связавшиеся с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, естественных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), позволяют этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с целевой клеткой, несущей антиген, и затем убивать целевую клетку. Для оценки активности ADCC у молекулы, представляющей интерес, можно проводить *in vitro* ADCC-анализ, такой как описан в патенте США № 5500362 или 5821337.

Как описано выше в разделе "Антитела к CD3", антитела к CD3 по настоящему изобретению характеризуются низкой активацией Т-клеток, таким образом они обладают терапевтическим потенциалом у субъекта для применения в качестве иммуносупрессорного средства.

Кроме того, антителоподобный связывающий белок, определяемый выше, направлен на усиление иммунного ответа пациента в отношении опухолей посредством нацеливания Т-клеток на опухолевые клетки. В одном варианте осуществления антителоподобный связывающий белок, определяемый выше, нацеливается на субъединицу CD3ε Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности Т-клетки, а другое плечо нацеливается на раковую клетку, экспрессирующую CD123, при этом такое совместное вовлечение Т-клетки и раковой клетки с помощью биспецифической конструкции приводит к образованию цитолитического синапса, который индуцирует активацию Т-клеток и приводит к цитолизу опухолевых клеток. Цитоллиз опухолевых клеток может опосредоваться посредством по меньшей мере двух механизмов: цитоллиз с участием перфорина/гранзима и цитоллиз с участием FasL/Fas, например, цитоллиз с участием перфорина/гранзима.

Следовательно, в одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен способ лечения или предупреждения заболевания или нарушения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества антитела к CD3, антитела к CD123, антителоподобного связывающего белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, определяемой выше в разделе "Фармацевтическая композиция".

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению антитела к CD3, антитела к CD123, антителоподобного связывающего белка или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для получения лекарственного препарата для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению антитела к CD3, антитела к CD123, антителоподобного связывающего белка или фармацевтической композиции для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта.

Термин "субъект" или "индивидуум" применяются взаимозаменяемо и могут обозначать, например, человека или отличное от человека млекопитающее. Например, субъект представляет собой летучую мышь; хорька; кролика; представителя кошачьих (кошку); представителя собачьих (собаку); примата (обезьяну), представителя лошадиных (лошадь); человека, включая мужчину, женщину и ребенка. В одном варианте осуществления "субъектом" называют человека.

В контексте настоящего изобретения термином "осуществление лечения" или "лечение" называют терапевтическое применение (т.е. у субъекта, имеющего данное заболевание), и он означает обращение, облегчение, подавление прогрессирования одного или нескольких симптомов такого нарушения или состояния. Следовательно, лечением называют не только лечение, которое приводит к полному излечению заболевания, но также виды лечения, которые замедляют прогрессирование заболевания и/или продлевают выживание субъекта.

Под "предупреждением" подразумевают профилактическое применение (т.е. субъекта, подверженного развитию данного заболевания).

В одном варианте осуществления "заболевание" или "нарушение" представляет собой любое состояние, которое получит пользу от лечения с помощью антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления оно включает хронические или острые нарушения или заболевания, в том числе такие патологические состояния, которые предрасполагают субъекта к нарушениям, о которых идет речь. Термином "нуждающийся в лечении" называют субъекта, у которого уже имеется заболевание, а также тех, у которых нарушение следует пре-

дупредить.

В одном варианте осуществления "заболевание" или "нарушение" представляет собой любое состояние, которое получит пользу от лечения с помощью антитела к CD3 по настоящему изобретению. Следовательно, в одном варианте осуществления оно включает заболевания или нарушения, характеризующиеся патологическими иммунными ответами.

В контексте настоящего изобретения "патологический иммунный ответ" представляет собой воспалительный иммунный ответ.

В одном варианте осуществления заболевание, характеризующееся патологическим иммунным ответом, представляет собой аутоиммунные заболевания, заболевания, связанные с трансплантацией, или заболевания, ассоциированные с воспалением.

Аутоиммунное заболевание представляет собой, например, болезнь Крона, язвенный колит и диабет 1 типа или заболевание, связанное с трансплантацией, такое как реакция "трансплантат против хозяина" (GVHD).

Следовательно, в одном варианте осуществления субъект был диагностирован как страдающий от заболевания или нарушения, характеризующихся патологическим иммунным ответом.

В одном варианте осуществления субъект был диагностирован, как страдающий от аутоиммунного заболевания.

В другом варианте осуществления нарушением называют рак.

В дополнительном варианте осуществления рак относится к гемобластозу, в частности, к гемобластозу, ассоциированному с экспрессией CD123.

В одном варианте осуществления экспрессию CD123 раковыми клетками легко проанализировать, например, с применением антитела к CD123 согласно настоящему изобретению, как описано в следующем разделе "Диагностические способы применения".

"Гемобластозы, ассоциированные с экспрессией CD123" включают типы лейкоза (такие как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, злокачественный ретикулоэндотелиоз и миелодиспластический синдром) и

злокачественные лимфопролиферативные состояния, новообразование из бластных плазмцитоподобных дендритных клеток (BPDCN), системный мастоцитоз, включая типы лимфом (такие как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и

мелкоклеточная и крупноклеточная фолликулярная лимфома).

Как описано выше в разделе "Антитела к CD123", LSC экспрессируют CD123.

Таким образом, в близком варианте осуществления раком называют гемобластоз, ассоциированный с лейкозными стволовыми клетками.

Состояния гемобластозов, ассоциированных с лейкозными стволовыми клетками (LSC), которые можно лечить в соответствии с настоящим изобретением, включают типы лейкозов (такие как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз и миелодиспластический синдром) и злокачественные лимфопролиферативные состояния, включая типы лимфом (такие как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и мелкоклеточная и крупноклеточная фолликулярная лимфома).

В одном аспекте настоящего изобретения гемобластоз представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

В одном варианте осуществления субъект был диагностирован как страдающий от AML.

В дополнительном варианте осуществления субъект уже подвергался лечению с помощью химиотерапии до полной ремиссии, но у него произошел рецидив.

"Рецидив" определяется как повторный случай AML после полной ремиссии.

"Полная ремиссия" или "CR" определяется следующим образом: нормальные значения числа нейтрофилов ($>1,0 \times 10^9/\text{л}$), уровня гемоглобина 10 г/дл и количества тромбоцитов ($>100 \times 10^9/\text{л}$) и отсутствие потребности в трансфузии эритроцитов; бластных клеток менее 5%, отсутствие кластеров или скоплений бластных клеток и отсутствие телец Ауэра при исследовании костного мозга; а также нормальное созревание клеток крови (морфология; миелограмма) и отсутствие экстрамедуллярного лейкоза.

В одном варианте осуществления антитело к CD3, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению применяют отдельно или в комбинации с любым подходящим средством для подавления роста.

Под "терапевтически эффективным количеством" полипептида по настоящему изобретению подразумевают количество полипептида, достаточное для лечения указанного ракового заболевания, при приемлемом соотношении польза/риск, применимом к любому терапевтическому лечению. Будет, однако, понятно, что общее суточное количество применяемых полипептидов и композиций по настоящему изобретению будет определяться лечащим врачом в рамках здравого медицинского суждения. Конкретный терапевтически эффективный уровень дозы для любого конкретного пациента будет зависеть от ряда факторов, включающих нарушение, подвергаемое лечению, и тяжесть нарушения; активность конкретного используемого полипептида; конкретную используемую композицию, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента; время введения, путь введения и скорость экскреции кон-

кретного используемого полипептида; продолжительность лечения; лекарственные средства, применяемые в комбинации или одновременно с конкретным используемым полипептидом; и подобные факторы, хорошо известные в области медицины. Например, в рамках компетентности в данной области техники хорошо известно, что следует начинать с доз соединения на уровнях, ниже чем требуются для достижения необходимого терапевтического эффекта, и постепенно повышать дозировку, пока не достигнут необходимого эффекта.

В одном варианте осуществления эффективность лечения с помощью антитела к CD3, антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка по настоящему изобретению или иммуноконъюгата согласно настоящему изобретению легко проанализировать *in vivo*, например, на мышинной модели рака и с помощью измерения, например, изменений объема опухоли между группой лечения и контрольной группой.

Диагностические способы применения

Сообщалось, что CD123 сверхэкспрессируется на поверхности различных гематологических новообразований.

Следовательно, CD123 является маркером рака и, следовательно, обладает потенциалом применения для измерения эффективности противораковой терапии или обнаружения рецидива заболевания.

В варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению применяют в качестве компонента анализа в контексте терапии, нацеленной на опухоли, экспрессирующие CD123, чтобы определить восприимчивость пациента к терапевтическому средству, отслеживания эффективности противораковой терапии или

обнаружения рецидива заболевания после лечения. В частности, одно и то же антитело к CD123 по настоящему изобретению применяют как в качестве компонента терапевтического средства, так и в качестве компонента диагностического анализа.

Таким образом, дополнительная цель настоящего изобретения относится к антителу к CD123 согласно настоящему изобретению для применения в *in vivo* обнаружении экспрессии CD123 у субъекта или для применения *ex vivo* обнаружении экспрессии CD123 в биологическом образце от субъекта. В одном варианте осуществления указанное обнаружение предназначено, в частности, для:

- а) диагностики наличия рака у субъекта, или
- б) определения восприимчивости пациента, имеющего рак, к терапевтическому средству, нацеливаемому на CD123, в частности, антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка согласно настоящему изобретению, или
- с) отслеживания эффективности терапии рака, направленной на CD123, или обнаружения рецидива рака после терапии рака, направленной на CD123, в частности, в случае терапии с помощью антитела к CD123 или антителоподобного связывающего белка согласно настоящему изобретению; путем обнаружения экспрессии поверхностного белка CD123 на опухолевых клетках.

В варианте осуществления антитело предусмотрено для применения *in vitro* или *ex vivo*. Например, CD123 обнаруживают *in vitro* или *ex vivo* в биологическом образце, полученном от субъекта, с применением антитела к CD123 по настоящему изобретению. Применение согласно настоящему изобретению также может представлять собой *in vivo* применение. Например, антитело к CD123 или антителоподобный связывающий белок согласно настоящему изобретению вводят субъекту и комплексы антитело-клетки обнаруживают и/или оценивают количественно, при этом обнаружение указанных комплексов служит признаком рака.

Настоящее изобретение дополнительно относится к *in vitro* или *ex vivo* способу обнаружения наличия рака у субъекта, включающему стадии, состоящие из:

- (а) приведения биологического образца от субъекта в контакт с антителом к CD123 согласно настоящему изобретению, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом;
- (б) измерения уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,
- (с) обнаружения наличия рака путем сравнения измеренного уровня связавшегося антитела с контролем, при этом повышенный уровень связавшегося антитела по сравнению с контролем служит признаком рака.

Настоящее изобретение также относится к *in vitro* или *ex vivo* способу определения восприимчивости пациента, имеющего рак, к терапевтическому средству, нацеливаемому на CD123, в частности, к антителу к CD123 или антителоподобному связывающему белку согласно настоящему изобретению, причем способ включает стадии, состоящие из:

- (а) приведения биологического образца от пациента, имеющего рак, в контакт с антителом к CD123 согласно настоящему изобретению, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом;
- (б) измерения уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,
- (с) сравнения измеренного уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, с уровнем антитела, связавшегося с контролем;

где повышенный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем служит признаком того, что пациент является восприимчивым к терапевтическому средству, нацеливаемому по меньшей мере на CD123.

В вышеуказанных способах указанный контроль может представлять собой нормальный, не содержащий раковых клеток биологический образец того же типа, или эталонное значение, определенное типичное значение уровня связывания антитела в нормальном биологическом образце того же типа.

В варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению пригодно в диагностике гемобластозов, ассоциированных с экспрессией CD123, включая типы лейкозов (такие как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, злокачественный ретикулоэндотелиоз и

миелодиспластический синдром) и злокачественные лимфопролиферативные состояния, новообразование из бластных плазматоидных дендритных клеток (BPDCN), системный мастоцитоз, включая типы лимфомы (такие как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и мелкоклеточная и крупноклеточная фолликулярная лимфома).

Настоящее изобретение дополнительно относится к *in vitro* или *ex vivo* способу отслеживания эффективности терапии рака, направленной на CD123, включающему стадии, состоящие из:

(a) приведения биологического образца от субъекта, проходящего терапию рака, направленную на CD123, в контакт с антителом к CD123 или антителоподобным связывающим белком согласно настоящему изобретению, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом;

(b) измерения уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,

(c) сравнения измеренного уровня связавшегося антитела с уровнем антитела, связавшегося с контролем;

где сниженный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем служит признаком эффективности указанной терапии рака, направленной на CD123.

В указанном способе повышенный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем служит признаком неэффективности указанной терапии рака, направленной на CD123.

Указанный контроль представляет собой, в частности, биологический образец того же типа, что и биологический образец, предоставленный для анализа, но который был получен от субъекта ранее по времени, в ходе терапии рака, направленной на CD123.

Настоящее изобретение дополнительно относится к *in vitro* или *ex vivo* способу обнаружения рецидива рака после терапии рака, направленной на CD123, включающему стадии, состоящие из:

(a) приведения биологического образца от субъекта, закончившего терапию рака, направленную на CD123, в контакт с антителом к CD123 или антителоподобным связывающим белком согласно настоящему изобретению, в частности, в условиях, подходящих для того, чтобы антитело образовало комплексы с указанным биологическим образцом;

(b) измерения уровня антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом,

(c) сравнения измеренного уровня связавшегося антитела с уровнем антитела, связавшегося с контролем;

где повышенный уровень антитела, связавшегося с указанным биологическим образцом, по сравнению с контролем служит признаком рецидива рака после терапии рака, направленной на CD123.

Указанный контроль представляет собой, в частности, биологический образец того же типа, что и биологический образец, предоставленный для анализа, но который был получен от субъекта ранее по времени, в момент завершения или после завершения терапии рака, направленной на CD123.

Указанная терапия рака, направленная на CD123, представляет собой, в частности, терапию с применением антитела к CD123, или антителоподобного связывающего белка, или иммуноконъюгата согласно настоящему изобретению. Указанная терапия рака, направленная на CD123, нацелена на рак, экспрессирующий CD123, в частности, гемобластоз, ассоциированный с экспрессией CD123, включая типы лейкоза (такие как острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, злокачественный ретикулоэндотелиоз и миелодиспластический синдром) и

злокачественные лимфопролиферативные состояния, новообразование из бластных плазматоидных дендритных клеток (BPDCN), системный мастоцитоз, включая типы лимфомы (такие как множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Беркитта и мелкоклеточная и крупноклеточная фолликулярная лимфома).

В варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению является меченным обнаруживаемой молекулой или веществом, таким как флуоресцентная молекула, радиоактивная молекула или любая другая метка, известная тем, что она обеспечивает (либо непосредственно, либо опосредованно) сигнал.

Как используется в данном документе, термин "меченое", в отношении антитела к CD123 согласно настоящему изобретению, подразумевается как охватывающий прямое мечение антитела к CD123 путем

связывания (т.е. физического соединения) обнаруживаемого вещества, такого как радиоактивное средство или флуорофор (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), или фикоэритрин (PE), или индоцианин (Cy5)) с полипептидом, а также не прямое мечение полипептида вследствие способности реагировать с обнаруживаемым веществом.

В дополнительном варианте осуществления антитело к CD123 по настоящему изобретению является меченным радиоактивной молекулой с помощью любого способа, известного из уровня техники. Например, радиоактивные молекулы включают без ограничений радиоактивные атомы для сцинтиграфических исследований, такие как I^{123} , I^{124} , In^{111} , Re^{186} , Re^{188} , Tc^{99} . В одном примере полипептиды по настоящему изобретению также являются меченными с помощью спиновой метки для визуализации посредством ядерного магнитного резонанса (NMR) (также известного как магнитно-резонансная томография, MRI), такой как йод-123, индий-111, фтор-19, углерод-13, азот-15, кислород-17, гадолиний, марганец или железо.

"Биологический образец" охватывает множество типов образцов, получаемых от субъекта, и его можно использовать в диагностическом или мониторинговом анализе. Биологические образцы включают без ограничения кровь и другие жидкие образцы биологического происхождения, образцы плотных тканей, такие как биоптат, или тканевые культуры, или клетки, полученные из них, и их потомство. Следовательно, биологические образцы охватывают клинические образцы, клетки в культуре, супернатанты клеток, клеточные лизаты, сыворотку крови, плазму крови, биологические жидкости и тканевые образцы, в частности, образец опухоли.

Настоящее изобретение также относится к *in vivo* способу обнаружения наличия рака у субъекта, включающему стадии, состоящие из:

- a) введения антитела согласно настоящему изобретению, которое является меченным детектируемой меткой, пациенту;
- b) обнаружение локализации указанного меченного детектируемой меткой антитела в пациенте путем визуализации.

В одном варианте осуществления антитела по настоящему изобретению применимы для определения стадии рака (например, при визуализации с применением радиоактивных изотопов). Их применяют, например, отдельно или в комбинации с другими маркерами рака.

Термины "обнаружение" или "обнаруженный", как используется в данном документе, включают качественное и/или количественное обнаружение (измерение уровней) с привязкой к контролю или без такой привязки.

В контексте настоящего изобретения термин "постановка диагноза", как используется в данном документе, означает определение природы медицинского состояния, предназначенное для идентификации патологии, которая негативно воздействует на субъекта на основании целого ряда собранных данных.

В указанном способе рак представляет собой рак, при котором экспрессируется CD123, определяемый выше.

Наборы.

Наконец, в настоящем изобретении также предусмотрены наборы, содержащие по меньшей мере одно антитело к CD3, по меньшей мере одно антитело к CD123 или по меньшей мере один антителоподобный связывающий белок по настоящему изобретению. Наборы, содержащие антитела к CD123 или антитела к CD3 по настоящему изобретению, находят применение в обнаружении поверхностного белка CD123 или CD3 или в терапевтических, или в диагностических анализах. Наборы по настоящему изобретению могут содержать полипептид или антитело к CD3, по меньшей мере одно антитело к CD123 или по меньшей мере один антителоподобный связывающий белок, связанные с твердой подложкой, например, планшетом для культивирования тканей или гранулами (например, гранулами сефарозы). Могут предусматриваться наборы, которые содержат антитела для обнаружения и количественной оценки поверхностного белка CD123 или CD3 *in vitro*, например, в анализе ELISA или при вестерн-блоттинге. В одном варианте осуществления указанное антитело применимо для обнаружения и обеспечивается меткой, такой как флуоресцентная или радиоактивная метка.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение охватывает наборы для получения единицы для однократного приема дозы. Каждый из наборов может содержать как первый контейнер с высушенным белком, так и второй контейнер с водным составом. В объем настоящего изобретения также включены наборы, содержащие одно- и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

На протяжении настоящей заявки термин "содержащий" следует интерпретировать как охватывающий все конкретно упомянутые признаки, а также необязательные, дополнительные, неопределенные признаки. Как используется в данном документе, применение термина "содержащий" также раскрывает вариант осуществления, в котором не присутствуют никакие признаки, за исключением специально упомянутых признаков (т.е. "состоящий из"). Кроме того применение формы единственного числа не исключает множественного числа. Сам по себе тот факт, что определенные меры излагаются во взаимозависимых зависимых пунктах формулы изобретения, не указывает на то, что комбинация этих мер не может применяться как преимущество.

Настоящее изобретение теперь будет описано более подробно со ссылкой на следующие фигуры и примеры. Все публикации и патентные документы, процитированные в данном документе, тем самым включены посредством ссылки. В то время как настоящее изобретение было проиллюстрировано и подробно описано в вышеизложенном описании, примеры следует считать иллюстративными или приводимыми в качестве примера, а не ограничивающими.

Краткое описание последовательностей

Под SEQ ID NO: 1 показана аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD3ε человека, включая сигнальный пептид, доступная из базы данных Uniprot под номером доступа P07766.

Под SEQ ID NO: 2 показана аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD3ε *Macaca fascicularis*, включая сигнальный пептид, доступная из базы данных Uniprot под номером доступа Q95LI5.

Под SEQ ID NO: 3 показана аминокислотная последовательность слияния, содержащего Fc и зрелый CD3ε человека с меткой His, которое содержит аминокислоты 23-126 из полноразмерного белка CD3ε человека дикого типа.

Под SEQ ID NO: 4 показана аминокислотная последовательность слияния, содержащего Fc и зрелый CD3ε *Macaca fascicularis*, которое содержит аминокислоты 23-117 полноразмерного белка CD3ε *Macaca fascicularis* дикого типа (SEQ ID NO:2), содержащего одну замену Ala на Val в аминокислотном положении 35 по сравнению с аминокислотным положением 57 последовательности дикого типа.

Под SEQ ID NO: 5 показана аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела, называемого "20G6-F3".

Под SEQ ID NO: 6, 7 и 8 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антитела, называемого "20G6-F3".

Под SEQ ID NO: 9 показана аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела, называемого "20G6-F3".

Под SEQ ID NO: 10 показана аминокислотная последовательность CDR1-L антител, называемых "20G6-F3", "11D7-C3", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "18G9-H11", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "8C2-F7", "20E5-F10" и "3H6-D2".

Под SEQ ID NO: 11 показана аминокислотная последовательность CDR3-L антител, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "10F4-C10", "4E7-C9", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "20E5-F10" и "3H6-D2".

Под SEQ ID NO: 12 показана аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела, называемого "4B4-D7".

Под SEQ ID NO: 13 показана аминокислотная последовательность CDR1-H антител, называемых "4B4-D7", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "10F4-C10", "18G9-H11", "4E7-C9", "11F3-B9", "16F8-A7", "11F9-F8", "20B5-F10" и "3H6-D2".

Под SEQ ID NO: 14 и 15 показаны аминокислотные последовательности CDR2-H и CDR3-H антитела, называемого "4B4-D7".

Под SEQ ID NO: 16 показана аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела, называемого "4B4-D7".

Под SEQ ID NO: 17 показана аминокислотная последовательность CDR1-L антител, называемых "4B4-D7", "11H3-E5" и "11F3-B9".

Под SEQ ID NO: 18 показана аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела, называемого "4E7-C9".

Под SEQ ID NO: 19 показана аминокислотная последовательность CDR2-H антител, называемых "4E7-C9", "18F5-H10", "20E5-F10" и "3H6-D2".

Под SEQ ID NO: 20 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела, называемого "4E7-C9".

Под SEQ ID NO: 21 показана аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела, называемого "4E7-C9".

Под SEQ ID NO: 22 показана аминокислотная последовательность CDR1-H антитела, называемого "4E7-C9".

Под SEQ ID NO: 23 показана аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи антитела, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 24 показана аминокислотная последовательность CDR1-H антитела, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 25 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 26 показана аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи антитела, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 27 показана аминокислотная последовательность CDR1-L антитела к CD3, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 28 показана аминокислотная последовательность CDR3-L антител к CD3, называемых "18F5-H10", "11D7-C3", "1E6-C9" и "10E6-G6".

Под SEQ ID NO: 29 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "12D2-E5".

Под SEQ ID NO: 30 и 31 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR2-H антитела к CD3, называемого "12D2-E5".

Под SEQ ID NO: 32 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антител к CD3, называемых "12D2-E5" и "3G5-E10".

Под SEQ ID NO: 33 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "12D2-E5".

Под SEQ ID NO: 34 и 35 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "12D2-E5".

Под SEQ ID NO: 36 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "11D7-C3".

Под SEQ ID NO: 37 показана аминокислотная последовательность CDR2-H антител к CD3, называемых "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "18G9-H11", "11F3-B9", "16F8-A7", "11F9-F8" и "20B5-F10".

Под SEQ ID NO: 38 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела к CD3, называемого "11D7-C3".

Под SEQ ID NO: 39 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "11D7-C3".

Под SEQ ID NO: 40 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "11H3-E5".

Под SEQ ID NO: 41 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела к CD3, называемого "11H3-E5".

Под SEQ ID NO: 42 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "11H3-E5".

Под SEQ ID NO: 43 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "13H2-C2".

Под SEQ ID NO: 44 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела к CD3, называемого "13H2-C2".

Под SEQ ID NO: 45 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "13H2-C2".

Под SEQ ID NO: 46 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антител к CD3, называемых "13C1-F6" и "11F9-F8".

Под SEQ ID NO: 47 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антител к CD3, называемых "13C1-F6", "10E6-G6" и "11F9-F8".

Под SEQ ID NO: 48 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "13H2-C2".

Под SEQ ID NO: 49 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "18H11-F10".

Под SEQ ID NO: 50, 51 и 52 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "18H11-F10".

Под SEQ ID NO: 53 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "18H11-F10".

Под SEQ ID NO: 54 и 55 показаны аминокислотные последовательности CDR1-L и CDR3-L антитела к CD3, называемого "18H11-F10".

Под SEQ ID NO: 56 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "1E6-C9".

Под SEQ ID NO: 57 и 58 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "1E6-C9".

Под SEQ ID NO: 59 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "1E6-C9".

Под SEQ ID NO: 60 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "10F4-C10".

Под SEQ ID NO: 61 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела к CD3, называемого "10F4-C10".

Под SEQ ID NO: 62 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "10F4-C10".

Под SEQ ID NO: 63 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "10E6-G6".

Под SEQ ID NO: 64 и 65 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR2-H анти-

тела к CD3, называемого "10E6-G6".

Под SEQ ID NO: 66 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "10E6-G6".

Под SEQ ID NO: 67 показана аминокислотная последовательность CDR1-L антитела к CD3, называемого "10E6-G6".

Под SEQ ID NO: 68 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "18G9-H11".

Под SEQ ID NO: 69 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антитела к CD3, называемого "18G9-H11".

Под SEQ ID NO: 70 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "18G9-H11".

Под SEQ ID NO: 71 показана аминокислотная последовательность CDR3-L антитела к CD3, называемого "18G9-H11".

Под SEQ ID NO: 72 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "11F3-B9".

Под SEQ ID NO: 73 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "11F3-B9".

Под SEQ ID NO: 74 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "12G3-E8".

Под SEQ ID NO: 75, 76 и 77 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "12G3-E8".

Под SEQ ID NO: 78 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "12G3-E8".

Под SEQ ID NO: 79 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "5B1-G2".

Под SEQ ID NO: 80 и 81 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "5B1-G2".

Под SEQ ID NO: 82 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "5B1-G2".

Под SEQ ID NO: 83 показана аминокислотная последовательность части переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "16F8-A7".

Под SEQ ID NO: 84 показана аминокислотная последовательность CDR3-H антител к CD3, называемых "16F8-A7" и "11F3-B9".

Под SEQ ID NO: 85 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "16F8-A7".

Под SEQ ID NO: 86 показана аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD3δ человека, включая сигнальный пептид, доступная из базы данных Uniprot под номером доступа P04234.

Под SEQ ID NO: 87 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "11F9-F8".

Под SEQ ID NO: 88 показана аминокислотная последовательность CDR3-L антитела к CD3, называемого "11F9-F8".

Под SEQ ID NO: 89 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "3G5-E10".

Под SEQ ID NO: 90 и 91 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR2-H антитела к CD3, называемого "3G5-E10".

Под SEQ ID NO: 92 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "3G5-E10".

Под SEQ ID NO: 93 и 94 показаны последовательности CDR1-L и CDR3-L антитела к CD3, называемого "3G5-E10".

Под SEQ ID NO: 95 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "9D7-F3".

Под SEQ ID NO: 96, 97 и 98 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "9D7-F3".

Под SEQ ID NO: 99 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела к CD3, называемого "9D7-F3".

Под SEQ ID NO: 100 и 101 показаны аминокислотные последовательности CDR1-L и CDR3-L антител к CD3, называемых "9D7-F3" и "6C9-C9".

Под SEQ ID NO: 102 показана аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела к CD3, называемого "8C2-F7".

Под SEQ ID NO: 103, 104 и 105 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антитела к CD3, называемого "8C2-F7".

Под SEQ ID NO: 106 показана аминокислотная последовательность переменного домена легкой

манизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 176 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH6Bmodif2, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 177 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH6Amodif1, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 178 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH6Amodif2, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 179 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH6Amodif3, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 180 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH6C, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 181 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH6D, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 182 показана аминокислотная последовательность варианта VL, D7-VK3mut, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 183 показана аминокислотная последовательность варианта VH, D7-VH1mut, гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 184 показана аминокислотная последовательность CDR1-L вариантов VL1B, VL2B, VL1Cmodif3 и VL2F гуманизированного антитела к CD3 "4B4".

Под SEQ ID NO: 185 показана аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD3γ человека, включая сигнальный пептид, доступная из базы данных Uniprot под номером доступа P09693.

Под SEQ ID NO: 186 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "20G6-F3".

Под SEQ ID NO: 187 показана аминокислотная последовательность легкой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "20G6-F3".

Под SEQ ID NO: 188 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "4E7-C9".

Под SEQ ID NO: 189 показана аминокислотная последовательность легкой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "4E7-C9".

Под SEQ ID NO: 190 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "4B4-D7".

Под SEQ ID NO: 191 показана аминокислотная последовательность легкой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "4B4-D7".

Под SEQ ID NO: 192 показана аминокислотная последовательность тяжелой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 193 показана аминокислотная последовательность легкой цепи Fab из антитела к CD3, называемого "18F5-H10".

Под SEQ ID NO: 194 показана аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD123 человека, включая сигнальный пептид, доступная из базы данных NCBI под номером доступа NP_002174.1 и из базы данных Uniprot под номером доступа P26951.

Под SEQ ID NO: 195 показана аминокислотная последовательность полноразмерного белка CD123 *Macaca fascicularis*, включая сигнальный пептид, доступная из базы данных GenBank под EHH61867.1 и базы данных Uniprot под G8F3K3.

Под SEQ ID NO: 196 показана аминокислотная последовательность слияния, содержащего Fc и зрелый CD123 человека с меткой Strep-II, которое содержит аминокислоты 22-305 полноразмерного белка CD123 человека (SEQ ID NO: 194).

Под SEQ ID NO: 197 показана аминокислотная последовательность слияния, содержащего Fc и зрелый CD123 *Macaca fascicularis* с меткой Strep-II, которое содержит аминокислоты 22-305 полноразмерного белка CD123 *Macaca fascicularis* (SEQ ID NO: 195).

Под SEQ ID NO: 198 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи антитела к CD123, называемого "1E1-G5".

Под SEQ ID NO: 199 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H антител к CD123, называемых "1E1-G5" и "8B11-B7".

Под SEQ ID NO: 200 показаны аминокислотные последовательности CDR2-H антител к CD123, называемых "1E1-G5" и "6D6-B8".

Под SEQ ID NO: 201 показаны аминокислотные последовательности CDR3-H антител к CD123, называемых "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7" и "9F6-G3".

Под SEQ ID NO: 202 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи антитела к CD123, называемого "1E1-G5".

Под SEQ ID NO: 203 и 204 показаны аминокислотные последовательности CDR1-L и CDR3-L антитела к CD123, называемого "1E1-G5".

Под SEQ ID NO: 205 показана аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой

зированной антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 292 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1A, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 293 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1B, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 294 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1C, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 295 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1D, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 296 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1E, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 297 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1F, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 298 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1G, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 299 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1Fm1, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 300 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL1Fm2, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 301 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH2A, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 302 показана аминокислотная последовательность варианта VH, VH3A, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 303 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL2A, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 304 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL2Am1, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 305 показана аминокислотная последовательность варианта VL, VL2Am2, гуманизированного антитела к CD123 "3E3".

Под SEQ ID NO: 306 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле I из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab "7G3×20G6".

Под SEQ ID NO: 307 показана аминокислотная последовательность линкера L1 из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3" и CODV-Fab "hz20G6×7G3-TL4".

Под SEQ ID NO: 308 показана аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи 7G3, представляющая собой домен V_{D1} или V_{D2} из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4" и CODV-Fab "hz20G6×7G3-TL4".

Под SEQ ID NO: 309 показана аминокислотная последовательность линкера L2 из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3" и CODV-Fab "hz20G6×7G3-TL4".

Под SEQ ID NO: 310 показана аминокислотная последовательность CL из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4" и "hz4B4×3E3".

Под SEQ ID NO: 311 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле II из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab "7G3×20G6".

Под SEQ ID NO: 312 показана аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи 7G3, представляющая собой домен V_{H1} или V_{H2} из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4" и CODV-Fab "hz20G6×7G3-TL4".

Под SEQ ID NO: 313 показана аминокислотная последовательность C_{H1} из антителоподобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3".

Под SEQ ID NO: 314 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле I из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab "7G3×4E7".

Под SEQ ID NO: 315 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле II из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab "7G3×4E7".

Под SEQ ID NO: 316 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле I из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab "7G3×4B4".

Под SEQ ID NO: 317 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле

[illegible]

Под SEQ ID NO: 343 показана консенсусная последовательность CDR1-L антител к CD123, "1E1-G5", "6D6-B8", "8B11-B7", "9F6-G3", на основании выравнивания последовательностей.

Под SEQ ID NO: 344 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 345 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 346 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Thr-Val-Ala-Ala-Pro).

Под SEQ ID NO: 347 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gln-Pro-Lys-Ala-Ala).

Под SEQ ID NO: 348 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gln-Arg-Ile-Glu-Gly).

Под SEQ ID NO: 349 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser).

Под SEQ ID NO: 350 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Ala-Ser-Thr-Lys-Gly-Pro-Ser).

Под SEQ ID NO: 351 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (His-Ile-Asp-Ser-Pro-Asn-Lys).

Под SEQ ID NO: 352 показаны аминокислотная последовательность линкерной последовательности и последовательность метки His, добавленные на С-конце полипептида согласно формуле II из антитело-подобных связывающих белков, называемых CODV-Fab "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4", "7G3×18F5", "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4" и "hz4B4×3E3", соответствующие последовательности шарнира и метке His, используемым, например, для очистки.

Под SEQ ID NO: 353 показана аминокислотная последовательность CDR2-H варианта антитела к CD123, называемого "3E3".

Под SEQ ID NO: 354 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 355 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Ser-Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 356 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 357 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 358 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser).

Под SEQ ID NO: 359 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Lys-Thr-His-Thr).

Под SEQ ID NO: 360 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Lys-Thr-His-Thr-Ser).

Под SEQ ID NO: 361 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser).

Под SEQ ID NO: 362 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro).

Под SEQ ID NO: 363 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro).

Под SEQ ID NO: 364 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro).

Под SEQ ID NO: 365 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser).

Под SEQ ID NO: 366 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser).

Под SEQ ID NO: 367 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro).

Под SEQ ID NO: 368 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro).

Под SEQ ID NO: 369 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly).

Под SEQ ID NO: 370 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly).

Под SEQ ID NO: 371 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly).

Под SEQ ID NO: 372 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly).

Под SEQ ID NO: 373 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly).

Под SEQ ID NO: 374 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Gly-Glu-Pro-Lys-Ser-Asp-Lys-Thr-His-Thr-Ser-Pro-Pro-Ser-Pro-Gly-Gly-Gly).

Под SEQ ID NO: 375, 376 и 377 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H, CDR2-H и CDR3-H антитела, называемого "7G3".

Под SEQ ID NO: 378 и 379 показана аминокислотная последовательность CDR1-L и CDR3-L антитела, называемого "7G3".

Под SEQ ID NO: 380 показана аминокислотная последовательность варианта варибельного домена тяжелой цепи гуманизированного антитела, называемого "7G3".

Под SEQ ID NO: 381 и 382 показаны аминокислотные последовательности CDR1-H и CDR3-H гуманизированного антитела, называемого "7G3".

Под SEQ ID NO: 383 показана аминокислотная последовательность дополнительного варианта варибельного домена тяжелой цепи гуманизированного антитела, называемого "7G3".

Под SEQ ID NO: 384 показаны аминокислотные последовательности CDR2-H одного из гуманизированных антител, называемых "7G3".

Под SEQ ID NO: 385 показана аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи гуманизированного антитела, называемого "7G3".

Под SEQ ID NO: 386 показана аминокислотная последовательность SEQ ID NO:1, как представлено в WO 2015026892.

Под SEQ ID NO: 387 показана аминокислотная последовательность SEQ ID NO:3, как представлено в WO 2015026892.

Под SEQ ID NO: 388 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле I из антителоподобных связывающих белков, называемых Fab "hz20G6×hz7G3", CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3" и CODV-Fab-OL1a "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 389 показана аминокислотная последовательность линкерной последовательности (Gly-Gly-Ser-Gly-Ser-Ser-Gly-Ser-Gly-Gly).

Под SEQ ID NO: 390 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле II из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 391 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле IV из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 392 показана аминокислотная последовательность F_{c2}-области из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 393 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле IV из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 394 показана аминокислотная последовательность F_c-области из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3". Под SEQ ID NO: 395 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле II из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 396 показана аминокислотная последовательность F_c-области из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 397 показана аминокислотная последовательность F_c-stump (F_{c3}) из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 398 показана аминокислотная последовательность F_c-stump (F_{c3}) из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-OL1a "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 399 показана аминокислотная последовательность полипептида согласно формуле II из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-OL1a "hz20G6×hz7G3".

Под SEQ ID NO: 400 показана аминокислотная последовательность F_c-stump (F_{c3}) из антителоподобного связывающего белка, называемого CODV-Fab-OL1a "hz20G6×hz7G3".

Фигуры

Фиг. 1 - выравнивания последовательностей областей VH антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2".

Фиг. 2 - выравнивания последовательностей областей VL антител к CD3, называемых "20G6-F3", "4B4-D7", "4E7-C9", "18F5-H10", "11D7-C3", "11H3-E5", "13H2-C2", "13C1-F6", "1E6-C9", "10F4-C10", "10E6-G6", "18G9-H11", "11F3-B9", "12G3-E8", "5B1-G2", "16F8-A7", "11F9-F8", "20E5-F10", "20B5-F10", "3H6-D2".

Фиг. 3 - выравнивания последовательностей областей VH и VL антител к CD123, называемых "1E1-

G5", "6D6-B8", "8B11-B7", "9F6-G3".

Фиг. 4 - выравнивания последовательностей областей VH и VL антител к CD123, называемых "6C10-C4", "9B8-G6", "9D7-C8".

Фиг. 5 и 7 - IV введение полностью человеческого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3", каждые 3 дня, в присутствии Т-клеток человека подавляет рост опухоли Molm13 во всем теле при всех тестируемых дозах.

Фиг. 6 и 8 - IV введение полностью человеческого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3", каждые 3 дня, в присутствии Т-клеток человека сопряжено с регрессией опухоли в длинных костях при всех тестируемых дозах.

Фиг. 9 и 11 - IV введение полностью человеческого CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" в присутствии Т-клеток человека подавляет рост опухоли.

Фиг. 10 и 12 - IV введение полностью человеческого CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" в присутствии Т-клеток человека сопряжено с регрессией опухоли в длинных костях.

Фиг. 13 и 15 - CIP введение полностью человеческого CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" в присутствии Т-клеток человека подавляет рост опухоли во всем теле при дозировке, составляющей 0,13 нмоль/кг/день или выше.

Фиг. 14 и 16 - CIP введение полностью человеческого CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" в присутствии Т-клеток человека подавляет рост опухоли в длинных костях при дозировке, составляющей 0,13 нмоль/кг/день или выше.

Фиг. 17 - схематическое изображение структуры CODV-Ig, CODV-Fab-TL и CODV-Fab-OL (дополнительно показаны мутации LALA (если применяется Fc из остова IgG1) и мутации типа выступ-вопядину).

Примеры

Пример 1. Получение антител.

1.1. Конструирование плазмиды экспрессии для слияния hCD3ε/δ-hFc (CD3ed-Fc).

С применением кДНК-содержащих плазмид в качестве матрицы получали белки слияния, содержащие CD3ε и CDδ человека и *Macaca fascicularis*, как подробно описано в данном документе ниже, в рамке считывания с константной областью тяжелой цепи, включая шарнирную область, домены CH2 и CH3 иммуноглобулина IgG человека, дополнительно несущей метку 8 × His или Strep-II для необязательной тандемной очистки.

С применением геномной ДНК человека в качестве матрицы амплифицировали внеклеточные домены субъединиц CD3ε человека и CDδ человека, включая сигнальную последовательность. Полученные в результате амплифицированные, расщепленные и очищенные продукты ПЦР объединяли с помощью лигирующей ПЦР и лигировали в вектор экспрессии для млекопитающих pXL с помощью способа InFusion, используя сайты для NheI и HindIII. Каждую субъединицу клонировали в одну плазмиду. Последовательность полученного в результате белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD3ε человека с меткой His, раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 3. Аминокислоты 1-104 из SEQ ID NO: 3 соответствуют аминокислотам 23-126 полноразмерного белка CD3ε человека дикого типа (раскрыт в данном документе под SEQ ID NO: 1, доступной в базе данных Uniprot под номером доступа P07766) и, таким образом, внеклеточному домену CD3ε человека.

С применением геномной ДНК макака-крабоеда в качестве матрицы амплифицировали внеклеточные домены CD3ε и CD3δ *Macaca fascicularis*, включая сигнальную последовательность. Полученные в результате амплифицированные, расщепленные и очищенные продукты ПЦР объединяли с помощью лигирующей ПЦР и лигировали в вектор экспрессии для млекопитающих pXL с помощью способа InFusion, используя NheI и HindIII. Каждую субъединицу клонировали в одну плазмиду. Полученные в результате последовательности белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD3ε *Macaca fascicularis*, раскрыты под SEQ ID NO: 4. Аминокислоты 1-95 из SEQ ID NO: 3 соответствуют аминокислотам 23-117 полноразмерного белка CD3ε *Macaca fascicularis* и, таким образом, составляют внеклеточный домен полноразмерного CD3ε *Macaca fascicularis* дикого типа (раскрыт в данном документе под SEQ ID NO: 2, доступной в базе данных Uniprot под номером доступа Q95LI5). Клонированный белок слияния дополнительно содержит одну замену аланина на валин в аминокислотном положении 35 по сравнению с аминокислотным положением 57 последовательности дикого типа.

1.2. Экспрессия и очистка CD3ed-Fc человека и макака-крабоеда.

Клетки Freestyle HEK293, выращиваемые в виде суспензионной культуры в бессывороточной среде F17 (Life), временно трансфицировали плазмидой экспрессии. Совместную трансфекцию обеими плазмидами, представляющими субъединицу внеклеточного домена (ECD) CD3ε и CD3δ, выполняли с применением реагента для трансфекции Cellfectin (Life). Клетки культивировали при 37°C в течение 7 дней. Культуральный супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали путем центрифугирования и очищали от примесей путем фильтрации (0,22 мкм).

Для очистки варианты белка слияния, содержащего Fc, захватывали на матрице с белком A (GE) и

элюировали с помощью градиента pH. После доочистки белка с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) с применением Superdex 200 (GE) и конечной стадии концентрирования ультрафильтрацией белок применяли для дальнейших анализов.

Гетеродимер белка человека дополнительно наносили на колонку His-Trap (GE) после захвата на белке А и обессоливали. Элюированный белок наносили на колонку со стрептавидином (GE) и элюировали с помощью d-дестиобиотина перед конечной доочистки с помощью SEC с применением Superdex 200 (GE). Эту стратегию применяли для отделения гетеродимеров от гомодимеров.

1.3. Получение антител с перекрестной реактивностью к CD3 человека/макака-крабоведа кДНК CD3ε и CD3δ человека и *Macaca fascicularis* клонировали в проприетарные векторы для иммунизации от Aldevron (pB8 и VV8, соответственно) и применяли для генной иммунизации крыс. Крыс в группе иммунизации MR12-266 ("CD3-супо") сначала иммунизировали с помощью кДНК CD3ε и CD3δ человека, с последующими двумя дополнительными иммунизациями с помощью смеси кДНК CD3ε и CD3δ человека и *Macaca fascicularis*. Забор иммунной сыворотки проводили в день 24 протокола иммунизации, после 4 применений генной иммунизации (IS24d-4). Сыворотку, разведенную в PBS с 1% BSA, тестировали с помощью проточной цитометрии с применением клеток млекопитающих, временно трансфицированных целевыми кДНК в экспериментах совместной трансфекции для получения TCR-комплексов из CD3ε и CD3δ человека и *Macaca fascicularis*. Кроме того, иммунные сыворотки тестировали на следующих линиях клеток: Jurkat E6-1 (экспрессирующая TCR человека), Jurkat-RT-T3.5 (отрицательная в отношении TCR) и HSC-F макака-крабоведа (экспрессирующая TCR макака-крабоведа); при этом не была доступна линия клеток, отрицательная в отношении TCR макака-крабоведа. В качестве вторичного антитела применяли конъюгат антитела козы к IgG крысы с R-фикоэритрином (Southern Biotech, № 3030-09) при концентрации 10 мкг/мл.

Специфическую реактивность иммунной сыворотки, в частности в отношении клеток, трансфицированных комбинациями кДНК CD3ε и CD3δ, можно было обнаружить у иммунизированных животных в сравнении с клетками, трансфицированными нерелевантной кДНК. То же было действительным в тесте с TCR-положительной линией клеток Jurkat (E6-1) в сравнении с TCR-отрицательной линией клеток (RT-T3.5), при этом значительно более слабые сигналы, но все еще значимые сигналы, обнаружили на линии клеток HSC-F яванского макака (см. табл. 1).

Таблица 1. Обнаружение специфической реактивности иммунных сывороток в отношении TCR-комплекса у каждого животного с помощью проточной цитометрии. Данные представлены в виде геометрических средних значений относительной интенсивности флуоресценции (rfu)

		pXL-CD3ε- человека+pXL- CD3δ-человека	pXL-CD3ε- макака- крабоведа+pXL- CD3δ-макака- крабоведа	pB1_ нерелевантный	Jurkat- E6-1	Jurkat- RT-T3.5	HSC-F макака- крабоведа
	без первичного антитела	5	5	4	7	10	6
	ОКТ3	–	–	–	858	25	–
	FN18	–	–	4	7	10	1256
	Антитело мыши к НА	6	6	–	–	–	–
	Антитело крысы к тус	9	7	1033	10	14	9
<u>крыса</u> № 1	1:1000	290	273	5	186	36	55
	1:5000	79	86	5	65	21	20
крыса № 2	1:1000	499	401	5	390	55	75
	1:5000	147	110	4	126	28	25

крыса № 3	1:1000	239	247	5	108	30	31
	1:5000	89	92	4	32	17	9
крыса № 4	1:1000	280	283	5	176	37	73
	1:5000	97	110	4	55	22	23
крыса № 5	1:1000	208	137	4	99	31	11
	1:5000	61	65	4	47	19	7

Крыс в группе иммунизации MR12-265 ("CD3 человека") совместно иммунизировали с помощью кДНК CD3ε и CD3δ, человека, клонированных в соответствующие векторы экспрессии. Забор иммунной сыворотки проводили в день 24 протокола иммунизации, после 4 применений генной иммунизации (IS24d-4). Сыворотку, разведенную в PBS с1% BSA, тестировали с помощью проточной цитометрии с применением клеток млекопитающих, временно трансфицированных вышеупомянутыми целевыми кДНК в экспериментах совместной трансфекции для получения TCR-комплексов CD3ε и CD3δ человека и *Macaca fascicularis*. В качестве вторичного антитела применяли конъюгат антитела козы к IgG крысы с R-фикоэритрином (Southern Biotech, № 3030-09) при концентрации 10 мкг/мл. Кроме того, иммунные сыворотки тестировали на следующих линиях клеток: Jurkat E6-1 (экспрессирующая TCR человека), Jurkat-RT-T3.5 (отрицательная в отношении TCR) и HSC-F макака-крабоеда (экспрессирующая TCR макака-крабоеда); при этом не была доступна линия клеток, отрицательная в отношении TCR макака-крабоеда. В качестве вторичного антитела применяли конъюгат антитела козы к IgG крысы с R-фикоэритрином (Southern Biotech, № 3030-09) при концентрации 10 мкг/мл.

Специфическую реактивность иммунных сывороток, в частности в отношении клеток, трансфицированных комбинациями кДНК CD3ε и CD3δ, можно было обнаружить у иммунизированных животных при сравнении с клетками, трансфицированными нерелевантной кДНК. То же было действительным в тесте с TCR-положительной линией клеток Jurkat (E6-1) в сравнении с TCR-отрицательной линией клеток (RT-T3.5), но значительно более слабые сигналы (однако у положительных крыс все еще значимые) обнаружили у линии клеток HSC-F макака-крабоеда (см. табл. 2).

Таблица 2. Обнаружение специфической реактивности иммунных сывороток в отношении TCR-комплекса у каждого животного с помощью проточной цитометрии. Данные представлены в виде геометрических средних значений относительной интенсивности флуоресценции (rfu)

		pXL-CD3ε- человека+pXL- CD3d-человека	pXL-CD3ε- макака-крабоеда+pXL- CD3d-макака-крабоеда	pB1_ нерелевантный	Jurkat- E6-1	Jurkat- RT-T3.5	HSC-F макака- крабоеда
	без первичного антитела	5	5	4	7	10	6
	ОКТ3	-	-	-	858	25	-
	FN18	-	-	4	7	10	1256
	Антитело мыши к НА	6	6	-	-	-	-
	Антитело крысы к тус	9	7	1033	10	14	9
крыса № 1	1:1000	230	132	5	170	33	50
	1:5000	78	40	4	54	19	15
крыса № 2	1:1000	216	136	6	216	48	32
	1:5000	75	40	4	66	24	11

крыса № 3	1:1000	73	54	5	56	25	7
	1:5000	25	20	4	23	15	6
крыса № 4	1:1000	70	56	5	41	25	8
	1:5000	25	18	4	15	15	6
крыса № 5	1:1000	65	37	5	42	20	7
	1:5000	24	17	4	17	14	6

Крыс с положительными сыворотками умерщвляли и В-клетки сливали с клетками миеломы мыши. Полученные в результате гибридомы скринировали на клетках HEK293, трансфицированных плазмидами экспрессии CD3ε и CD3δ человека или макака-краббеда, на клетках Jurkat E6.1 (CD3+) и Jurkat T3.5 (CD3-) с помощью проточной цитометрии. Супернатант клонов гибридомы применяли для оценки с помощью поверхностного плазмонного резонанса кинетики реакции с комплексом CD3ε/δ человека и *M. fascicularis* методом одной точки путем фиксирования аналита при 25 нМ (данные представлены в табл. 3).

Таблица 3. Обнаружение специфической реактивности супернатантов различных клонов гибридомы с помощью проточной цитометрии и анализа Biacore. Супернатанты тестировали на различных линиях клеток (Jurkat E6-1, Jurkat-RT-T3.5 и HSC-F макака-краббеда). Анализ Biacore проводили в отношении комплексов CD3ε/d человека и макака-краббеда соответственно

ID образца	Biacore для CD3ε/δ человека [RU] при 25 нМ	Biacore для CD3ε/δ макака-краббеда [RU] при 25 нМ
3G5-E10	27	3
18G9-H11	7	-7
12D2-E5	27	5
6C9-C9	26	32
11F9-F8	11, 5	16
8H2-F3	32, 5	40
4B4-D7	11	14
4E7-C9	2, 5	10
13C1-F6	17	15, 5
11D7-C3	17	10
13H2-C3	16	7
10E6-G6	10, 5	0
12G3-E8	24	17
11F3-B9	22	17
20E3-B5	11	5

10F4-C10	22	27
11H3-E5	7	9
18F5-H10	n.a.	n.a.
18H11-F10	35	55
20E5-F10	12	8
ID образца	Biacore для CD3ε/δ человека [RU] при 25 нМ	Biacore для CD3ε/δ макака-крабоеда [RU] при 25 нМ
3H6-D2	9,5	7
8C2-F7	4,5	3
5B1-G2	1	0,5
7B7-F10	28	42
20B5-F10	1	9,5
16D3-E4	-2	-2
1E6-B8	n.a.	n.a.
16F8-A7	17,5	22,5
11A8-D6		
3E8-G1		
20G6-F3		
9D7-B5	n.a.	n.a.
9G5-G10		
17A11-D3		

Положительные клоны размножали и соответствующие кДНК переменных доменов тяжелой и легкой цепей выделяли с помощью RT-PCR. Последовательности VH и VL клонировали в векторы экспрессии в слиянии с одним из CH1, остоном IGHG1 или каппа-цепью человека, чтобы обеспечить экспрессию Fab-фрагментов, а также полных IgG.

1.4. Экспрессия IgG и Fab-фрагментов.

Плазмиды экспрессии, кодирующие тяжелую и легкую цепи IgG и Fab-фрагментов, размножали в NEB 10-бета E.coli (происходит от DH10B). Плазмиды, применяемые для трансфекции, получали из E.coli с применением набора Plasmid Plus от QIAGEN (№ по кат.: 12991).

Клетки HEK293-FS, выращиваемые в среде Freestyle (Invitrogen), трансфицировали с помощью указанных плазмид для LC и HC, кодирующих тяжелые цепи и легкие цепи, с применением реагента для трансфекции 293fectin (Invitrogen), как описано производителем. Клетки культивировали при 37°C во встряхивателе-инкубаторе Kuhner ISF1-X при 110 об/мин. с 8% CO₂. После 7 дней культивирования клетки удаляли путем центрифугирования, добавляли 10% об./об. 1M Tris-HCl, pH 8,0 и супернатант фильтровали через фильтр на горловине флакона с размером пор 0,2 мкм для удаления частиц. Конструкции CODV-IgG1 очищали с помощью аффинной хроматографии на колонках с белком A (HP-колонки HiTrap Protein A, GE Life Sciences). После элюирования из колонки с помощью 0,1M цитрата, pH 3,0, конструкции CODV-IgG1 обессоливали с применением колонок для обессоливания HiPrep 26/10, затем составляли в PBS (Gibco 14190-136).

Биспецифические конструкции CODV-Fab очищали с помощью высокоэффективных колонок His-Trap (GE Healthcare, № по кат.: 17-5248-02). После элюирования из колонки (элюирующий буфер: 20 mM фосфат натрия, 0,5M NaCl, 500 mM имидазола, pH 7,4) фракции, содержащие белок, объединяли и обессоливали с применением колонок для обессоливания HiPrep 26/10, затем составляли в PBS (Gibco 14190-136).

Для отделения мономеров от агрегатов выполняли стадию фракционирования высокого разрешения в PBS (Gibco 14190-136) для обеих конструкций, CODV-IgG и CODV-Fab-фрагмента с применением колонки на 320 мл HiLoad Superdex 200 26/60 (GE Healthcare, № по кат.: 29-9893-36). Фракции мономеров объединяли и концентрировали до 1 мг/мл с применением колонки для центрифугирования Vivaspin 20 (VS2002, Sartorius Stedim biotech) и фильтровали с применением мембраны с размером пор 0,22 мкм (шприцевые фильтры Millex® SLGV033RS).

Концентрацию белка определяли путем измерения поглощения при 280 нм. Каждую партию анализировали с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях для определения чистоты и молекулярной массы каждой субъединицы и мономера.

1.5. Оценка аффинности антител к CD3.

1.5.1. Оценка аффинности к обоим CD3ε/δ человека и *Macaca fascicularis*.

Аффинности связывания Fab или CODV-Fab, связывающих CD3, измеряли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением инструмента Biacore3000 (GE Healthcare). Буфер для анализа представлял собой HBS-EP (BR-1001-88, GE Healthcare). Захват белков слияния CD3ε/δ-Fc обеспечивали с применением набора для захвата человеческих антител (GE Healthcare). Захватывающее антитело связывали на чипах CM5 (BR-1001-88, GE Healthcare) до примерно 12000 RU с применением набора для аминного связывания (BR-100-50, GE Healthcare). Белки слияния CD3εδ-Fc захватывали при 10 мл/мин до примерно 70 RU с получением значений Rmax, составляющих 30 RU. Кинетику связывания с Fab или CODV-Fab к CD3 измеряли при 30 мкл/мин в течение 240 и 600 с для фазы ассоциации и диссоциации соответственно. Применяли двукратные разведения Fab от 3 до 400 нМ в буфере для анализа. Все концентрации Fab прогоняли в двух повторностях совместно с контролем буфером в двух повторностях для обеспечения двойного контроля. Регенерацию поверхности захвата обеспечивали с помощью 1-минутной инъекции раствора 3М MgCl₂ при скорости 30 мкл/мин. Для анализа данных применяли программное обеспечение BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare). Данные аппроксимировали в целом с помощью 1:1 модели Лэнгмюра с массообменом.

Измерение аффинности связывания IgG и белков CODV-Fc к CD3 осуществляли аналогично анализу связывания для Fab и CODV-Fab за исключением захватывающего антитела. В данном случае набор His Capture (28-9950-56, GE Healthcare) применяли для захвата белка CD3-Fc человека посредством метки His. Для анализа связывания CD3-Fc *Macaca fascicularis* в качестве захватывающего антитела применяли классическое антитело Strep-MAB (2-1507-001, IBA). В данном случае раствор для регенерации представлял собой 10 мМ глициновый буфер, pH 2,0.

Таблица 4. Аффинности выбранных антител к CD3 в отношении CD3ε/δ-комплексов человека и *Macaca fascicularis*, измеренные с помощью Biacore

CD3 εδ	Клон (Fab-фрагмент)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	Rmax (RU)	KD (М)	Chi ²	Соотношение KD (макак-крабод) /KD (человек)
человек	12D2-E5	5,4Е+06	6,2Е-03	35	1,2Е-09	0,34	4
макак-крабод	12D2-E5	Равновесное состояние	Равновесное состояние	8	4,8Е-09	0,129	
человек	10Е6-G6	1,4Е+05	2,0Е-03	37	1,4Е-08	0,218	1
макак-крабод	10Е6-G6	1,9Е+05	2,4Е-03	18	1,3Е-08	0,218	
человек	4Е7-С9	8,9Е+04	1,6Е-03	29	1,7Е-08	0,244	1
макак-крабод	4Е7-С9	9,8Е+04	1,5Е-03	20	1,5Е-08	0,232	
человек	12G3-E8	1,1Е+05	1,1Е-03	30	9,3Е-09	0,307	1
макак-крабод	12G3-E8	1,7Е+05	1,8Е-03	15	1,0Е-08	0,349	
человек	5B1-G2	6,0Е+04	3,9Е-04	36	6,5Е-09	0,218	1
макак-крабод	5B1-G2	3,4Е+04	1,5Е-04	20	4,3Е-09	2,1	
человек	18F5-H10	2,0Е+05	1,8Е-04	28	8,9Е-10	0,235	1
макак-крабод	18F5-H10	1,4Е+05	1,3Е-04	15	8,9Е-10	0,224	

человек	18G9-H11	2,5E+05	1,1E-03	31	4,4E-09	0,975	6
макак-крабоед	18G9-H11	5,1E+04	1,2E-03	18	2,4E-08	0,617	
человек	4B4-D7	1,1E+05	2,9E-03	22	2,7E-08	0,147	1
макак-крабоед	4B4-D7	1,1E+05	2,7E-03	12	2,4E-08	0,188	
человек	1E6-B8	9,3E+04	3,9E-03	26	4,1E-08	0,157	1
макак-крабоед	1E6-B8	1,0E+05	4,2E-03	15	4,2E-08	0,122	
человек	13H2-C3	1,7E+05	4,9E-03	20	2,9E-08	0,317	1
макак-крабоед	13H2-C3	1,8E+05	5,9E-03	12	3,2E-08	0,166	
человек	20G6-F3	3,5E+04	2,7E-04	21	7,7E-09	0,208	1
макак-крабоед	20G6-F3	2,7E+04	2,2E-04	15	8,2E-09	0,184	
человек	11F9-F8	7,7E+04	4,0E-04	22	5,2E-09	0,137	1
макак-крабоед	11F9-F8	8,3E+04	3,6E-04	13	4,4E-09	0,109	
человек	20E5-F10	9,9E+04	4,3E-04	25	4,3E-09	0,125	1
макак-крабоед	20E5-F10	1,2E+05	3,4E-04	14	2,9E-09	0,104	
человек	SP-34	1,1E+06	3,0E-03	34	2,7E-09	2,3E-01	5
макак-крабоед	SP-34	2,2E+05	2,8E-03	34	1,3E-08	4,7E-01	

SP-34 применяли в качестве IgG.

1.5.2. Связывание антител к CD3 с huCD3ε, huCD3δ и huCD3ε/δ, экспрессируемыми на поверхности клеток HEK293F, с помощью проточной цитометрии.

Для анализа связывания антител с CD3ε человека и CD3δ человека, экспрессируемыми на поверхности клеток, клетки HEK293F трансфицировали обеими конструкциями либо отдельно, либо в ходе совместной трансфекции, а сигналы измеряли с помощью проточной цитометрии. Для процедуры трансфекции применяли реагент для трансфекции FuGENE HD (Promega, № E2311) согласно протоколу производителя.

Клетки HEK293F высевали в среду Freestyle293 (Gibco) при плотности 6Е6 клеток на пробирку в 50-мл пробирки Cellstar Cellreactor с фильтром (Greiner bio-one). Трансфекции осуществляли в соответствии с протоколом FuGENE. Образование комплексов осуществляли в OptiMEM без фенолового красного (Gibco) при соотношении 3:1 (протокол для трансфекции клеток 293F, выращенных в 8000 мкл среды в колбах T-25 с применением соотношения FuGENE®HD:ДНК, составляющего 3,0:1, <http://www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/default.aspx>).

Клетки инкубировали на встряхивателе при 37°C и 5% CO₂. Через один-три дня после трансфекции клетки собирали и связывание антител анализировали с помощью проточной цитометрии.

Антитела для окрашивания распределяли в количестве 1 мкг в 50 мкл буфера для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) на лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one). Собранные трансфицированные клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания с FBS и добавляли к антителам из расчета 50 мкл на лунку. Клетки инкубировали при 4°C в темноте в течение 30 мин и дважды промывали. В каждую лунку добавляли 0,5 мкг вторичного антитела F(ab')₂ козы к IgG человека, конъюгированного с FITC (Beckman Coulter, № 732598), или F(ab')₂ козы к каппа-цепи человека, конъюгированного с PE (Southern Biotech, № 206209) соответственно в комбинации с 0,5 мкг 7-AAD в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS. Клетки инкубировали при 4°C в темноте в течение 15 мин и дважды промывали. Для измерения клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания с FBS. Клетки измеряли с применением MACSQuant (Miltenyi Biotec) или проточного цитометра LSRII

(BD) соответственно. Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю 7-AAD-отрицательных отдельных клеток, положительных в отношении окрашивания антителами (данные представлены в табл. 5).

1.5.3. Связывание Fab к CD3 с huCD3ε/δ и huCD3ε/γ, измеренное с помощью SPR.

Связывание тестировали с помощью SPR с применением инструмента Biacore3000, используемого с буфером HBS-EP.

Рекомбинантные белки huCD3 (ε/δ (PB01226), ε/γ (PB01225)) захватывали при 10 мкл/мин посредством метки Fc с помощью захватывающего антитела к Fc человека MAB1302 (Millipore), иммобилизованного на сенсорном чипе CM5. Fab к CD3 применяли в качестве аналитов при 100 нМ с временем ассоциации и диссоциации, составляющим 240 и 300 с соответственно, при 30 мкл/мин. После каждого цикла поверхности регенерировали с помощью пропускания в течение 2 мин 10 мМ глицинового буфера, pH 2,5.

Когда на поверхности клетки HEK293F экспрессировался только huCD3δ, никаких сигналов нельзя было обнаружить с помощью проточной цитометрии. Напротив, почти все антитела могли связываться с клетками, трансфицированными исключительно huCD3ε, или в случае совместной трансфекции с huCD3δ, что указывает на то, что huCD3ε необходим в качестве эпитопа. В анализах Biacore было показано, что связывание с huCD3ε не зависит от того, применяли ли цепь δ или γ для рекомбинантного белка, что дает основание полагать, что huCD3ε является достаточным в качестве антигена. В виде исключения, антитело 12D2 связывается с huCD3ε, только если присутствует совместная цепь. Это может объясняться непрямым эффектом совместной экспрессии цепи g или d в отношении конформационной структуры белка, необходимой для выставления эпитопа для этого антитела. Такой же эффект был показан для опубликованного антитела ОКТ3. Описано, что это антитело взаимодействует с конформационным эпитопом, образуемым после ассоциации huCD3ε с huCD3δ или γ соответственно (Salmeron et al., 1991, The Journal of Immunology). Также было показано, что оно связывается с исключительно субъединицей huCD3ε (Kjer-Nielsen et al., 2004, PNAS). Вследствие аналогичного поведения 12D2 и ОКТ3 взаимодействие с huCD3ε является допустимым для 12D2. Учитывая все, по-видимому, huCD3ε является антигенной структурой для всех анализируемых антител (данные представлены в табл. 5).

Таблица 5. Аффинности выбранных антител к CD3 по отношению к huCD3δ, huCD3ε, huCD3ε/δ и huCD3ε/γ-комплексам, измеренные с помощью проточной цитометрии и Biacore

Клон	Проточная цитометрия			Biacore	
	% трансфицированных клеток, положительных в отношении антитела (n=3-6)			RU для связывания Fab при 100 нМ	
	huCD3δ	huCD3ε (+/- SEM)	huCD3ε/δ (+/-SEM)	huCD3ε/δ	huCD3ε/γ
10E6	n.b.	96,3 +/- 2,2	93,3 +/- 4,7	11	8
11F9	n.b.	97,0 +/- 1,5	96,0 +/- 2,5	10	7
12D2	n.b.	n.b.	96,3 +/- 2,2	11	5
12G3	n.b.	96,3 +/- 2,2	96,7 +/- 1,9	10	7
13H2	n.b.	93,3 +/- 3,3	93,0 +/- 4,2	9	6
18F5	n.b.	70,6 +/- 11,9	70,4 +/- 9,9	13	7
18G9	n.b.	95,0 +/- 2,5	97,0 +/- 1,5	10	3
1E6	n.b.	87,7 +/- 4,4	91,7 +/- 4,9	10	7
20E5	n.b.	96,7 +/- 1,9	95,3 +/- 3,2	11	8
20G6	n.b.	68,6 +/- 12,1	67,4 +/- 10,4	7	4
4B4	n.b.	71,5 +/- 10,8	69,5 +/- 8,7	11	3
4E7	n.b.	69,0 +/- 12,3	66,4 +/- 10,0	8	6
5B1	n.b.	97,0 +/- 1,5	97,0 +/- 1,5	10	7
ОКТ3	n.b.	n.b.	70,2 +/- 9,6	4	3

n.b. - отсутствие связывания (<20% связывания huCD3ε+huCD3d).

1.6. Связывание CD3-Fab с Т-клетками человека.

Способность связывания CD3-Fab определяли с помощью проточной цитометрии. Первичные Т-клетки человека применяли в качестве целевых клеток. В связи с этим мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из 200 мл периферической крови здоровых доноров, обработанной EDTA, с помощью центрифугирования в градиенте плотности фикола. 15 мл Histopaque (Sigma-Aldrich) предварительно загружали в 50-мл пробирку Leucoserp (Greiner bio-one). Кровь разводили буфером для промывки autoMACS+1% BSA (Miltenyi Biotec) и загружали на мембрану в общей сложности десятки подготовленных пробирок. Пробирки центрифугировали без торможения в течение 10 мин при 1000 × g. PBMC собирали и промывали с помощью буфера для промывки autoMACS+1% BSA трижды. В конце концов, PBMC ресуспендировали в буфере для прогона autoMACS (Miltenyi Biotec) для выделения Т-лимфоцитов с помощью технологии autoMACSpro с применением набора для выделения всех Т-клеток

(Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту выделенных Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии MACSQuant с применением 7-цветного набора для иммунофенотипирования человека (Miltenyi Biotec). Выделенные Т-клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) и по 1Е5 клеток в 100 мкл на лунку высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one). Fab-антитела серийно разводили 1:3 в PBS (Invitrogen) и по 5 мкл каждого добавляли к клеткам при конечной максимальной концентрации, составляющей 30000 нг/мл. Анализируемую смесь инкубировали в течение 45 мин при 4°C. Клетки дважды промывали буфером для окрашивания с FBS и в каждую лунку добавляли по 1 мкг вторичного антитела F(ab')₂ козы к каппа-цепи человека, конъюгированного с FITC (Beckman Coulter, № 732621), в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку. Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 мин при 4°C и после этого дважды промывали. Клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку и измеряли с применением проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec) или LSRII (BD). Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю клеток, положительных в отношении связывания антителом. Клетки, обработанные только вторичным, а не первичным антителом, применяли для гейтирования. Кривые EC₅₀ рассчитывали с помощью XLfit (Algorithm 205), значения EC₅₀ рассчитывали как точку перегиба наклона кривой (данные показаны в табл. 6).

Таблица 6. Аффинности CD3-Fab к Т-клеткам человека, измеренные с помощью проточной цитометрии. Представлены средние значения EC₅₀, рассчитанные на основании кривых

Антитело	Связывание с Т-клетками человека, средние значения EC ₅₀ [нМ] +/- SEM		
12D2-E5-Fab	3,8	+/-	0,2
4B4-D7-Fab	15,3	+/-	3,0
1E6-C9-Fab	18,7	+/-	3,5
10E6-G6-Fab	4,7	+/-	0,9
4E7-C9-Fab	6,2	+/-	0,8
12G3-E8-Fab	4,4	+/-	0,3
5B1-G2-Fab	11,1	+/-	3,6
18F5-H10-Fab	4,1	+/-	0,0
18G9-H11-Fab	1,7	+/-	0,5
13H2-C2-Fab	14,3	+/-	0,9
20G6-F3-Fab	14,0		(n=1)
11F9-F8-huFab	11,6		(n=1)
20E5-F10-huFab	8,2		(n=1)

1.7. Оценка безопасности CD3-Fab.

1.7.1. Безопасность CD3-Fab, измеряемая с помощью экспрессии CD25+ и CD69+ на Т-клетках человека.

Эффект Fab-антител к CD3 на статус активации Т-клеток в качестве результатов по безопасности анализировали с помощью основанного на проточной цитометрии обнаружения экспрессии маркера активации CD25 и CD69 на поверхности первичных Т-клеток человека.

Выделенные первичные Т-лимфоциты человека ресуспендировали в RPMI+GlutaMAX I (Gibco)+10% FCS (Invitrogen) и 2,5Е5 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one) в 100 мкл на лунку.

5 мкл Fab-антител к CD3 добавляли к клеткам при конечной концентрации 30000 нг/мл. Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 ч при 37°C в 5% CO₂.

После периода инкубации клетки осаждали и окрашивали в течение 15 мин при 4°C в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) на лунку с помощью следующих меченных антител: CD25-V450, CD69-APC.

Клетки дважды промывали после окрашивания, ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания с FBS и 5000 клеток измеряли с применением проточного цитометра LSRII (BD). Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю Т-клеток CD25pos и CD69pos (табл. 7).

Таблица 7. Безопасность CD3-Fab, измеренная с помощью экспрессии CD25+ и CD69+ на Т-клетках человека

Антитело	CD25+ % активации Т-клеток человека, нормализованный по PBS C=30000 нг/мл n=1	CD69+ % активации Т-клеток человека нормализованный по PBS C=30000 нг/мл n=1
11H3-E5-Fab	0,7	0,5
12D2-E5-Fab - SEC	3,2	11,1
4B4-D7-Fab	2,5	5,4
1E6-B8/B9-C9-Fab	1,8	3,2
10E6-G6-Fab	0,8	2,6
4E7-C9-Fab	0,4	0,1
12G3-E8-Fab	0,0	1,5
5B1-G2-Fab	0,4	4,2
6F4-D10-Fab	2,1	6,4
18F5-H10-Fab	0,0	0,1
18G9-H11-Fab	0,7	2,2
13H2-C2-Fab	0,5	0,4
13C1-F6-Fab	0,4	0,2
1E6-B8/B9-C9-Fab	0,6	1,7
20G6-F3-Fab	0,2	3,2
1E6-B8/B9-C9-Fab	2,5	7,8
1E6-B8/B9-C9-Fab	0,1	1,0
11F9-F8-huFab	1,0	0,8
20E5-F10-huFab	1,5	1,3

1.7.2. Безопасность CD3-Fab, измеряемая с помощью экспрессии CD4+/CD69+, CD4+/CD25+, CD8+/CD69+ и CD8+/CD25+ на Т-клетках человека.

Эффект Fab-антител к CD3 на статус активации Т-клеток в качестве результатов по безопасности анализировали с помощью основанного на проточной цитометрии обнаружения экспрессии маркера активации CD25 и CD69 на поверхности первичных Т-клеток человека. Выделенные первичные Т-лимфоциты человека ресуспендировали в RPMI+GlutaMAX I (Gibco)+10% FCS (Invitrogen) и 2,5E5 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one) в 50 мкл на лунку. Либо тестировали исключительно Т-клетки и лунки заполняли 50 мкл RPMI+GlutaMAX I+10% FCS, или целевые клетки (т.е. линию клеток THP-1) добавляли из расчета 2,5E4 клеток на лунку в 50 мкл RPMI+GlutaMAX I+10% FCS. Биспецифические антитела серийно разводили 1:3 в PBS (Invitrogen) и по 5 мкл каждого добавляли к клеткам при конечной максимальной концентрации, составляющей 30000 нг/мл. Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 ч при 37°C в 5% CO₂. После периода инкубации клетки осаждали и окрашивали в течение 15 мин при 4°C в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) на лунку с помощью следующих меченных антител: CD4-PE, CD8-APC-Cy7, CD25-APC, CD69-PE-Cy7. В качестве контроля комбинации нескольких антител без одного (Fluorescence Minus One (FMO)) активированные Т-клетки окрашивали как описано выше, но CD25 заменяли его изотипом (изотипическое APC-IG1k) в одной пробирке, а CD69 заменяли его изотипом (изотипическое PE-Cy7-IG1k) во второй пробирке. Клетки дважды промывали после окрашивания, ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания с FBS и 5000 клеток измеряли с применением проточного цитометра LSR II (BD). Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю Т-клеток CD4posCD25pos, CD4posCD69pos, CD8posCD25pos и CD8posCD69pos. Гейтирование проводили в соответствии с контролями FMO (см. табл. 8).

Таблица 8. Безопасность CD3-Fab измеренная с помощью экспрессии CD4+/CD69+, CD4+/CD25+, CD8+/CD69+ и CD8+/CD25+ на Т-клетках человека

Антитело	CD4+/CD69+ % активации, Нормализованный по PBS C=100 нМ	CD8+/CD69+ % активации, Нормализованный по PBS C=100 нМ	CD4+/CD25+ % активации, Нормализованный по PBS C=100 нМ	CD8+/CD25+ % активации, Нормализованный по PBS
----------	--	--	--	--

	среднее значение +/- SEM			среднее значение +/- SEM			среднее значение +/- SEM			C=100 нм среднее значение +/- SEM		
20G6-F3-Fab	0,1	+/-	0,1	0,0	+/-	0,0	0,4	+/-	0,1	0,0	+/-	0,1
4B4-D7-Fab	3,2	+/-	1,1	0,3	+/-	0,3	1,3	+/-	0,6	0,0	+/-	0,0

Пример 2. Последовательности CD123.

2.1. Конструирование плазмид экспрессии для слияния CD123 (IL3RA)-hFc (CD123-Fc).

С применением кДНК-содержащих плазмид в качестве матрицы получали белки слияния, содержащие CD123 человека и *Macaca fascicularis* в рамке считывания с константной областью тяжелой цепи, включая GS-линкер (используемый в белке *Macaca*), шарнирную область, домены CH2 и CH3 иммуноглобулина IgG человека, дополнительно несущей метку Strep-II (только в версии белка человека).

С применением геномной ДНК человека в качестве матрицы амплифицировали внеклеточный домен CD123 человека (IL3RA), включая сигнальную последовательность. Полученные в результате амплифицированные, расщепленные и очищенные продукты ПЦР объединяли с помощью лигирующей ПЦР и лигировали в вектор экспрессии для млекопитающих pXL с помощью способа InFusion, используя сайты для NheI и HindIII. Последовательность полученного в результате белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD123 человека с меткой Strep-II, раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 196. Аминокислоты 1-284 соответствуют аминокислотам 22-305 полноразмерного белка CD123 человека дикого типа (раскрыт в данном документе под SEQ ID NO: 194, доступной из базы данных NCBI под номером доступа NP_002174.1) и, таким образом, внеклеточному домену человеческого CD123.

Для клонирования CD123 *Macaca fascicularis* кДНК получали из крови популяции *Macaca fascicularis*. С применением этой выделенной кДНК в качестве матрицы амплифицировали внеклеточный домен CD123 *Macaca* (IL3ra), включая сигнальную последовательность. Полученные в результате амплифицированные, расщепленные и очищенные продукты ПЦР объединяли с помощью лигирующей ПЦР и лигировали в вектор экспрессии для млекопитающих pXL с помощью способа InFusion, используя NheI и HindIII. Последовательность полученного в результате белка слияния, содержащего Fc и зрелый CD123 человека с меткой Strep-II, раскрыта в данном документе под SEQ ID NO: 197. Аминокислоты 1-284 соответствуют аминокислотам 22-305 полноразмерного белка CD123 *Macaca fascicularis* дикого типа (раскрыт в данном документе под SEQ ID NO: 195, доступной из базы данных NCBI под номером доступа NP_002174.1) и, таким образом, внеклеточному домену человеческого CD123.

2.2. Экспрессия и очистка CD123-Fc человека и *Macaca fascicularis*.

Клетки Freestyle HEK293, выращиваемые в виде суспензионной культуры в бессывороточной среде F17 (Life), временно трансфицировали плазмидой экспрессии. Трансфекцию осуществляли с применением реагента для трансфекции Cellfectin (Life). Клетки культивировали при 37°C в течение 7 дней. Культуральный супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали путем центрифугирования и очищали от примесей путем фильтрации (0,22 мкм).

Для очистки варианты белков слияния, содержащих Fc, захватывали на матрице с белком A (GE) и элюировали с помощью градиента pH. После доочистки белка с помощью SEC в PBS с применением Superdex 200 (GE) и конечной стадии концентрирования ультрафильтрацией белок применяли для дальнейших анализов.

2.3. Оценка аффинности IgG крысы из гибридомы к обоим CD123 человека и *Macaca fascicularis*.

Скрининг IgG крысы к CD123 в отношении аффинности связывания с CD123 человека и перекрестной реактивности к CD123 макака-крабеда осуществляли с использованием супернатантов гибридомы с применением Proteon XPR36 (Biorad) в подходе определения кинетики реакции методом одной точки. Анализ захвата организовывали с применением антитела козы к IgG крысы (112-005-071, Jackson Immuno Research). Захватывающее антитело наносили на чипы GLC (176-5011, Biorad) до примерно 8000 RU в вертикальном направлении с применением набора для аминного связывания (176-2410, Biorad). Захват IgG крысы до примерно 200 RU в вертикальном направлении приводил к значениям R_{max}, составляющим до 100 RU, для CD123-Fc. Кинетику связывания с белком слияния, содержащим Fc и CD123 человека и макака-крабеда, измеряли при скорости 100 мкл/мин в горизонтальном направлении в течение 120 и 600 с для ассоциации и диссоциации соответственно. Белки CD123-Fc применяли в двукратных разведениях от 6 до 100 нМ. Буфер PBSET (176-2730, Biorad) применяли в качестве буфера для анализа. Регенерацию обеспечивали путем инъекции 10 мМ глицинового буфера, pH 1,5, в течение 18 с при 30 мкл/мин. Обработку данных и анализ осуществляли с применением программного обеспечения Proteon-Manager v3.0. Аппроксимацию сенсограмм проводили с помощью 1:1 модели Лэнгмюра. Клоны выбирали на основании аффинности к CD123 человека с KD < 1 нМ и перекрестной реактивности с CD123 макака-крабеда.

Fab и CODV-Fab.

Аффинности связывания Fab или CODV-Fab, связывающих CD123, измеряли с применением инст-

румента Biacore3000 (GE Healthcare). Буфер для анализа представлял собой HBS-EP (BR-1001-88, GE Healthcare). Захват белков слияния CD123-FC обеспечивали с применением набора для захвата антител человека (GE Healthcare). Захватывающее антитело связывали на чипах CM5 (BR-1001-88, GE Healthcare) до примерно 12000 RU с применением набора для аминного связывания (BR-100-50, GE Healthcare). Белки слияния CD123-FC захватывали при 10 мл/мин до примерно 70 RU с получением значений R_{max} , составляющих 30 RU. Кинетику связывания с Fab или CODV-Fab к CD123 измеряли при 30 мкл/мин в течение 240 и 600 с для фазы ассоциации и диссоциации соответственно. Применяли двукратные разведения Fab от 3 до 200 нМ в буфере для анализа. Все концентрации Fab прогоняли в двух повторностях совместно с контролем буфером в двух повторностях для обеспечения двойного контроля. Регенерацию поверхности захвата обеспечивали с помощью 1-минутной инъекции раствора 3М $MgCl_2$ при скорости 30 мкл/мин. Для анализа данных применяли программное обеспечение BIAevaluation v.4.1 (GE Healthcare). Данные аппроксимировали в целом с помощью 1:1 модели Лэнгмюра с массообменом.

IgG и белки CODV-Fc.

Измерение аффинности связывания IgG и белков CODV-Fc к CD123 осуществляли аналогично анализу связывания для Fab и CODV-Fab за исключением захватывающего антитела. В данном случае классическое антитело Strep-MAB (2-1507-001, IBA) применяли для захвата CD123 человека-Fc посредством его метки Strep-II. В данном случае раствор для регенерации представлял собой 10 мМ глициновый буфер, pH 2,0.

2.4. Получение антител с перекрестной реактивностью к CD123 человека и *Macaca fascicularis*.

кДНК CD123 человека и *Macaca fascicularis* клонировали в проприетарные векторы для иммунизации от Aldevton (pB8 и W8) соответственно. Трех крыс в группе иммунизации MR13-296 иммунизировали с помощью вектора для иммунизации IL3RA-hum.-ECD (aa 19-305). Забор иммунной сыворотки проводили в день 24 протокола иммунизации, после 4 применений генной иммунизации (IS24d-4). Сыворотки, разведенные в PBS с 3% FBS, тестировали с помощью проточной цитометрии с применением клеток млекопитающих, временно трансфицированных вариантами кДНК IL3RA человека и макака-крабеда, IL3RA-hum.ECD и IL3RA-hum.D3.

Специфическую реактивность иммунных сывороток в отношении клеток, трансфицированных pB1-IL3RA-hum.ECD, а также IL3RA-супо (pFF1262), и клеток THP-1 можно было обнаружить у всех иммунизированных животных при сравнении с клетками, трансфицированными нерелевантной кДНК.

Крыс с положительными сыворотками умерщвляли и В-клетки сливали с клетками миеломы мыши. Полученные в результате гибридомы скринировали на клетках HEK293, трансфицированных плазмидами экспрессии CD123 человека или макака-крабеда, на различных линиях клеток, экспрессирующих CD123, с помощью проточной цитометрии (данные показаны в табл. 10).

Целевые клетки высевали из расчета 5×10^4 клеток в 50 мкл буфера для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) на лунку в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one).

Супернатанты гибридомы серийно разводили 1:3 в PBS (Invitrogen) и 50 мкл каждого добавляли к клеткам при конечной максимальной концентрации, составляющей 1 мкг/мл. Анализируемую смесь инкубировали в течение 45 мин при 4°C.

Клетки дважды промывали буфером для окрашивания с FBS и добавляли 1 мкг вторичного антитела козы к IgG (H+L) крысы, конъюгированного с Alexa Fluor 488 (Invitrogen-Life Technologies, № MH10520), в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку. Анализируемую смесь инкубировали в течение 15 мин при 4°C и после этого дважды промывали.

Клетки ресуспендировали в 200 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку и измеряли с применением проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec) или LSRII (BD). Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю клеток, положительных в отношении связывания антителом. Клетки, обработанные только вторичным, а не первичным антителом, применяли для гейтирования. Кривые рассчитывали с помощью XLFit (алгоритм 205).

Специфическое связывание клонов с CD123 могло быть показано на поверхности трансфицированных HEK293 по сравнению с нетрансфицированными клетками HEK293, у которых сигнал нельзя было обнаружить (данные не показаны). Связывание антител было зависимым от концентрации, при этом значение EC_{50} находилось в диапазоне от 0,4 до 17,7 нг/мл (табл. 9).

Таблица 9. Специфическое связывание CD123 клонами IgG крысы в супернатантах гибридомы, обнаруженное с помощью проточной цитометрии

Антитело	ЕС50 [нг/мл]
BFX - 1A6	6,4
BFX - 1E1	2,2
BFX - 2B8	5,5
BFX - 2F4	4,5
BFX - 2F8	3,4
BFX - 2H7	17,7
BFX - 3B10	2,0
BFX - 3E3	2,0
BFX - 5A5	10,1
BFX - 6B10	5,0
BFX - 6C10	6,1
BFX - 6D6	0,9
BFX - 8B11	0,4
BFX - 9B8	1,2
BFX - 9D7	0,9
BFX - 9F6	1,3
BFX - 9H2	14,9

Зависимое от концентрации связывание антител измеряли с применением НЕК293, трансфицированных CD123, в качестве целевых клеток и вторичного антитела козы к IgG (H+L) крысы, конъюгированного с Alexa Fluor 488. Представлены значения ЕС50, рассчитанные на основе кривых.

Таблица 10. Данные связывания антител к CD123 с рекомбинантным CD123 и клетками, экспрессирующими CD123

Клон	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ) Человек	KD (нМ) Макак- крабоед	Molm-13	TNP-1	OCI-AML3	SP2	Базофилы	Блокиро- вание IL3
1E1	4,6E+05	1,1E-04	0,23	0,72	+	+	+	+	+	-
2B8	6,6E+05	1,2E-05	0,018	0,77	+	+	+	+	+	-
2F8	1,3E+05	6,6E-05	0,53	0,51	+	+	+	-	+	+
3B10	2,2E+05	0,5E-05	0,21	0,27	+	+	+	-	+	+
3E3	1,6E+05	6,4E-05	0,4	0,12	+	+	+	-	+	+
5A5	1,3E+05	1,2E-04	1,1	0,05	+	+	+	+	+	-
6B10	2,3E+05	1,5E-05	0,15	0,1	+	+	+	+	+	-
6C10	1,8E+05	1,4E-04	0,75	0,79	+	+	+	+	+	-
8B11	4,7E+05	6,2E-06	0,01	0,1	+	+	+	+	+	-
9B8	1,5E+06	2,8E-04	0,19	0,17	+	+	+	+	+	+
9D7	1,0E+06	3,2E-04	0,3	0,07	+	+	+	+	+	+
9F6	1,8E+05	6,7E-06	0,04	0,5	+	+	+	+	+	-

Данные связывания, демонстрирующие аффинности антител к CD123 в отношении рекомбинантного белка CD123 человека и макака-крабоеда. Связывание на поверхности клетки обнаруживали с помощью проточной цитометрии. SP2 называются клетки, экспрессирующие N-концевой усеченный (область D1) вариант CD123. Антитела тестировали с помощью Proteon XPR36 в отношении их способности конкурировать со связыванием IL3 с CD123.

2.5. Гуманизация последовательностей антитела крысы к CD123.

Гуманизацию антител крысы осуществляли с помощью привития CDR или с помощью 4D-способа (US 20110027266). Для антитела крысы к CD3, 3E3, наиболее близкими идентифицированными последовательностями зародышевой линии Rattus были IGHV2S48*01 и IGHJ3*01 для варибельной области тяжелой цепи и IGLV3S2*01 и IGKJ3*01 для варибельной области легкой цепи. Рассчитанный показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа крысы (только последовательности кармашных областей) составляет 94,51% для VH и 98,9% для VL.

Проверяли потенциальные доступные проблемные остатки, и один остаток в CDRH2 модифицировали.

С применением способа привития создавали множество гуманизированных вариантов, исходя из наиболее близких идентифицированных последовательностей зародышевой линии человека: IGHV4-59*05 и IGHJ4*01 для VH (показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа в кармашных областях: 75,82%); IGLV6-57*01 и IGLJ3*01 для VL (показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа в кармашных областях: 72,22%).

Кроме привития CDR применяли протокол 4D-гуманизации (US20110027266) для гуманизации варибельных доменов легкой цепи (VL) и тяжелой цепи (VH) антитела крысы к CD123, 3E3. Моделирование молекулярной динамики (MD) осуществляли на минимизированной 3D гомологичной модели (проводили с помощью MOE; применяли PDB: 1FLR) антитела крысы к CD123, 3E3, и сравнивали с 49 моделями антитела человека, полученными на основании семи репрезентативных легких цепей (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambd1, vlambd2, vlambd3) и семи репрезентативных тяжелых цепей (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6), обозначенных с помощью LGCR/SDI и доступных в MOE.

Для "4D-гуманизации" были выбраны две модели: VI3-vh4 и VL3-VH2 с наилучшими как гидрофобными, так и электростатическими компонентами и идентичностью последовательности за пределами CDR. Для парного сравнения варибельного домена антитела крысы к CD123, 3E3, и двух выбранных моделей последовательности выравнивали на основании оптимального 3D наложения альфа-атомов углерода в соответствующих гомологичных моделях.

Пример 3. Антитела в биспецифическом формате CODV-Fab/

3.1. Клонирование выбранных последовательностей CD3 в комбинации с mAb к CD123, 7G3, в виде биспецифического формата CODV-Fab для исследования их активности в отношении вовлечения Т-клеток.

Выбранные последовательности антител к CD3, таких как I2C, mAb2 (Macrogenics) и называемых "20G6-F3", "4E7-C9", "4B4-D7" и "18F5-H10", экспрессировали как моноспецифические Fab к CD3. Указанные выбранные последовательности также экспрессировали как биспецифические CODV-Fab к CD3×CD123 с применением последовательностей моноклонального антитела 7G3, что приводило к получению конструкций CODV-Fab "I2C×7G3" и называемых "7G3×20G6", "7G3×4E7", "7G3×4B4" и "7G3×18F5", как дополнительно описано в данном документе выше в разделе "Антителоподобные связывающие белки". Очищенные белки применяли в анализе Biacore для сравнения аффинности в отношении CD3ε/δ-комплексов (данные представлены в табл. 11). Никаких изменений в аффинности не смогли обнаружить с помощью анализа Biacore, когда последовательности CD3 вводили в биспецифическом формате CODV-Fab.

Таблица 11. Сравнение аффинностей Fab-фрагментов и CODV-Fab в отношении CD3ε/δ-комплексов человека и макака-крабоеда

	Молекула	hu kon 1/Mc	hu koff 1/c	hu KD нМ	су KD нМ
Fab- фрагменты	I2C	1,1E+07	1,3E-03	0,13	0,5
	mAb2	3,1E+05	4,3E-03	13,7	16,3
	BDW-20G6-F3	3,5E+04	2,7E-04	8	8
	BDX-4E7-C9	8,9E+04	1,5E-03	17	15
	BDW-4B4-D7	1,1E+05	2,9E-03	27	24
	BDX-18F5-H10	2,0E+05	1,8E-04	1	1
CODV-Fab	7G3xI2C	4,0E+06	2,0E-03	0,5	0,4
	7G3x20G6	7,2E+04	5,1E-04	7	7
	7G3x4E7	1,2E+05	1,9E-03	16	10
	7G3x4B4	2,7E+05	4,4E-03	17	18

3.2. Биспецифические CODV-Fab, направленные против CD123 и CD3, опосредуют сильный пере-

направленный цитолиз под действием Т-клеток.

Такие биспецифические CODV-Fab обладают способностью локализовать Т-клетку (путем связывания такой Т-клетки с CD3-связывающей частью CD3-связывающего CODV-Fab) в месте расположения опухолевой клетки (путем связывания такой раковой клетки с частью для связывания CD123 CODV-Fab). Локализованная Т-клетка затем может опосредовать цитолиз опухолевой клетки в процессе, обозначенном в данном документе как "перенаправленный" цитолиз. Конструировали биспецифические CODV-Fab, специфические в отношении CD123 и CD3, с вариабельными доменами моноклонального антитела к CD123, 7G3, и вариабельными доменами антител к CD3, выбранных из антител к CD3, полученных в примере 1.

В связи с этим, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из 200 мл периферической крови здоровых доноров, обработанной EDTA, с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла.

15 мл Histopaque (Sigma-Aldrich) предварительно загружали в 50-мл пробирку Leucosep (Greiner bio-one). Кровь разводили буфером для промывки autoMACS+1% BSA (Miltenyi Biotec) и загружали на мембрану в общей сложности десяти подготовленных пробирок. Пробирки центрифугировали без торможения в течение 10 мин при $1000 \times g$. PBMC собирали и промывали с помощью буфера для промывки autoMACS+1% BSA трижды. В конце концов, PBMC ресуспендировали в буфере для прогона autoMACS (Miltenyi Biotec) для выделения Т-лимфоцитов с помощью технологии autoMACSpro с применением набора для выделения всех Т-клеток (Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту выделенных Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии MACSQuant с применением 7-цветного набора для иммунофенотипирования человека (Miltenyi Biotec).

Эффект вовлечения Т-клеток под действием биспецифических антител анализировали с помощью анализа, основанного на проточной цитометрии. Целевые клетки (т.е. линию клеток THP-1) окрашивали в течение 15 мин при 37°C с помощью 1 мкМ CFSE в 1 мл RPMI+GlutaMAX I (Gibco) на 1×10^7 клеток. После этого клетки дважды промывали и ресуспендировали в RPMI+GlutaMAX I+10% FCS (Invitrogen). $2,5 \times 10^4$ целевых клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one) в 50 мкл среды на лунку.

Выделенные первичные Т лимфоциты человека ресуспендировали в RPMI+GlutaMAX I+10% FCS и добавляли при указанном соотношении эффектор-мишень в 50 мкл на лунку к целевым клеткам (в большинстве случаев E:T=10:1).

Биспецифические антитела серийно разводили 1:3 в PBS (Invitrogen) и по 5 мкл каждого добавляли к клеткам при конечной максимальной концентрации, составляющей 3000 нг/мл.

Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 ч при 37°C в 5% CO_2 .

Для обнаружения погибших целевых клеток все клетки окрашивали с помощью 7-AAD. В связи с этим по 5 мкг/мл 7-AAD, разведенного в буфере для окрашивания с FBS (BD Pharmingen), добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 15 мин при 4°C в темноте. Клетки измеряли с применением MACSQuant (Miltenyi Biotec) или проточного цитометра LSRII (BD) соответственно. Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю двойных положительных клеток по CFSE и 7-AAD.

Результаты этих исследований, показанные, например, в табл. 20-22, демонстрируют способность CODV-Fab к CD123×CD3 опосредовать перенаправленный цитолиз опухолевых клеток.

3.3. Оценка безопасности перенаправленного цитолиза под действием Т-клеток.

Эффект биспецифических антител на статус активации Т-клеток в качестве результатов по безопасности анализировали с помощью основанного на проточной цитометрии обнаружения экспрессии маркера активации CD25 и CD69 на поверхности первичных Т-клеток человека.

Выделенные первичные Т-лимфоциты человека ресуспендировали в RPMI+GlutaMAX I (Gibco)+10% FCS (Invitrogen) и $2,5 \times 10^5$ клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one) в 50 мкл на лунку.

Либо тестировали исключительно Т-клетки и лунки заполняли 50 мкл RPMI + GlutaMAX I + 10% FCS, или целевые клетки (т.е. линию клеток THP-1) добавляли из расчета $2,5 \times 10^4$ клеток на лунку в 50 мкл RPMI+GlutaMAX I+10% FCS.

Биспецифические антитела серийно разводили 1:3 в PBS (Invitrogen) и по 5 мкл каждого добавляли к клеткам при конечной максимальной концентрации, составляющей 30000 нг/мл.

Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 ч при 37°C в 5% CO_2 .

После периода инкубации клетки осаждали и окрашивали в течение 15 мин при 4°C в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) на лунку с помощью следующих меченных антител: CD4-PE, CD8-APC-Cy7, CD25-APC, CD69-PE-Cy7.

В качестве контроля комбинации нескольких антител без одного (Fluorescence Minus One (FMO)) активированные Т-клетки окрашивали как описано выше, но CD25 заменяли его изотипом (изотипическое APC-IG1k) в одной пробирке, а CD69 заменяли его изотипом (изотипическое PE-Cy7-IG1k) во второй пробирке.

Клетки дважды промывали после окрашивания, ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания с FBS и 5000 клеток измеряли с применением проточного цитометра LSRII (BD). Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю Т-клеток CD4posCD25pos, CD4posCD69pos, CD8posCD25pos и CD8posCD69pos. Гейтирование проводили в соответствии с контролями FMO (см. табл. 12).

Таблица 12. Активность CODV-Fab к CD123×CD3, измеряемая в анализе цитотоксичности, и безопасность, измеряемая с помощью экспрессии CD69

Молекула	Активность EC50 [нг/мл]	Безопасность Экспрессия CD69 % клеток/% макс.
7G3 × I2C	20 ± 9	25,8 ± 7,6
7G3 × OKT3	16 ± 5	25,5 ± 8,0
7G3×20G6	18 ± 5	8,7 ± 0,8
7G3×4E7	12 ± 3	12,3 ± 2,5
7G3×4B4	11 ± 2	11,6 ± 0,8
7G3×18F5	61 ± 15	9,8 ± 1,1

3.4. Гуманизация последовательностей антитела крысы к CD3 и биспецифических антител.

Гуманизацию антител крысы осуществляли с помощью привития CDR или с помощью 4D-способа (US 20110027266).

Для антитела крысы к CD3, "20G6", наиболее близкими идентифицированными последовательностями зародышевой линии Rattus были IGHV6S17*01 и IGHJ2*01 (для вариабельной области тяжелой цепи) и IGKV1S21*O1 и IGKJ4*01 (для вариабельной области легкой цепи). Рассчитанный показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа крысы (только последовательности каркасных областей) составляет 97,80% для VH и 95,5% для VL.

Создавали множество гуманизированных вариантов с применением способа привития на основании:

1) наиболее близких идентифицированных последовательностей зародышевой линии человека (IGHV3-30-01 IGHJ4-01 для VH с показателем идентичности с последовательностью зародышевого типа в каркасных областях, составляющим 77%; IGK2D-29-02 IGKJ4-01 для VL с показателем идентичности с последовательностью зародышевого типа в каркасных областях, составляющим 80%), или

2) на основании наиболее близкой идентифицированной последовательности зародышевой линии с более низкой pI IGVH3-48*02-IGHJ4-01 для VH с показателем идентичности с последовательностью зародышевого типа в каркасных областях, составляющим 75%; IGKV2-28*01-IGKJ4-01 для VL с показателем идентичности с последовательностью зародышевого типа в каркасных областях, составляющим 77,5%, или

3) на основании более отдаленной последовательности зародышевой линии человека (смена клады зародышевой линии) (IGVH1-46*01-IGHJ4*01 для VH с показателем идентичности с последовательностью зародышевого типа в каркасных областях, составляющим 56%; IGKV4*01-IGKJ4*01 для VL с показателем идентичности с последовательностью зародышевого типа в каркасных областях, составляющим 67,5%).

Гуманизированные последовательности затем водили в формат CODV-Fab в виде молекулы, называемой CODV-Fab "7G3×20G6", в комбинации с последовательностью к CD123 из антитела 7G3, описываемого ранее. Очищенные CODV-Fab к CD123×CD3 применяли в анализе Biacore для оценки аффинности в отношении CD3ε/δ (см. табл. 13).

Таблица 13. Аффинность выбранных гуманизированных вариантов антитела к CD3, 20G6, в отношении рекомбинантного CD3ε/δ-комплекса

Комбинации гуманизированных последовательностей, применяемых в CODV-Fab "7G3x20G6"	ka (1/Мс)	kd (1/с)	Rmax (RU)	KD (M)
Исходная последовательность	2,17E+04	5,71E-04	46	2,63E-08
VL1A_VH1A	2,86E+04	4,34E-03	46	1,52E-07
VL1B_VH1A	2,99E+04	4,14E-03	45	1,38E-07
VL1C_VH1D	2,30E+04	1,01E-03	58	4,40E-08
VL1D_VH1B	1,86E+04	1,09E-03	62	5,87E-08
VL1D_VH1C	2,22E+04	7,13E-04	71	3,21E-08
VL1D_VH1D	2,40E+04	7,46E-04	59	3,10E-08

Для антитела крысы к CD3, 4B4-D7, наиболее близкими идентифицированными последовательностями зародышевой линии Rattus были IGHV6S17*01 (идентичность 93%) и IGHJ2*01 (идентичность 87,5%) для вариабельной области тяжелой цепи и IGKV1S21*01 (идентичность 93%) и IGKJ4*01 (идентичность 100%) для вариабельной области легкой цепи.

Рассчитанная процентная доля идентичности идентифицированных V-последовательностей Rattus с последовательностью зародышевого типа человека (только последовательности каркасных областей) составляет 79% для VH и 77,53% для VL.

Ряд пар гуманизированных вариантов для VH и VL создавали путем привития дополнительной сконструированной последовательности с применением наиболее близких последовательностей зародышевой линии человека (IGHV3-30*01_IHJ6*02; IGKV2-30*02/IGKV2D-39*02 IGKJ2*01). Рассчитанные процентные доли идентичности с последовательностью зародышевого типа человека (только последовательности каркасных областей 4 IMGT) для гуманизированных V-последовательностей перечислены в табл. 14.

Таблица 14. Процентные доли идентичности с последовательностью зародышевого типа человека для гуманизированных V-последовательностей, полученных путем привития из антитела, называемого "B4-D7"

Привитые варианты "4B4-D7"	Показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа человека, %
VL1Cmodif1	92,1
VL1Cmodif2	91,0
VL1Cmodif3	91,0
VL1Amodif1	97,8
VL1Amodif2	96,6
VL1Amodif3	95,5
VL2C	95,5
VL2D	96,7
VL2F	96,7
VH6Bmodif1	92,3
VH6Bmodif2	90,1
VH6Amodif1	94,5
VH6Amodif2	92,3
VH6Amodif3	91,2
VH6C	95,5
VH6D	93,5

Процентные доли рассчитывали только на основании последовательностей каркасных областей 4 IMGT.

В дополнение к привитию CDR для гуманизации вариабельных доменов легкой цепи (VL) и тяже-

лой цепи (VH) антитела крысы к CD3, 4B4-D7, применяли протокол 4D-гуманизации, описанный в заявке на патент США US 20110027266. Моделирование молекулярной динамики (MD) осуществляли на минимизированной 3D гомологичной модели (проводили с помощью MOE; применяли PDB: 1FLR) антитела крысы к CD3, 4B4-D7, и сравнивали с 49 моделями антитела человека, полученными на основании семи репрезентативных легких цепей (vk1, vk2, vk3, vk4, vlambdal, vlamba2, vlamba3) и семи репрезентативных тяжелых цепей (vh1a, vh1b, vh2, vh3, vh4, vh5, vh6), обозначенных с помощью LGCR/SDI и доступных в MOE.

Две модели выбирали для "4D-гуманизации". vk1-vh6 с наиболее высоким 4D-подобием как в отношении гидрофобного, так и в отношении электростатического компонентов. vk2-vh3 с наиболее высокой идентичностью последовательности за пределами CDR. Для парного сравнения варибельного домена антитела крысы к CD3, 4B4-D7, и двух выбранных моделей последовательности выравнивали на основании оптимального 3D наложения альфа-атомов углерода в соответствующих гомологичных моделях. Ряд других пар гуманизированных вариантов для VH и VL дополнительно оптимизировали.

Рассчитанные процентные доли идентичности с последовательностью зародышевого типа человека (только последовательности каркасных областей 4 IMGT) для гуманизированных V-последовательностей перечислены в табл. 15.

Таблица 15. Процентные доли идентичности с последовательностью зародышевого типа человека для гуманизированных V-последовательностей, полученных с помощью 4D-гуманизации антитела, называемого "4B4-D7"

4D-варианты "4B4-D7"	Показатель идентичности с последовательностью зародышевого типа человека, %
VL1A	75
VL1B	75
VL2A	83
VL2B	83
VH1A	80
VH1B	80
VH2A	80
VH2B	84,5

Процентные доли рассчитывали только на основании последовательностей каркасных областей 4 IMGT.

Гуманизированные последовательности экспрессировали как Fab-фрагменты и очищали с последующим анализом Вiasoge для оценки аффинности к CD3ε/δ (данные показаны в табл. 16).

Таблица 16. Аффинность выбранных гуманизированных вариантов антитела к CD3, 4B4-D7, в отношении рекомбинантного CD3ε/δ-комплекса

Fab	VL	VH	Лиганд	ka	kd	KD
4B4			huCD3	3,26E+05	2,85E-03	8,79E-09
			cyCD3	1,90E+05	2,37E-03	1,26E-08
4B4_1	VL1a 75%	VH1B 80%	huCD3	6,28E+05	1,74E-03	2,77E-09
			cyCD3	5,06E+05	1,58E-03	3,13E-09
4B4_2	VL1b 75%	VH1B 80%	huCD3	2,86E+05	2,14E-03	7,48E-09
			cyCD3	2,77E+05	2,10E-03	7,57E-09
4B4_5	VL2C 95,5%	VH6D 93,5%	huCD3	2,33E+05	4,23E-03	1,82E-08
			cyCD3	2,53E+05	4,20E-03	1,66E-08
4B4_6	VL1a 75%	VH1A 80%	huCD3	1,50E+06	1,85E-03	1,24E-09

			cyCD3	1,49E+06	1,77E-03	1,19E-09
4B4_7	VL1b 75%	VH1A 80%	huCD3	3,06E+05	2,48E-03	8,10E-09
			cyCD3	3,01E+05	2,19E-03	7,28E-09
4B4_9	VL2B 83%	VH2A 80%	huCD3	2,18E+05	2,91E-03	1,34E-08
			cyCD3	2,85E+05	3,44E-03	1,21E-08
4B4_10	VL1_CM2 91%	VH6_BM2 90%	huCD3	4,34E+05	3,99E-03	9,19E-09
			cyCD3	4,30E+05	3,84E-03	8,94E-09
4B4_11	VL1_CM3 91%	VH6_BM2 90%	huCD3	5,66E+05	7,74E-03	1,37E-08
			cyCD3	2,38E+05	4,86E-03	2,04E-08
4B4_17	VL2A 83%	VH2B 84,5%	huCD3	3,10E+05	2,76E-03	8,91E-09
			cyCD3	2,98E+05	2,70E-03	9,07E-09
4B4_20	VL2F 96,5%	VH6C 95,5%	huCD3	5,09E+04	1,71E-03	3,35E-08
			cyCD3	4,56E+04	1,98E-03	4,34E-08

3.5. Связывание CODV hu-Fab к CD123×CD3 с клетками THP-1 и TF-1.

Последовательности выбранных антител к CD123 клонировали в формат CODV-Fab в комбинации с последовательностью связывания CD3 и белки экспрессировали и очищали.

Их способность связывания с клетками, экспрессирующими в естественных условиях CD123, определяли с помощью проточной цитометрии. Линию клеток THP-1 или линию клеток TF-1 применяли в качестве целевых клеток.

Целевые клетки блокировали с помощью FcR-блокатора (Sigma). В связи с этим целевые клетки ресуспендировали в буфере для окрашивания с FBS (BD Pharmingen) и блокировали с помощью 100 мкл блокирующего реагента на мл в течение 1 ч. при 4°C. Клетки заливали буфером для окрашивания с FBS и 1E5 клеток в 50 мкл на лунку высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one).

Антитела добавляли из расчета 3 мкг в 50 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку. Анализируемую смесь инкубировали в течение 30 мин при 4°C.

Клетки дважды промывали буфером для окрашивания с FBS и в каждую лунку добавляли по 1 мкг вторичного антитела F(ab')₂ козы к каппа-цепи человека, конъюгированного с FITC (Beckman Coulter, № 732621), в 100 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку. Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 мин при 4°C и после этого дважды промывали.

Клетки ресуспендировали в 150 мкл буфера для окрашивания с FBS на лунку и измеряли с применением проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec) или LSRII (BD). Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю клеток, положительных в отношении связывания антителом. Клетки, обработанные только вторичным, а не первичным антителом, применяли для гейтирования.

Связывание CODV-Fab к CD123×CD3 с CD123 было показано с двумя разными линиями клеток, экспрессирующими CD123, либо при совместной экспрессии с CD131 на линии клеток TF-1, либо на поверхности клеток THP-1 при отсутствии экспрессии CD131. В качестве примера показаны пять различных клонов, связывающихся с целевыми клетками. В качестве отрицательного контроля (контроль специфичности) применяли CODV-Fab к CD19×CD3 и эталонный CODV-Fab к CD123×CD3 - в качестве положительного контроля (табл. 17).

Таблица 17. Специфическое связывание последовательностей, нацеливающихся на CD123, клонированных в остов CODV-Fab в комбинации с последовательностью связывания CD3, с линиями клеток THP-1 и TF-1

Антитело	% FITC-положительных клеток	
	Клетки THP-1	Клетки TF-1
Контроль со средой	0,10	0,00
Контроль с вторичным АВ	0,00	0,20
Контроль специфичности с CD19 x CD3	0,10	0,20
CODV-Fab CD123 x CD3	99,90	82,50
CODV-Fab BFX-2F8-D6 x CD3	24,00	9,30
CODV-Fab BFX-3E3-D3 x CD3	99,00	31,60
CODV-Fab BFX-9B8-G6 x CD3	48,80	31,10
CODV-Fab BFX-9D7-C8 x CD3	88,70	50,20
CODV-Fab BFX-9F6-G3 x CD3	99,70	60,70

Связывание антител обнаруживали с применением THP-1 и TF-1, экспрессирующих CD123, в каче-

стве целевых клеток. Добавляли 3 мкг антитела и обнаруживали с помощью вторичного антитела козы к каппа-цепи человека, конъюгированного с FITC. Показаны процентные доли положительных в отношении антитела целевых клеток.

3.6. Цитотоксический эффект в отношении клеток THP-1, опосредованный CODV-Fab к CD123×CD3.

Эффекты вовлечения Т-клеток под действием биспецифических антител, состоящих из новой созданной последовательности к CD123 и той же последовательности связывания CD3, анализировали с помощью анализа цитотоксичности, основанного на проточной цитометрии. Эффекторными клетками были первичные Т-клетки, выделенные из цельной крови здоровых доноров. Клетки THP-1 применяли в качестве целевых клеток, экспрессирующих CD123.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли из 200 мл периферической крови здоровых доноров, обработанной EDTA, с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла. 15 мл Histopaque (Sigma-Aldrich) предварительно загружали в 50-мл пробирку Leucosep (Greiner bio-one). Кровь разводили буфером для промывки autoMACS+1% BSA (Miltenyi Biotec) и загружали на мембрану в общей сложности десяти подготовленных пробирок. Пробирки центрифугировали без торможения в течение 10 мин при 1000×g. PBMC собирали и промывали с помощью буфера для промывки autoMACS+1% BSA трижды. В конце концов, PBMC ресуспендировали в буфере для прогона autoMACS (Miltenyi Biotec) для выделения Т-лимфоцитов с помощью технологии autoMACSpro с применением набора для выделения всех Т-клеток (Miltenyi Biotec) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту выделенных Т-клеток анализировали с помощью проточной цитометрии MACSQuant с применением 7-цветного набора для иммунофенотипирования человека (Miltenyi Biotec).

Целевые клетки (т.е. линию клеток THP-1) окрашивали в течение 15 мин при 37°C с помощью 1 мкМ CFSE в 1 мл RPMI+GlutaMAX 1+10% FCS (Invitrogen). 2,5Е4 целевых клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном для суспензионных культур (Greiner bio-one) в 50 мкл среды на лунку.

Выделенные первичные Т лимфоциты человека ресуспендировали в RPMI+GlutaMAX 1+10% FCS и добавляли при указанном соотношении эффектор-мишень в 50 мкл на лунку к целевым клеткам (в большинстве случаев Е:Т=10:1).

Биспецифические антитела серийно разводили 1:3 в PBS (Invitrogen) и по 5 мкл каждого добавляли к клеткам при конечной максимальной концентрации, составляющей 3000 нг/мл.

Анализируемую смесь инкубировали в течение 20 ч при 37°C в 5% CO₂.

Для обнаружения погибших целевых клеток все клетки окрашивали с помощью 7-AAD. В связи с этим по 5 мкг/мл 7-AAD, разведенного в буфере для окрашивания с FBS (BD Pharmingen), добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 15 мин при 4°C в темноте. Клетки измеряли с применением MACSQuant (Miltenyi Biotec) или проточного цитометра LSRII (BD) соответственно. Дополнительные анализы данных осуществляли с применением программного обеспечения FlowJo (Tree Star, Inc.). Результаты представляли собой процентную долю двойных положительных клеток по CFSE и 7-AAD. Кривые рассчитывали с помощью XLfit (алгоритм 205).

Как показано в качестве примера в табл. 18, биспецифические антитела обладали способностью вовлекать первичные Т-клетки и обеспечивать лизис целевых клеток THP-1 in vitro. Зависимое от концентрации антител повышение уровня погибших целевых клеток можно было обнаружить после 20 ч совместной инкубации. Для антител, показанных здесь, рассчитанные значения EC50 находились в диапазоне от 12,2 до 429,3 нг/мл.

Таблица 18. Эффект вовлечения Т-клеток под действием биспецифического CODV-Fab к CD123×CD3, обнаруженный в анализах цитотоксичности, основанных на проточной цитометрии

Антитело	EC50 [нг/мл]		EC50 [нМ]		n
	геометрическое среднее значение +/- SEM		геометрическое среднее значение +/- SEM		
	(n=4)		(n=4)		
CODV-Fab BFX-2B8-F3 x CD3	106,9	+/- 33,9	1420,5	+/- 450,2	4
CODV-Fab BFX-3E3-D3 x CD3	12,2	+/- 5,9	163,0	+/- 80,1	4
CODV-Fab BFX-6B10- E4 x CD3	39,7	+/- 17,9	529,1	+/- 237,7	4
CODV-Fab BFX-9B8-G6 x CD3	106,1	+/- 36,1	1410,2	+/- 479,8	4
CODV-Fab BFX-9D7-C8 x CD3	86,3	+/- 29,3	1148,6	+/- 390,5	4
CODV-Fab BFX-9F6-G3 x CD3	13,9	+/- 7,7	185,9	+/- 104,1	3
CODV-Fab BFX-3B10- E6 x CD3	429,3	+/- 82,6	5709,3	+/- 1099,0	2

Представлены средние значения EC50, рассчитанные на основании кривых.

Клон 3E3 к CD123 объединяли с гуманизированным вариантом антитела к CD3, 4B4, в формате CODV-Fab. Анализировали их эффект вовлечения Т-клеток и их способность активировать Т-клетки *in vitro*.

Анализ цитотоксичности осуществляли как описано выше. В табл. 20 показан литический эффект первичных Т-клеток человека в отношении целевой клетки THP-1, опосредованный этими конструкциями, например, CODV-Fab hz4B4(4D_A)×3E3.

Цитотоксическую активность могла надежно индуцироваться с зависимым от концентрации эффектом с помощью Т-клеток, выделенных из семи различных здоровых доноров (табл. 19).

Таблица 19. Эффект вовлечения Т-клеток под действием биспецифического CODV-Fab hz4B4(4D_A)×3E3, обнаруженный при анализе цитотоксичности, основанном на проточной цитометрии

CODV-Fab	Цитотоксичность (THP-1)			Цитотоксичность (THP-1)		
	геометрическое среднее значение EC50 [нМ] +/- SEM n=7			геометрическое среднее значение EC50 [нг/мл] +/- SEM n=7		
hz4B4(4D_A) x 3E3 CODV-Fab	26,5	+/-	5,9	2,0	+/-	0,5

Представлены средние значения EC50, рассчитанные на основании кривых.

3.7. Эффект активации Т-клеток под действием CODV-Fab к CD123×CD3 или DART.

Эффект биспецифических антител на статус активации Т-клеток в качестве результатов по безопасности анализировали с помощью основанного на проточной цитометрии обнаружения экспрессии маркера активации CD25 и CD69 на поверхности первичных Т-клеток человека, как описано выше. Сравнение включало одноцепочечное биспецифическое диатело к CD123×CD3 в формате DART (называемое в данном документе "MGD006"), которое было описано в WO 2015026892, содержащее первую полипептидную цепь с последовательностью под SEQ ID NO: 386 (которая представляет собой SEQ ID NO:1, показанную в WO 2015026892) и вторую полипептидную цепь с последовательностью под SEQ ID NO: 387 (которая представляет собой SEQ ID NO: 3, показанную в WO 2015026892), ковалентно связанные друг с другом с помощью дисульфидной связи.

Когда CODV-Fab инкубировали с выделенными Т-клетками в отдельности, нельзя было обнаружить никаких значимых повышений экспрессии маркера поздней активации CD25 на поверхности CD4-положительных и CD8-положительных Т-клеток (данные не показаны). В равной степени, не наблюдалось зависимое от концентрации повышение уровня экспрессии маркера ранней активации CD69 на обеих подгруппах Т-клеток (табл. 20). Вследствие этого, конструкцию оценивали как неактивную (NA). Напротив, существенное повышение уровня экспрессии обоих маркеров было измеримым, когда добавляли целевые клетки THP-1 (данные для CD25 не показаны, данные для CD69 приведены в табл. 21).

Таблица 20. Эффект биспецифических CODV-Fab к CD123×CD3 или DART на состояние активации Т-клеток, обнаруженный по уровню экспрессии CD69 при анализе, основанном на проточной цитометрии

CODV-Fab	Безопасность - активация Т-клеток без целевых клеток n=3											
	CD4+/CD69+% активации, Нормализованный по PBS C=100 нМ среднее значение +/- SEM			Минимальная эффективная концентрация [пМ] для CD4+/CD69+ среднее значение +/- SEM			CD8+/CD69+ активации, нормализованный по PBS C=100 нМ среднее значение +/- SEM			Минимальная эффективная концентрация [пМ] для CD8+/CD69+ среднее значение +/- SEM		
hz4B4 (4D_A) x3E3 CODV-Fab	14	+/ -	2		NA		13	+/ -	2		NA	
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	22	+/ -	2				22	+/ -	2			
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	18	+/ -	4				15	+/ -	2			
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	6	+/ -	2				9	+/ -	2			
Однопочечное антитело в формате DART, MGD006	82	+/ -	9				83	+/ -	4			

Представлены средние процентные доли активированных CD8 и CD4 Т-клеток при концентрации антитела 100 нМ и минимальной эффективной концентрации в анализах исключительно с Т-клетками.

Результаты, показанные в табл. 20, указывают на то, что однопочечное антитело (DART) вызывает значительно большую активацию Т-клеток в отсутствие целевых клеток при тестируемых условиях.

Таблица 21. Эффект биспецифического CODV-Fab hz4B4(4D_A)×3E3 на состояние активации Т-клеток, обнаруженный по уровню экспрессии CD69 при анализе, основанном на проточной цитометрии

CODV-Fab	Безопасность - активация Т-клеток с целевыми клетками THP-1 n=3											
	CD4+/CD69+% активации, нормализованный по PBS C=среднее значение цитотоксичности при EC50 среднее значение +/- SEM			CD4+/CD69+% активации, нормализованный по PBS Cmax среднее значение +/- SEM			CD8+/CD69+% активации, нормализованный по PBS C=среднее значение цитотоксичности при EC50 среднее значение +/- SEM			CD8+/CD69+% активации, нормализованный по PBS Cmax среднее значение +/- SEM		
hz4B4 (4D_A) x 3E3 CODV-Fab	71	+/ -	4	84	+/ -	2	69	+/ -	6	82	+/ -	4

Представлены средние процентные доли активированных CD8 и CD4 Т-клеток в анализе цитотоксичности при максимальной концентрации антитела (Cmax) и при концентрации антитела EC50. Анализы осуществляли при совместной инкубации целевых клеток THP-1 и Т-клеток.

Таблица 22. Эффект биспецифических, полностью гуманизированных содержащих 7G3 молекул CODV и одноцепочечного Dart на состояние активации Т-клеток, обнаруженный по уровню экспрессии CD69 при анализе, основанном на проточной цитометрии

CODV-Fab	Безопасность - активация Т-клеток с целевыми клетками THP-1	
	CD4+ Т-клетки (% CD69+ клеток) EC50 (пМ) n=1-6	CD8+ Т-клетки (% CD69+ клеток) EC50 (пМ) n=1-6
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	1, 4	3, 1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	3, 2	9, 9
hz20G6xhz7G3 CODV-OL1	1, 0	3, 3
Одноцепочечное антитело в формате DART, MGD006	1, 0	3, 5

Показаны значения EC50 для репрезентативных тестов активированных CD8 и CD4 Т-клеток в анализе цитотоксичности. Анализы осуществляли при совместной инкубации целевых клеток THP-1 и Т-клеток.

Чтобы оценить цитотоксические эффекты новых антител к CD123 с гуманизированными частями к CD3, создавали CODV-Fab "hz20G6×7G3", "7G3×hz4B4", "hz4B4×3E3", содержащие различные комбинации Fv. Также создавали один Fc-содержащий вариант, CODV-Fab "hz20G6×7G3-TL4", несущий метку на Fc легкой цепи для образования гетеродимеров Fc с соответствующей тяжелой цепью (вариант TL4). Аффинности биспецифической конструкции к CD3ε/δ-комплексу и CD123 измеряли с помощью Biacore. Кроме того, осуществляли анализ цитотоксичности, как описано выше, и измеряли активацию CD4+ и активацию CD8+.

Таблица 23. Аффинности и активности биспецифических CODV-молекул к CD123×CD3

Биспецифическая молекула	KD (CD3ε/d) [нМ]	KD (CD123) [нМ]	Анализ цитотоксичности (клетки THP) EC50 [пМ]	Экспрессия CD69 при цитотоксичности EC50	
				% активации CD4+	% активации CD8+
hz20G6×7G3 CODV-Fab	5, 0	0, 6	30, 9+3, 6	73	66
7G3 x hz4B4 CODV-Fab	5, 4	0, 1	26, 7+2, 9	65	55
hz4B4×3E3 CODV-Fab	7, 0	4, 8	26, 5+5, 9	71	69
Fc-меченный вариант TL4: hz20G6×7G3 CODV-Fab-TL4	13, 9	1, 7	16, 7+10, 1	73	74

Также оценивали цитотоксические эффекты CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3", CODV-Fab-OL1 "hz20G6×hz7G3" и одноцепочечного Dart MGD006. Аффинности каждой биспецифической конструкции к CD3ε/δ-комплексу и CD123 измеряли с помощью Biacore. Кроме того, осуществляли анализ цитотоксичности, как описано выше, и измеряли активацию CD4+ и активацию CD8+.

Таблица 24. Аффинности и активности биспецифических CODV-молекул к CD123×CD3 и DART (MGD006)

Биспецифическая молекула	KD (CD3ε/d) [нМ]	KD (CD123) [нМ]	Анализ цитотоксичности (клетки THP) EC50 [пМ] n= 3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	9	0, 2	2, 1+/-0, 2

hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	11	0,2	1,0+/-0,1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	15	0,4	0,9+/-0,1
Одноцепочечное антитело В формате DART, MGD006	9	0,2	0,3+/-0,04

Для оценки потенциала молекул запускать активацию Т-клеток в присутствии (желательно) и отсутствии (нежелательно) целевых клеток применяли новый анализ. Клетки NFAT-RE-luc2 Jurkat (клетки от Promega № CS176403) инкубировали со свежeweделенными Т-клетками человека при соотношении эффектор-мишень 1:1 при 37°C и 5% CO₂ в RPMI 1640 с 2 г/л (11 мМ) глюкозы, с GlutaMAX, с 25 мМ NEPES в 386-луночных планшетах. Через 5 ч инкубацию останавливали и люминесценцию измеряли с применением системы для анализа люциферазы Bio-Glo, Promega № G7 940, в микропланшетном ридере для измерения люминесценции HTS.

Таблица 25. Активация Т-клеток, измеренная как активация, индуцированная под действием CODV-молекул к CD123×CD3 и MGD006, измеренная на линии клеток с репортерным геном Jurkat-NFAT-Luc

Биспецифическая молекула	С клетками THP1, EC50 (нМ) n= 3	Без целевых клеток Активация при Spax относительно максимальной активации в анализе с целевыми клетками (%) n= 3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab	561±0,2	0.2±0,1
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-TL1	444±0,2	0.4±0,3
hz20G6xhz7G3 CODV-Fab-OL1	320±0,2	0.4±0,3
Одноцепочечное антитело В формате DART, MGD006	370±0,2	25.1±9,9

Результаты, показанные в табл. 25, указывают на то, что все антитела индуцируют активацию клеток с репортерным геном со значениями EC50 ниже нМ в присутствии целевых клеток. Для подходов вовлечения Т-клеток активация Т-клеток должна происходить только в присутствии целевых клеток. Это наблюдается в случае молекул CODV, поскольку в отсутствие целевых клеток отсутствует значительный сигнал люминесценции. Напротив, одноцепочечная молекула DART индуцирует более высокую активацию линии клеток с репортерным геном в отсутствие целевых клеток. Эти результаты согласуются с результатами, полученными с первичными Т-клетками.

3.8. In vivo противоопухолевая активность биспецифического CODV-Fab-TL1 к CD123×CD3 и биспецифического CODV-Fab к CD123×CD3.

Материалы и способы

Выделение PBMC и Т-клеток человека из цельной крови PBMC выделяли из цельной крови здоровых доноров-людей с помощью центрифугирования в градиенте фикола. Цельную кровь разводили 1:1 в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Затем два объема по тридцать пять мл разведенной крови помещали в две 50-мл пробирки Falcon в присутствии 15 мл фикола-пака. Пробирки центрифугировали при 200 g в течение 40 мин при комнатной температуре без торможения. Две лейкоцитарные пленки извлекали и помещали в шесть 50-мл пробирок Falcon с 45 мл стерильного PBS и центрифугировали трижды (в промежутках между каждым центрифугированием супернатант сливали и добавляли 45 мл PBS) при 100 g в течение десяти минут при комнатной температуре без торможения. После последнего центрифугирования два осадка объединяли в конечном объеме, составляющем 50 мл, дополненным PBS, в 50-мл пробирке Falcon. Общее количество жизнеспособных PBMC определяли путем подсчета в Vicell. Осадок затем восстанавливали в буфере для прогона Automacs от Miltenyi Biotech (130-091-221) и Т-клетки отделяли от PBMC с применением набора для отрицательной селекции от Miltenyi Biotech (130-091-156) и Automacs в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные Т-клетки извлекали и помещали в культуру в среде Xvivo-15, 5% HIS+пенициллин-стрептомицин 1X при концентрации 2,5 ×10E+6 клеток/мл.

Размножение Т-клеток человека.

Обогащенную Т-клетками популяцию клеток человека активировали и размножали in vitro в течение 14 дней с применением набора для активации/размножения Т-клеток от Miltenyi Biotech (130-091-441).

Получение Т-клеток человека для введения in vivo.

Клетки и среду для культивирования клеток центрифугировали 10 мин при 400 g. Осадок восста-

навливали при концентрации 2×10^7 клеток/мл в стерильном PBS. Удаление активирующих гранул от размноженных Т-клеток проводили с использованием сепаратора MACS[®]MAG от Myltenyi Biotech (130-092-168) в соответствии с инструкциями производителя. Количество клеток в обогащенных Т-клетками популяциях клеток определяли путем подсчета в Viscell и восстанавливали в 25 мл стерильного PBS в 50-мл пробирке Falcon. После стадии центрифугирования при 400 g в течение 10 мин при комнатной температуре клеточный осадок восстанавливали в соответствующем объеме стерильного PBS для получения конечной концентрации 5×10^7 клеток/мл.

Модель опухоли.

Клетки острого миелоидного лейкоза человека Molm-13, экспрессирующие CD123, получали из DSMZ - Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур при институте Лейбница (DSMZ, Брауншвейг, Германия). Клетки выращивали в культуре (37°C, 5% CO₂, влажность 95%) в среде RPMI1640 от Glutamax (дополненной 20% фетальной бычьей сыворотки). Клетки Molm-13 инфицировали вектором, содержащим ген люциферазы (SV40-PGL4-Puro - т.е. вектор, содержащий ген люциферазы, состоящий из промотора вируса обезьян 40, связанного с последовательностью люциферазы 2 и последовательностью кассеты устойчивости к пуромицину), переносимым нерепликативным лентивирусом.

Опухолевые клетки Molm13-luc⁺ инъецировали внутривенно (IV) мышам NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Wjl/SzJ NSG (10^6 клеток на животное в 200 мкл суспензии в PBS). Через двадцать четыре часа тем же мышам вводили внутрибрюшинно (IP) 10^6 Т-клеток человека в объеме, составляющем 0,2 мл стерильного PBS.

Начальную биолуминесцентную визуализацию на третий день после имплантации опухоли осуществляли с применением устройства для визуализации IVIS100 (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США) с программным обеспечением для сбора данных Living Image 3.2 (Perkin-Elmer, Уолтем, Массачусетс, США). За 15 мин до визуализации животным IP инъецировали 120 мг/кг раствор калиевой соли люцифераина жука Beetle luciferin (партия № 316019, Promega, Лион, Франция) в PBS. Мышей подвергали анестезии с использованием Ketamine®/Xylazine® (120 мг/кг; 6 мг/кг IM, 5 мл/кг) за 5 мин до визуализации.

Обработку с применением CODV-Fab-TL1 "hz2 0G6×hz7G3", CODV-Fab "hz2 0G6×hz7G3", биспецифического конкурирующего антитела DART к CD123×CD3 (одноцепочечное антитело в формате DART MGD006 или близкий аналог, называемый в данном документе "средство DART") или PBS с помощью внутривенного введения (IV) или непрерывной внутрибрюшинной инфузии (CIP) начинали в день четыре после имплантации опухоли на развившихся опухолях, которые уже обнаруживались в костях, как указано в табл. 26 (CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3"), табл. 27 (CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" IV) и табл. 28 (CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" CIP).

Таблица 26. План исследования по оценке внутривенного (IV) введения биспецифического CODV-Fab-TL1 к CD123×CD3

Группа лечения	Доза (нмоль/кг)	Объем/способ введения	Схема	Количество животных
Контроль	–	–	–	7
CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3"	1, 3	0, 2ml IV	Q3d (4, 7, 10)	7
CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3"	0, 13	0, 2ml IV	Q3d (4, 7, 10)	8
CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3"	0, 013	0, 2ml IV	Q3d (4, 7, 10)	6
CODV-Fab "hz20G6×hz7G3"	1, 3	0, 2ml IV	Qd (4-13)	8
Одноцепочечное антитело в формате DART, MGD006	1, 3	0, 2ml IV	Qd (4-13)	7

Таблица 27. План исследования по оценке внутривенного (IV) введения биспецифического CODV-Fab к CD123×CD3

Группа лечения	Доза (нмоль/кг)	Объем/способ введения	Схема	Количество животных
Контроль	–	–	–	5
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1, 3	0, 2ml IV	Qd (4–13)	8
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	0, 13	0, 2ml IV	Qd (4–13)	5
Одноцепочечное антитело в формате DART, средство DART	1, 3	0, 2ml IV	Qd (4–13)	8
Одноцепочечное антитело в формате DART, средство DART	0, 13	0, 2ml IV	Qd (4–13)	7
CODV-Fab hz20G6×7G3	1, 3	0, 2ml IV	Qd (4–13)	8

Таблица 28. План исследования по оценке непрерывной внутрибрюшинной инфузии (CIP) биспецифического CODV-Fab к CD123×CD3

Группа лечения	Доза (нмоль/кг/день)	Объем/день/способ введения	Схема	Количество животных
Среда-носитель	–	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	3, 9	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1, 3	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	10
Одноцепочечное антитело в формате DART, MGD006	3, 9	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	9
Одноцепочечное антитело в формате DART, MGD006	1, 3	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1, 3	0, 2 мл, IV	Qd (4–13)	10
Среда-носитель	–	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	10
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	0, 13	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	8
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	0, 013	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	8
Одноцепочечное антитело в формате DART, MGD006	0, 13	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	8
Одноцепочечное антитело в формате DART, MGD006	0, 013	6 мкл/день, ip, Alzet 1002	Непрерывная инфузия (4–14)	9
CODV-Fab "hz20G6xhz7G3"	1, 3	0, 2 мл, IV	Qd (4–13)	10

Сбор данных и критерии эффективности.

Массу тела животных контролировали от дня 3 до конца анализа, чтобы отследить влияние терапии. Дозировка, приводящая к 20% потере веса или 15% потере веса в течение 3 последовательных дней или к 10% или более смертей, связанных с лекарственным средством, считалась чрезмерно токсичной дозировкой. Масса тела животных включала массу опухоли.

Опухолевую нагрузку отслеживали с помощью неинвазивной биолуминесцентной визуализации (BLI). Начальную BLI осуществляли на третий день после имплантации опухоли, за 24 ч до начала обработки. Животных распределяли в различные группы на основании сигнала биолуминесценции всего те-

ла. Рост опухоли отслеживали во всем теле и длинных костях задних ног путем измерения сигналов BLI в дни 7, 10 и 14 после имплантации опухоли. Сигнал в длинных костях измеряли путем сегментации, и на него мог влиять близкорасположенный локорегионарный сигнал (например, остаточный сигнал в мягких тканях в поздние моменты времени). Группы обработки сравнивали с контрольными животными, несущими десиминированную опухоль Molm13-luc+ и Т-клетки человека.

Первичными конечными точками эффективности были соотношение изменения сигнала опухоли от начального между группами лечения и контрольными группами (dT/dC), число частичных регрессий опухоли (PR) и число полных регрессий опухоли (CR).

Рост опухоли на основании кривых сигнала биolumинесценции (выраженного в фотон/с) в зависимости от времени отслеживали для каждого животного в каждой группе обработки и представляли как медианная кривая $\pm$ MAD для сигналов как всего тела, так и сегментированных сигналов кости. Изменения в сигнале биolumинесценции опухоли рассчитывали для каждого контрольного (С) или подвергнутого обработке (Т) животного и для каждого дня путем вычитания сигнала опухоли в первый день обработки (день определения стадии) из сигнала опухоли в обозначенный день наблюдения. Медиану Т рассчитывали для группы обработки, а медиану С рассчитывали для контрольной группы.

Затем рассчитывали соотношение Т/С и выражали как процентную долю:

$$dT/dC = [(медиана Т, день наблюдения - медиана Т, день 3) / (медиана С, день наблюдения - медиана С, день 3)] \times 100.$$

Дозу считали терапевтически активной, когда dT/dC в конце эксперимента (день 14) составляло менее 42%, и очень активной, когда dT/dC составляло менее 10%.

Процент регрессии опухоли определяли как % снижения сигнала опухоли в группе обработки в обозначенный день наблюдения по сравнению с ее сигналом в первый день обработки. В конкретный момент времени и для каждого животного % регрессии рассчитывали как

$$\% \text{ регрессии (в момент времени } t) = \frac{\text{Сигнал}_{t_0} - \text{Сигнал}_t}{\text{Сигнал}_{t_0}} \times 100$$

Учитывая риск колебаний сигнала, связанный с кинетикой реакции превращения люциферина и возможным пропуском IP инъекции, регрессия сигнала для животного считалась истинной регрессией опухоли только в том случае, когда наблюдалась по меньшей мере в два последовательных момента времени.

Частичная регрессия (PR). Регрессии определяли как частичные, если сигнал опухоли снижался по сравнению с сигналом в начале обработки для двух последовательных моментов времени, при этом сигнал все еще превышал 50% от начального сигнала.

Полная регрессия (CR). Регрессии определяли как полные, если сигнал опухоли снижался более чем на 50% по сравнению с сигналом в начале обработки для двух последовательных моментов времени.

Статистический анализ.

Оценка соединений, вводимых IV путем.

Отдельный сигнал биolumинесценции каждой группы обработки сравнивали с другими с применением поправки по методу Холма-Бонферрони для множественных парных сравнений с последующим двухфакторным ANOVA с повторными измерениями по дню: $p > 0,05$: NS, $0,05 > p > 0,01$: *, $p < 0,01$: **. Статистический анализ выполняли как для сигналов биolumинесценции всего тела, так и сигналов биolumинесценции в длинных костях.

Оценка соединений, вводимых с помощью CIP

Оценка CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", вводимых с помощью CIP, привела к объединению данных двух независимых исследований (1-е исследование относится к высоким дозировкам соединений, во 2-м исследовании рассматривают низкие дозировки, при этом оба исследования включают контрольную группу, получавшую среду-носитель, и группу положительного контроля, включавшую CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", 1,3 нмоль/кг, IV, Qd). Статистический анализ сигнала биolumинесценции у каждой мыши каждый день осуществляли после нормализации данных по среднему значению сигнала биolumинесценции в группе среды-носителя в тот же день того же эксперимента (объединенные контроли среды-носителя, $n=19$; объединенные положительные контроли, $n=20$). Отдельный нормализованный сигнал биolumинесценции каждой группы обработки сравнивали с сигналом других групп с применением поправки по методу Холма-Бонферрони для множественных парных сравнений с последующим двухфакторным ANOVA с повторными измерениями по дню: $p > 0,05$: NS, $0,05 > p > 0,01$: *, $p < 0,01$: **. Статистический анализ выполняли как для сигналов биolumинесценции всего тела, так и сигналов биolumинесценции в длинных костях.

Результаты

IV введение биспецифического CODV-Fab-TL1 к CD123×CD3 "hz20G6×hz7G3".

Полностью человеческий CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3", вводимый IV, Q3d, в присутствии Т-клеток человека подавлял рост опухоли Molm13 при всех тестируемых дозах (1,3, 0,13 и 0,013 нмоль/кг Q3d), причем dT/dC составляло 20, 14 и 38% соответственно для всего тела (фиг. 5 и 7), и был ассоциирован с регрессией опухоли в длинных костях при всех тестируемых дозах с 4/7 CR, 6/8 CR и 2/6 CR со-

ответственно (фиг. 6 и 8).

Максимальный ответ для полностью человеческого CODV-Fab-TL1 "hz20G6×hz7G3" получали во всем теле и в костях при дозе 0,13 нмоль/кг, Q3d. При такой дозе активность статистически не отличалась от активности DART, вводимого при дозе 1,3 нмоль/кг, IV, Qd (dT/dC во всем теле 29% с 1/7CR и 1/7PR в длинных костях), и была эквивалентна активности CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", вводимому при дозе 1,3 нмоль/кг, IV, Qd (dT/dC во всем теле 23% с регрессией опухоли в длинных костях 1/8CR и 1/8PR). Данные подтверждали с помощью конечного гистопатологического анализа (не показано).

Отличия, наблюдаемые между данными для всего тела и длинных костей, связаны с остаточным ростом опухоли в яичниках и абдоминальном жире вследствие диссеминации экстрамедулярной опухоли после IV инъекции.

IV введение биспецифического CODV-Fab к CD123×CD3 "hz20G6×hz7G3".

Полностью человеческий CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", вводимый IV, в присутствии Т-клеток человека подавлял рост опухоли при всех тестируемых дозах (1,3 и 0,13 нмоль/кг в Qd4-13), причем dT/dC составляло 14 и 39% соответственно (фиг. 9 и 11), был ассоциирован с регрессией опухоли при дозе 1,3 нмоль/кг в длинных костях с 5/8 CR (фиг. 10 и 12).

DART, вводимый при дозе 1,3 нмоль/кг, IV, Qd4-13, подавляли рост опухоли при dT/dC во всем теле 29% и регрессией опухоли 3/8 CR в длинных костях, что незначительно отличалось от значений для CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", вводимого при дозе 1,3 нмоль/кг, IV. DART был неактивен в подавлении сигнала опухоли во всем теле при введении в дозе 0,13 нмоль/кг, IV, Qd4-13 (dT/dC 62%), несмотря на регрессию опухоли 1/7PR в длинных костях. Значимого отличия не наблюдалось при такой же дозировке полностью человеческого CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" в конце исследования. Статистически значимых отличий не отмечено между полностью человеческим CODV-Fab "hz20G6×hz7G3" и частично гуманизированным соединением CODV-Fab hz20G6×7G3, когда их вводили при одинаковой дозировке, составляющей 1,3 нмоль/кг, IV, Qd4-13: при этой дозе CODV-Fab hz20G6×7G3 подавлял рост опухоли во всем теле с dT/dC, составляющим 34%, было ассоциировано с регрессией опухолей в длинных костях (1/8CR и 1/8PR).

Отличия, наблюдаемые между данными для всего тела и длинных костей, связаны с остаточным ростом опухоли в яичниках и абдоминальном жире вследствие диссеминации экстрамедулярной опухоли после IV инъекции.

CIP введение биспецифического CODV-Fab к CD123×CD3.

Полностью человеческое CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", вводимое CIP, в присутствии Т-клеток человека подавляло рост опухоли во всем теле при дозе 3,9, 1,3 и 0,13 нмоль/кг/день, CIP4-14, и было неактивным при 0,013 нмоль/кг/день с соответствующими dT/dC, составляющими 2, 3, 21 и 57% во всем теле (фиг. 13 и 15). Оно было ассоциировано с регрессией опухоли при дозе 3,9, 1,3, и 0,13 нмоль/кг в длинных костях с 5/9CR 3/9PR, 6/10CR 1/10PR и 7/8CR соответственно (фиг. 14 и 16).

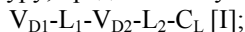
DART, вводимое при дозе 3,9, 1,3 и 0,13 нмоль/кг/день, CIP4-14, но не при дозе 0,013 нмоль/кг/день, подавляло рост опухоли во всем теле с dT/dC, составляющим 21, 5, 21 и 46% соответственно (фиг. 13), индуцируя регрессию опухоли в длинных костях при 3,9, 1,3 и 0,13 нмоль/кг с 3/9 CR 3/9PR; 8/9CR и 4/8CR 2/8PR соответственно (фиг. 14).

Полностью человеческое CODV-Fab "hz20G6×hz7G3", вводимый при дозе 1,3 нмоль/кг, IV, Qd4-13, подавляло рост опухоли во всем теле с dT/dC, составляющим 4 и 5% (1- и 2-е исследования соответственно), было ассоциировано с регрессией опухоли в длинных костях (8/10CR 1/10PR по сравнению с 8/10 CR в 1- и 2-м исследованиях соответственно).

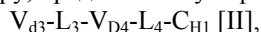
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело-подобный связывающий белок, который специфически связывается с CD3ε человека и по меньшей мере с одним дополнительным мишеневым антигеном, которым является CD123, содержащий две полипептидные цепи, которые образуют два антиген-связывающих участка,

где первый полипептид имеет структуру, представленную формулой [I]



и второй полипептид имеет структуру, представленную формулой [II]



где V_{D1} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;
 L_1, L_2, L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;
 и где первый и второй полипептиды образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь, и
 где оба V_{D1} и V_{D2} представляют собой либо переменные домены легкой цепи, либо переменные домены тяжелой цепи, и

оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены тяжелой цепи, если V_{D1} и V_{D2} являются переменными доменами легкой цепи, или

оба V_{D3} и V_{D4} представляют собой переменные домены легкой цепи, если V_{D1} и V_{D2} являются переменными доменами тяжелой цепи;

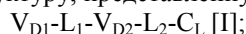
где первый или второй иммуноглобулин представляет собой антитело, которое связывается с внеклеточным доменом белка CD3ε человека и которое содержит

переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR2-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, CDR3-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142, CDR2-L с аминокислотной последовательностью KVS и CDR3-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11; и где другой из первого или второго иммуноглобулинов представляет собой антитело против CD123, которое содержит переменный домен тяжелой цепи, содержащий CDR1-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 381, CDR2-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 384, CDR3-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 382 и переменный домен легкой цепи, содержащий CDR1-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 378, CDR2-L с аминокислотной последовательностью WAS и CDR3-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 379.

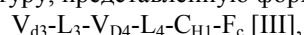
2. Антитело-подобный связывающий белок по п.1, где полипептид формулы [II] дополнительно содержит F_c -домен.

3. Антитело-подобный связывающий белок по п.1 или 2, содержащий две полипептидные цепи, которые образуют два антиген-связывающих участка, где

одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [I]



и второй полипептид имеет структуру, представленную формулой [III]



где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_c представляет собой шарнирный участок иммуноглобулина и константные домены CH_2, CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина;

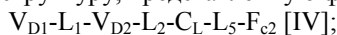
L_1, L_2, L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры;

и где полипептид формулы [I] и полипептид формулы [III] образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь.

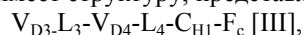
4. Антитело-подобный связывающий белок по п.2 или 3, где полипептид формулы [I] дополнительно содержит F_c -домен (F_{c2}).

5. Антитело-подобный связывающий белок по п.2 или 4, содержащий две полипептидные цепи, которые образуют два антиген-связывающих участка, где

одна полипептидная цепь имеет структуру, представленную формулой [IV]



и первая полинуклеотидная цепь имеет структуру, представленную формулой [III]



где V_{D1} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой переменный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_c представляет собой шарнирный участок иммуноглобулина и константные домены CH_2, CH_3 тя-

желой цепи иммуноглобулина;

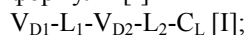
F_{c2} представляет собой шарнирный участок иммуноглобулина и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 , L_4 и L_5 представляют собой аминокислотные линкеры; и

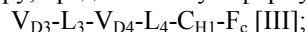
где полипептид формулы [IV] и полипептид формулы [III] образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь.

6. Антитело-подобный связывающий белок по п.2 или 3, который содержит третью полипептидную цепь, содержащую F_c -домен (F_{c3}).

7. Антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.2, 3 или 6, содержащий три полипептидных цепи, которые образуют два антиген-связывающих участка, где первый полипептид имеет структуру формулы [I]



второй полипептид имеет структуру, представленную формулой [III]



третий полипептид F_{c3} представляет собой шарнирный участок иммуноглобулина, и CH_2 , CH_3 представляют собой константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина,

где V_{D1} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи первого иммуноглобулина;

V_{D2} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи второго иммуноглобулина;

V_{D3} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного второго иммуноглобулина;

V_{D4} представляет собой вариабельный домен тяжелой или легкой цепи указанного первого иммуноглобулина;

C_L представляет собой константный домен легкой цепи иммуноглобулина;

C_{H1} представляет собой константный домен C_{H1} тяжелой цепи иммуноглобулина;

F_c представляет собой шарнирный участок иммуноглобулина, и константные домены CH_2 , CH_3 тяжелой цепи иммуноглобулина;

L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляют собой аминокислотные линкеры,

где полипептид формулы [I] и полипептид формулы [III] образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь; и

где полипептид формулы [III] гетеродимеризуется с третьим полипептидом через его F_c -домен.

8. Антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.1-7, где V_{D1} и V_{D2} представляют собой вариабельные домены легкой цепи и V_{D3} и V_{D4} представляют собой вариабельные домены тяжелой цепи.

9. Антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.1-8, где

V_{D1} содержит

CDR1-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 378,

CDR2-L с аминокислотной последовательностью WAS, и

CDR3-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 379;

V_{D2} содержит

CDR4-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142,

CDR5-L с аминокислотной последовательностью KVS, и

CDR6-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11;

V_{D3} содержит

CDR1-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6,

CDR2-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и

CDR3-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8; и

V_{D4} содержит

CDR4-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 381,

CDR5-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 384, и

CDR6-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 382.

10. Антитело-подобный связывающий белок по п.9, где антитело-подобный связывающий белок содержит

V_{D1} , состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 385 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична ей,

V_{D2} , состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 141 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична ей,

V_{D3} , состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 138 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична ей, и

V_{D4} , состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 383 или аминокислотной последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична ей.

11. Антитело-подобный связывающий белок по п.10, который содержит линкер L_1 с последовательностью SEQ ID NO: 389, L_2 с последовательностью SEQ ID NO: 389, L_3 и L_4 , состоящие из 0 аминокис-

лот, и C_{H1} с последовательностью SEQ ID NO: 313.

12. Антитело-подобный связывающий белок по п.11, который дополнительно содержит линкер L₅, состоящий из 0 аминокислот, Fc с последовательностью SEQ ID NO:394, Fc₂ с последовательностью SEQ ID NO: 392.

13. Антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.1, 2, 4 или 6-12, который содержит:

а) один полипептид с формулой [I], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 388, которая содержит

V_{D1} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 385,

L₁ с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 389,

V_{D2} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 141,

L₂ с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 389, и

C_L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 310,

или из последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 388, которая содержит

CDR1-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 378,

CDR2-L с аминокислотной последовательностью WAS, и

CDR3-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 379,

CDR4-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142,

CDR5-L с аминокислотной последовательностью KVS, и

CDR6-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11; и

б) один полипептид с формулой [II], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 390, которая содержит

V_{D3} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138, L₃, который имеет 0 аминокислот,

V_{D4} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 383,

L₄, который имеет 0 аминокислот, и

C_{H1} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 313,

или из последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 390, которая содержит

CDR1-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 381, CDR2-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 384, CDR3-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 382, и CDR4-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, CDR5-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и CDR6-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8; и где полипептид с формулой [I] и полипептид с формулой [II] образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь.

14. Антитело-подобный связывающий белок по п.13, который содержит один полипептид с формулой [I], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 388, и один полипептид с формулой [II], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 390.

15. Антитело-подобный связывающий белок по п.5, который содержит:

а) один полипептид с формулой [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 391, которая содержит

V_{D1} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 385,

L₁ с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 389,

V_{D2} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 141,

L₂ с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 389,

C_L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 310,

L₅, который имеет 0 аминокислот, и

Fc₂ с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 392,

или из последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 391, который содержит

CDR1-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 378, CDR2-L с аминокислотной последовательностью WAS, CDR3-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 379, CDR4-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 142,

CDR5-L с аминокислотной последовательностью KVS, и

CDR6-L с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11; и

б) один полипептид формулы [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 393, где

V_{D3} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 138,

L₃, который имеет 0 аминокислот,

V_{D4} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 383,

L₄, который имеет 0 аминокислот,

C_{H1} с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 313, и

Fc с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 394,

или из последовательности, которая по крайней мере на 85% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 393, которая содержит

CDR1-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 381,

CDR2-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 384,

CDR3-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 382,

CDR4-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6,

CDR5-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7,

CDR6-H с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8;

и где полипептид формулы [IV] и полипептид формулы [III] образуют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь.

16. Антитело-подобный связывающий белок по п.15, который содержит один полипептид формулы [IV], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 391, и один полипептид формулы [III], состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 393.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.1-16 и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Применение антитело-подобного связывающего белка по любому из пп.1-16 в качестве лекарственного препарата для лечения гематологической злокачественной опухоли.

19. Применение антитело-подобного связывающего белка по любому из пп.1-16 для лечения гематологической злокачественной опухоли.

20. Применение фармацевтической композиции по п.17 для лечения гематологической злокачественной опухоли.

21. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая последовательность, кодирующую антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.3-16.

22. Клетка-хозяин, которая трансформирована нуклеиновой кислотой по п.21, для экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность, кодирующую антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.3-16.

23. Набор для терапевтического или диагностического анализа, содержащий антитело-подобный связывающий белок по любому из пп.3-16.

4E7-C9VH	EVQVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNYYAT	60
18F5-H10VH	EVQVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFTNAWMHWVRRSPEKQLEWVAQIKDKSNYYAT	60
11F3-B9VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLTLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
16F8-A7VH	---VETGGNLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	56
13H2-C2VH	EEELVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPDKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
4B4-D7VH	EVQLVETGGRLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKARSNYYAT	60
20G6-F3VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFTKAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNYYAT	60
13C1-F6VH	EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
11F9-F8VH	EVQLVETGGTLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
10E6-G6VH	EVQLVETGGGLVQSGKSLKLTTCATSGFTVTNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYET	60
11H3-E5VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
12G3-E8VH	EVRVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSLAWMHWVRQSPEKKLEWVAQIKDKANNYYAT	60
5B1-G2VH	EVQVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFSFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKANNYYAT	60
11D7-C3VH	EVQFVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
10F4-C10VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLKITCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
3H6-D2VH	EVQLVETGGRLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKDKSNYYAT	60
18G9-H11VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWIQWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
1E6-C9VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSYAWMHWVRQSPDKQLQWVAQIKAKSNYYAT	60
20B5-F10VH	EVQLVETGGSLVQPGKSLKLTTCATSGFTFSNAWMHWVRQSPEKQLEWVAQIKAKSNYYAT	60
20E5-F10VH	EVQLVETGENLVQPGKSLRLTTCATSGFSFSNAWMHWIRQSPEKQLEWVAQIKDKSNYYAT	60

**** **.*:* ** :*****:.. **:*:*:*:*:*:***** :*:.* *

```

4E7-C9VH YYAESLKGRFTISRDDPKRSIYLMNSLKEEDTAIYYCRY-VHYG--IGYAMDAWGQGTS VTVSS 122
18F5-H10VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLMNSLKEEDTAIYYCRY-VHYR--FAYALDAWGRGTS VSVSS 122
11F3-B9VH YYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLMNSLKEEDTAIYYCRY-VNYG--LAPMDVWGQGTS VTVSS 122
16F8-A7VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYCRY-VNYG--LAPMDVWGQGTS VTVSS 122
13H2-C2VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYCRY-VHYG--LAPMDAWGQGTS VTVSS 121
4B4-D7VH YYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLMNSLKEEDTAIYYCRG-TYYA--SKPFDYWGQGVMT VTVSS 117
20G6-F3VH YYAESVKGRFTISRDDSKSTIYLMNSLKEEDTAIYYCRG-VYYA--LSPFDYWGQGVMT VTVSS 121
13C1-F6VH YYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-TQYG--YNPFDYWGQGVMT VTVSS 121
11F9-F8VH YYAESVKGRFTISRDDSKTSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-TQYG--YNPFDYWGQGVMT VTVSS 121
10E6-G6VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-TQYG--YNPFDYWGQGVMT VTVSS 121
11H3-E5VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-TYYA--YKPFYWGQGVMT VTVSS 121
12G3-E8VH YYAESVKGRFTISRDDSKRSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-VYYGF-SMTPFDYWGQGVMT VTVSS 121
5B1-G2VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLMNSLKEEDTAIYYCRG-LYYG--LFPSDYWGQGVMT VTVSS 121
11D7-C3VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-LYYG--LSPSDYWGQGVMT VTVSS 123
10F4-C10VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLMNSLKEEDTAIYYCRA-VNYG--NYPLDYWGQGVMT VTVSS 121
3H6-D2VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSIYLMNSLKEEDTAIYYCRALTYGY-KRDAMDVGWQGTS VTVSS 121
18G9-H11VH YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTALYCTWRHYYS--SHTMDAWGQGT VTVSS 121
1E6-C9VH YYAESVEGRFTISRDDSKSSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-VYYG--LLGLDAWGQGTS VTVSS 124
20B5-F10VH YYAESVKGRFTISRDDSISSVYLMNSLKEEDTAIYYCRG-VYYG--FLGMDAWGQGTS VTVSS 122
20E5-F10VH YYAESVNGRFTISRDDSKSSIYLMNDNLKEEDSAIYYCRY-VHYGVRFFYTMVWGQGTS VTVSS 124
*****;*****. :*::: *::*: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Фиг. 1

```

11D7-C3VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
1E6-C9VL DVVMTQTPVSLSVRLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWFLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
20B5-F10VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQRLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
4B4-D7VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQRPQSPQVLIYKVSNRF 60
11H3-E5VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHDNGNTYLSWSLQKPGQSPQVLIYKVSNRF 60
11F9-F8VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWSLQKPGQSPQVLIYKVSNRF 60
20G6-F3VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQSLIYKVSNRF 60
20E5-F10VL DVVMTQTPVSLSVSLGDQVSI SCRPSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPHPLIYKVSNRF 60
13H2-C2VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKAGQSPQLLIYKVSNRF 60
3H6-D2 DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
18G9-H11VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
10F4-C10VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWCLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
11F3-B9VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHDNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
16F8-A7VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
18F5-H10VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHTNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
12G3-E8VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQVLIYKVSNRF 60
4E7-C9VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQPLIYKVSNRF 60
5B1-G2VL DVVMTQTPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
13C1-F6VL DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF 60
10E6-G6VL DVVMTQSPVSLSVSLGGQVSI SCRSSQSLVHNNGNTYLSWYLQKPGQSPQVFIYKVSNRF 60
** :*:***** ** :*****. ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
11D7-C3VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
1E6-C9VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
20B5-F10VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
4B4-D7VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
11H3-E5VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
11F9-F8VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
20G6-F3VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVDPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
20E5-F10VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
13H2-C2VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVFYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
3H6-D2 SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
18G9-H11VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVAPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
10F4-C10VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
11F3-B9VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
16F8-A7VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
18F5-H10VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
12G3-E8VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGAGTKLEIK 112
4E7-C9VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGPGTKLEIK 112
5B1-G2VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRLEPDDLGIYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
13C1-F6VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRIEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTRLEIK 112
10E6-G6VL SGISDRFSGSGSGTDFTLKI SRIEPDDLGVYYCGQGTHTYPTFGSGTKLEIK 112
** :*:*****. ** :*****. ** :*****. ** :*****. ** :*****. ** :*****.

```

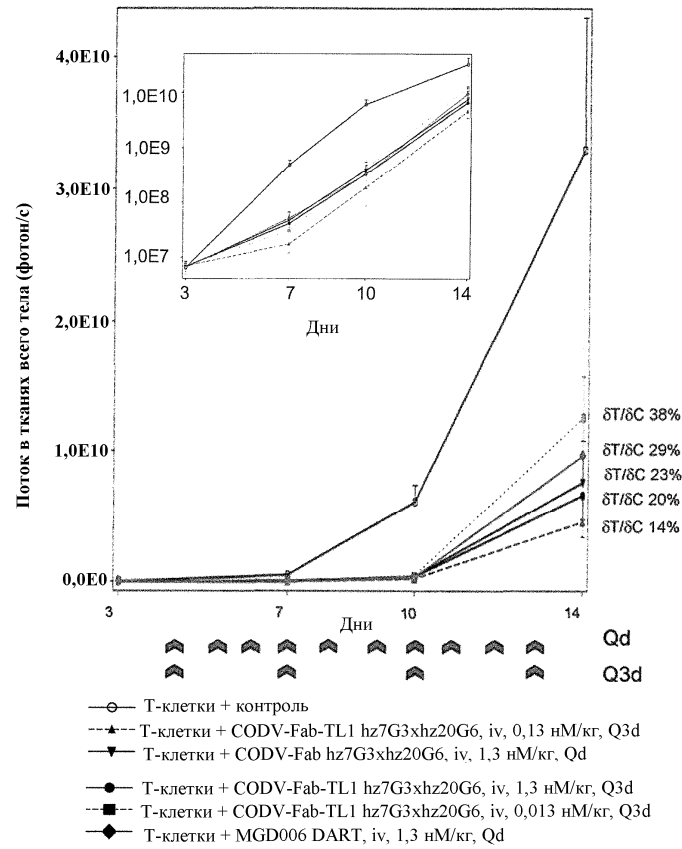
Фиг. 2

1E1-G5VH	QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKAFGYTFTDHIHWWKQSHGKSLIEWIGYINPYSGGTNY	60
9F6-G3VH	QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKASGYTFTDYIHHWWKQSHGKSLIEWIGYINPYSDDGTNY	60
8B11-B7VH	QVQLQESGPTLVNPGDSVKMSCKASGYTFTDHIHWWKQSHGKSLIEWIGYINPYSGGANY	60
6D6-B8VH	QVQLQESGPTLVKPGDSVKMSCKASAYTFTDNIHWWKQSHGKSLDWIGYINPYSGGTNY	60
	*****:*****.***** *****:*****.*:**	
1E1-G5VH	NEKFKSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSEDSAICYCALNYGSYYAMDAGQGTSVTVSS	119
9F6-G3VH	NEKFKSKATLTVDKSTSTAYMEFSRLTSEDSAIYFCALNYGSYYAMDAGQGTSVTVSS	119
8B11-B7VH	NGKFKSKATLTIDKSSSTAYMEFSRLTSGDSAIIYCALNYGSYYAMDAGQGTSVTVSS	119
6D6-B8VH	NGWFRSKATLTVDKSSSTAYMEFSRLTSDSAIIYCALNYGSYYAMDAGQGTSVTVS-	118
	* *:*****:***:***** ***** :*****	
6D6-B8VL	DIQMTQSPASLSASLGFTVTIDCRPSEDIFFNLAWYQQKPGNSPQLLIYDANSLADGVPS	60
9F6-G3VL	DIQMTQSPASLSASLGFTVIECRPSEDIHSNVAWYQQKPGNSPQLLIYDANSLADGVPS	60
1E1-G5VL	DIQMTQSPASLSASLGFTVIECRPSEDIYSNLAWFQKPGSSPQLLIYDANSLADGVPS	60
8B11-B7VL	DIQMTQSPASLSASLGFTVIECRTSKDIYSNLAWFQEPGNSPQLLIYDANSLADGVPS	60
	*****:*****:*.*:*.*:*.*:*.*:*.*****.*****	
6D6-B8VL	RFSGSGSGTQYSLMIIRLQSEDVASYFCHQYNIYPYTFGAGTKLELK	107
9F6-G3VL	RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCHQYNIYPYTFGSGTKLELK	107
1E1-G5VL	RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVASYFCQQYNKYPTFTFGTGKLELK	107
8B11-B7VL	RFSGSGSGTQYSLQINNLQSEDVASYFCHQYNNYPYTFGTGTGLELK	107
	********** * *****	

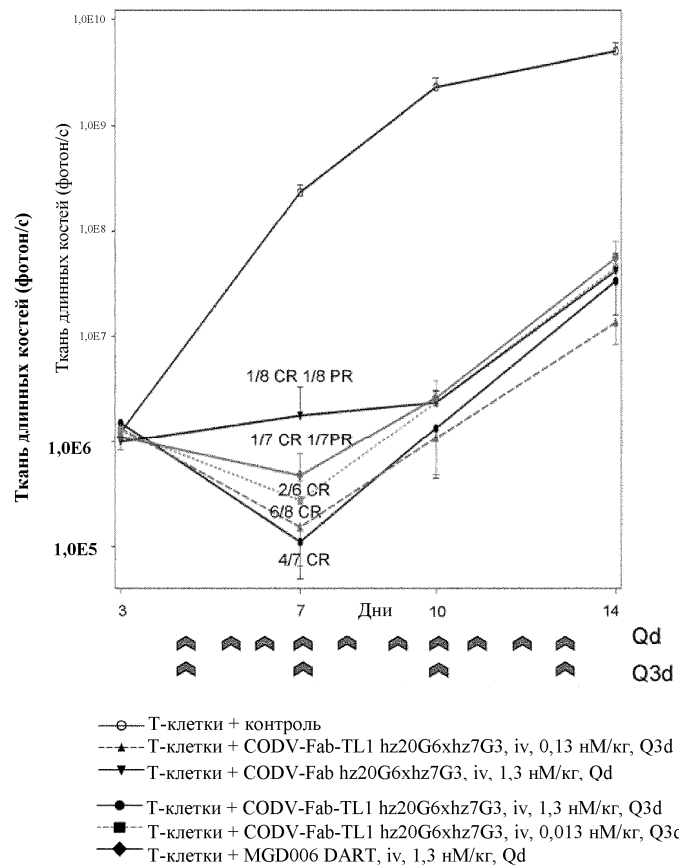
ФИГ. 3

[illegible]

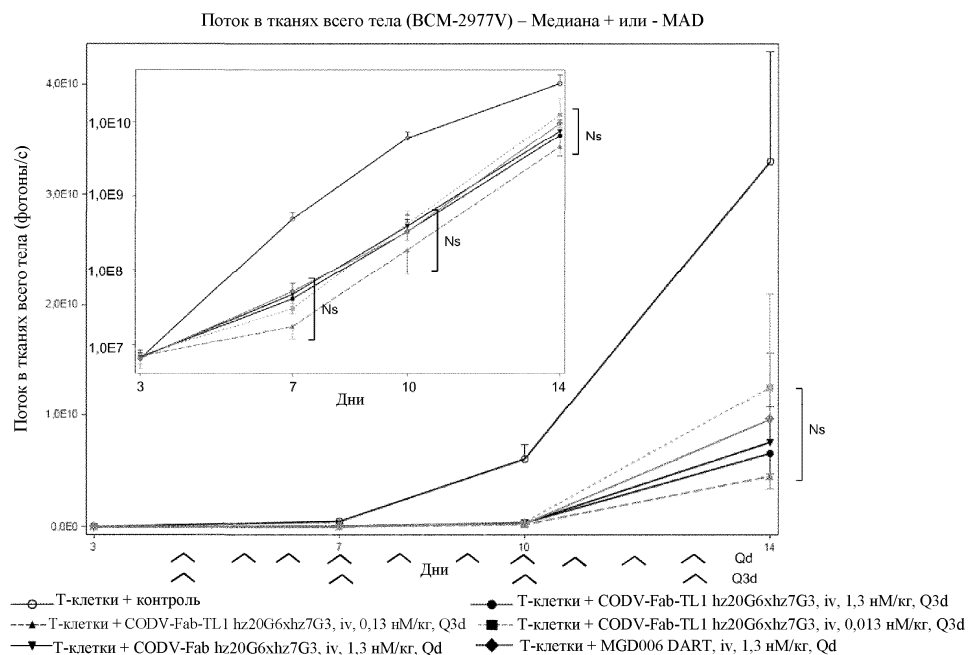
ФИГ. 4



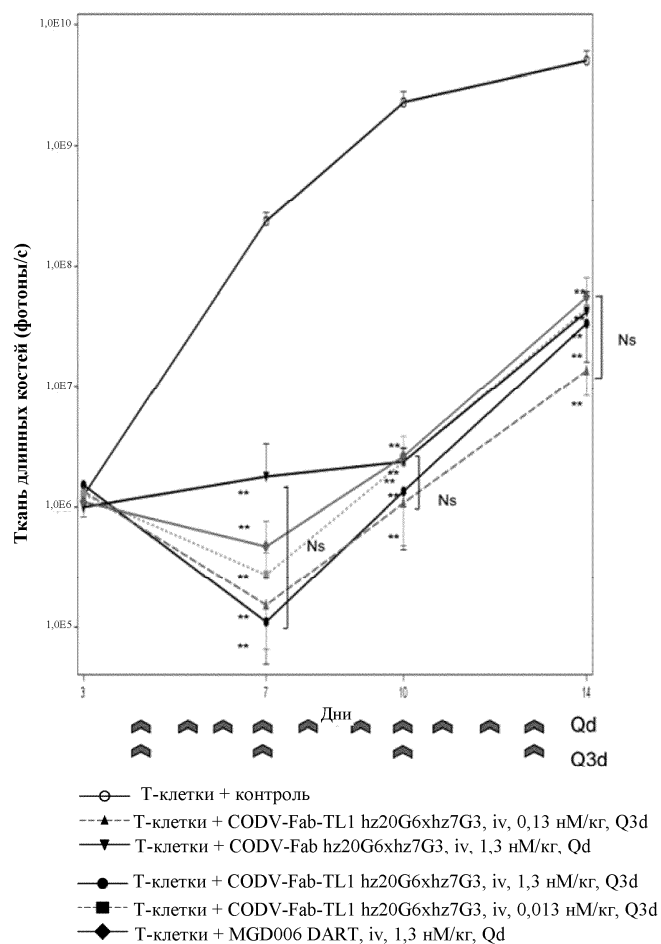
Фиг. 5



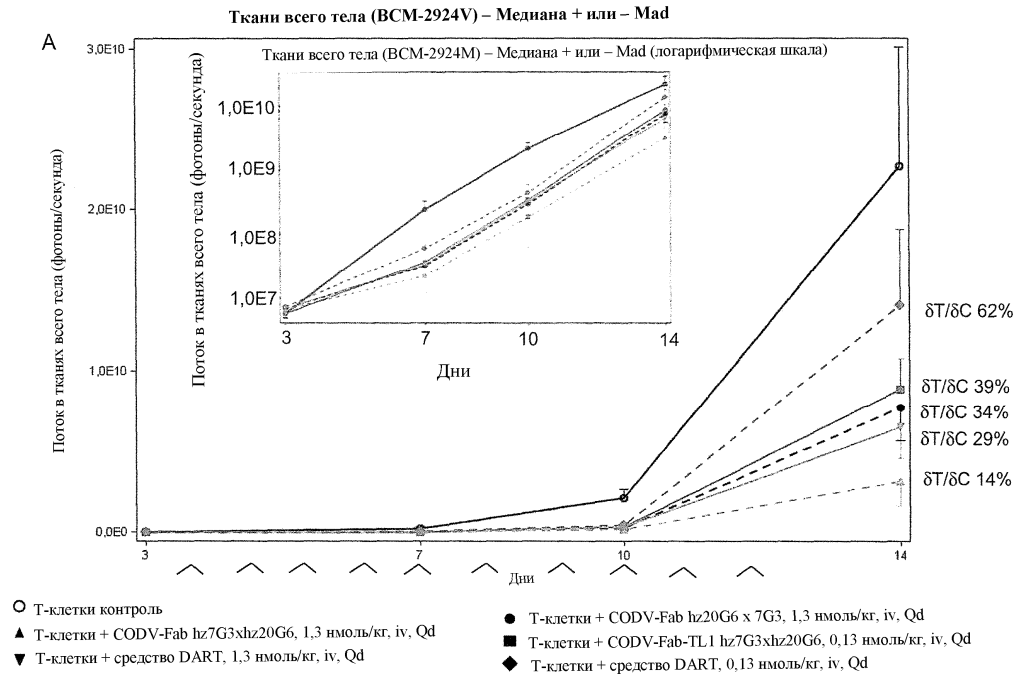
Фиг. 6



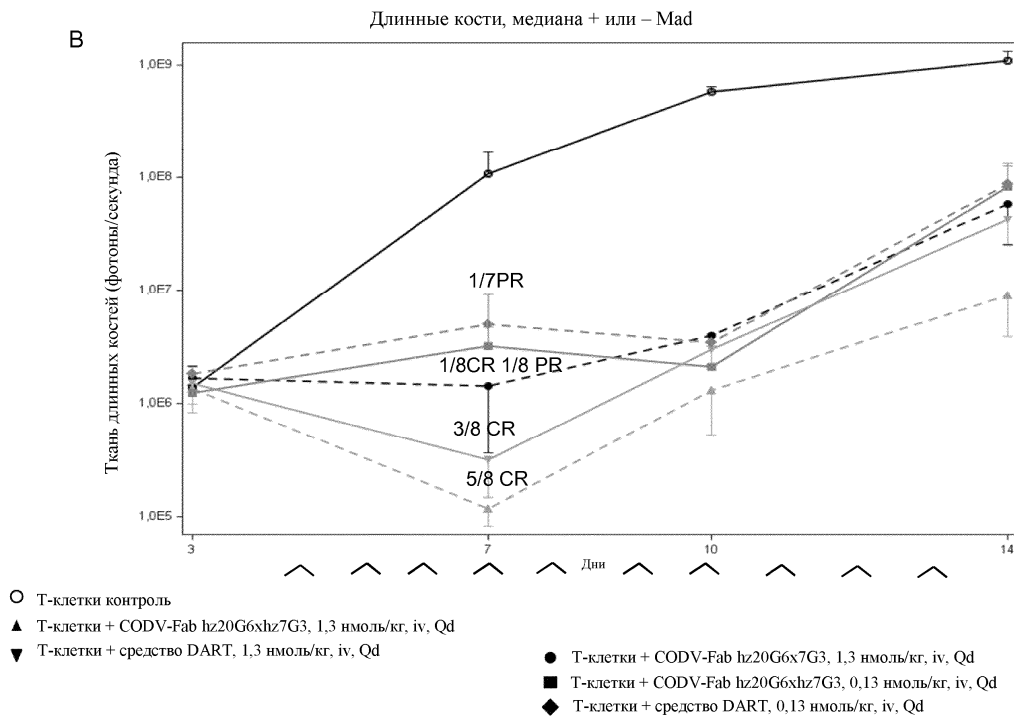
Фиг. 7



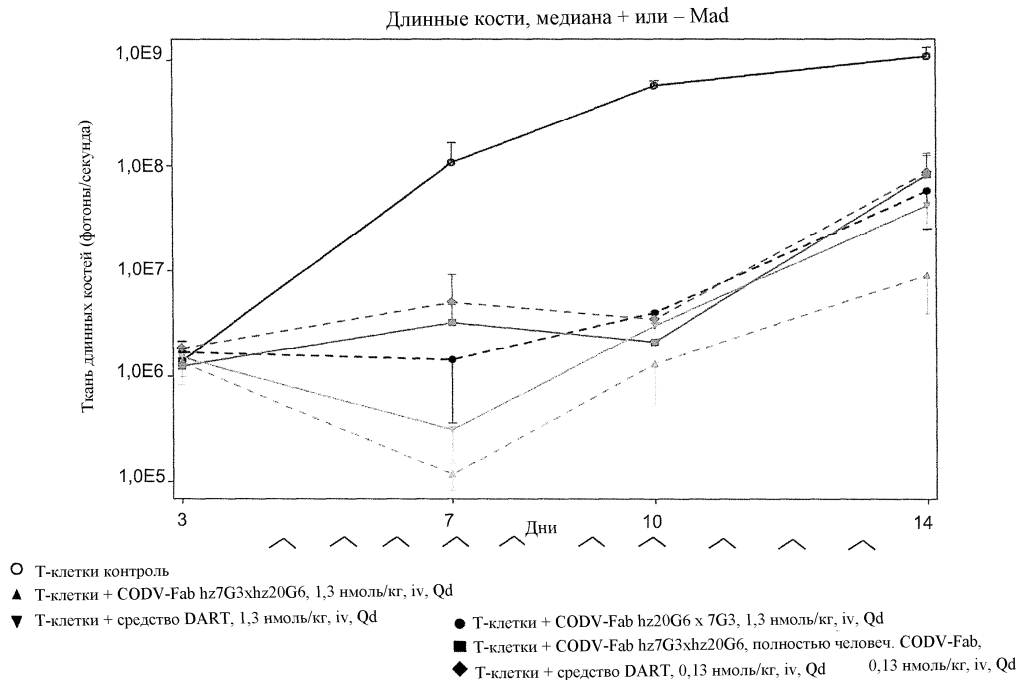
Фиг. 8



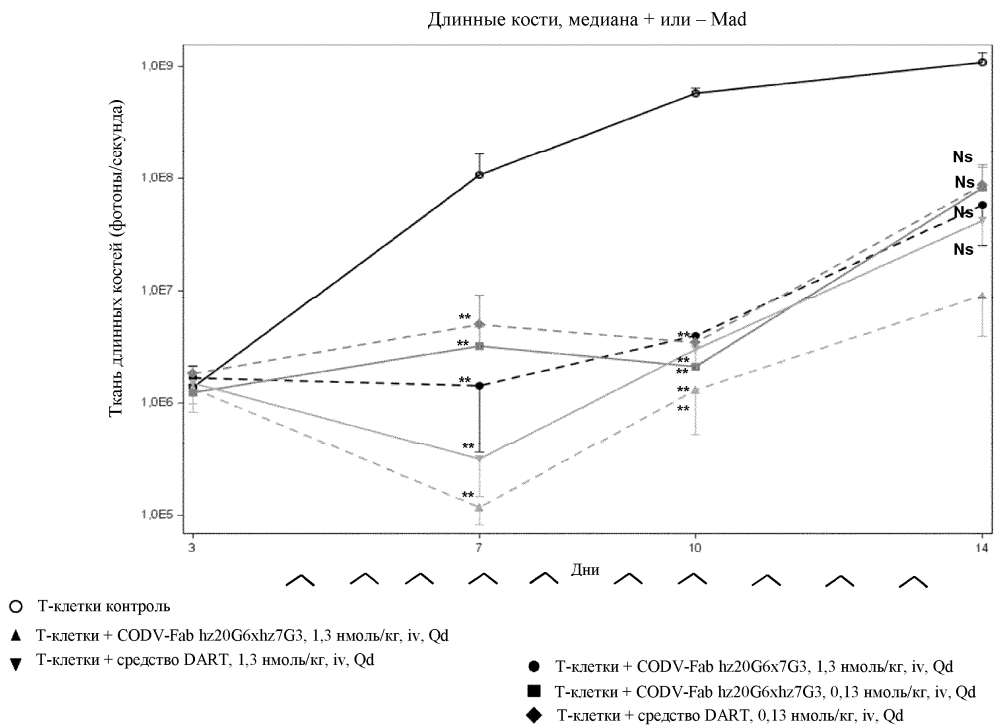
Фиг. 9



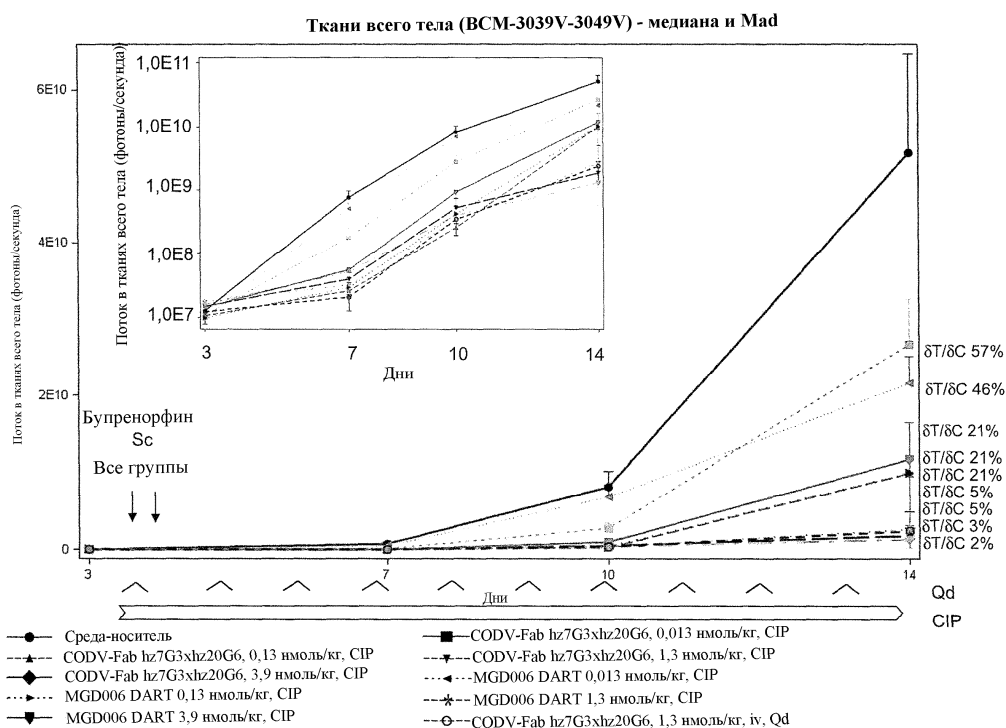
Фиг. 10



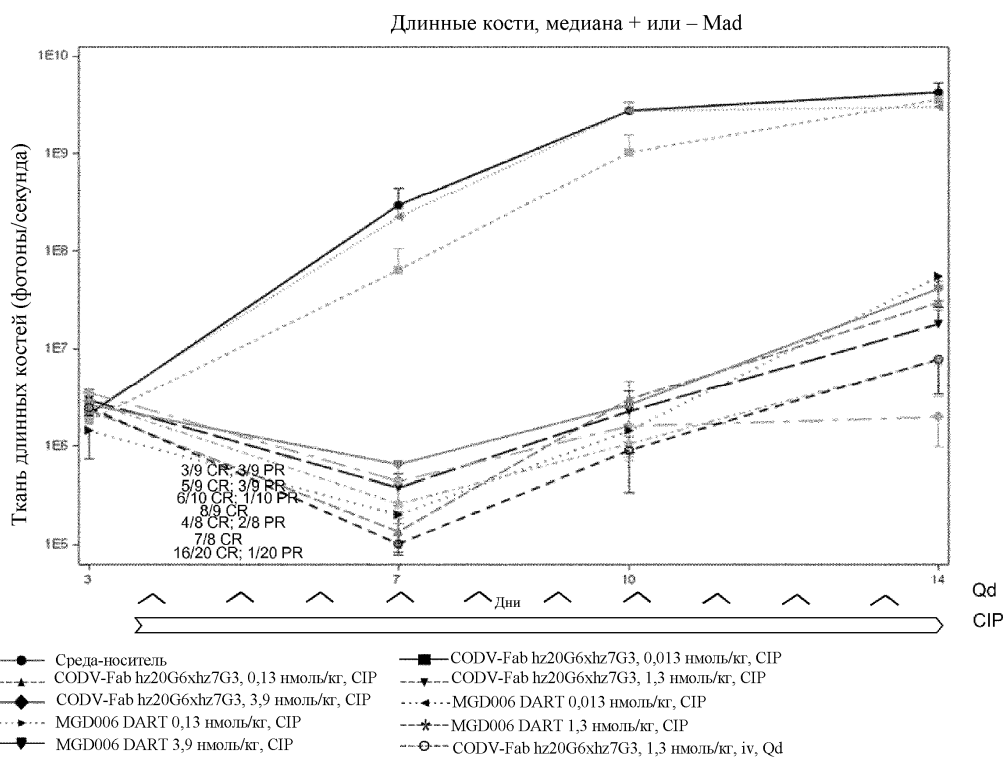
Фиг. 11



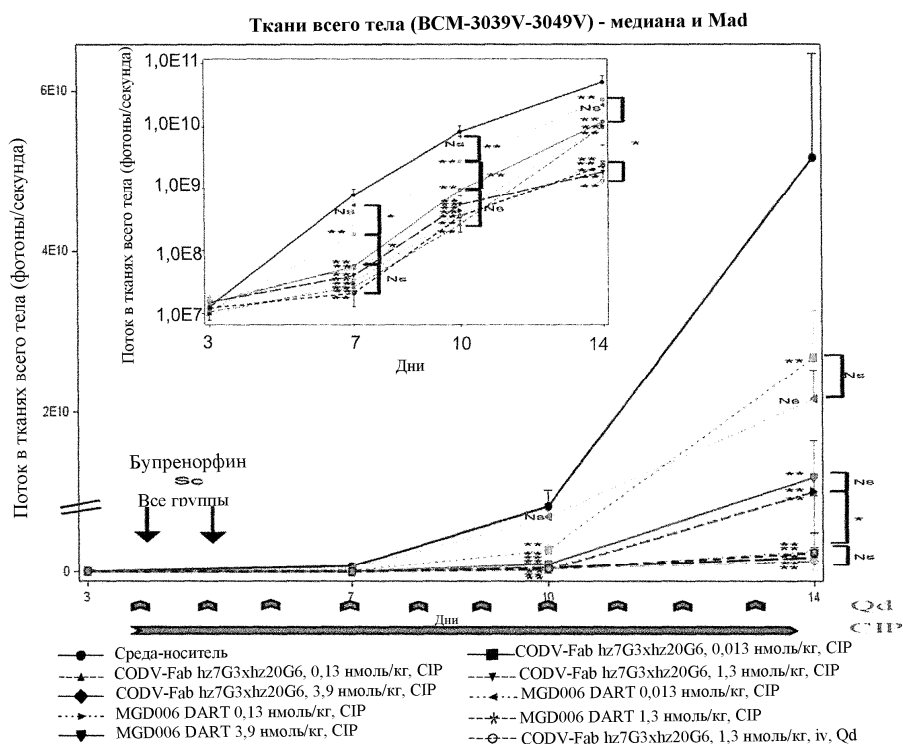
Фиг. 12



Фиг. 13

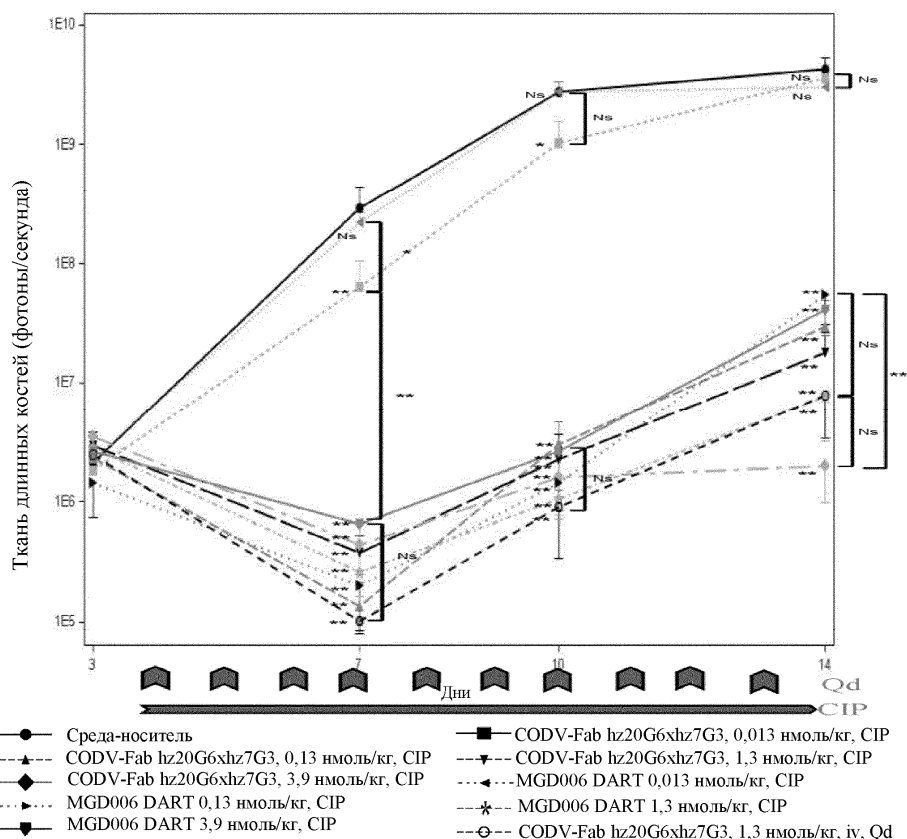


Фиг. 14

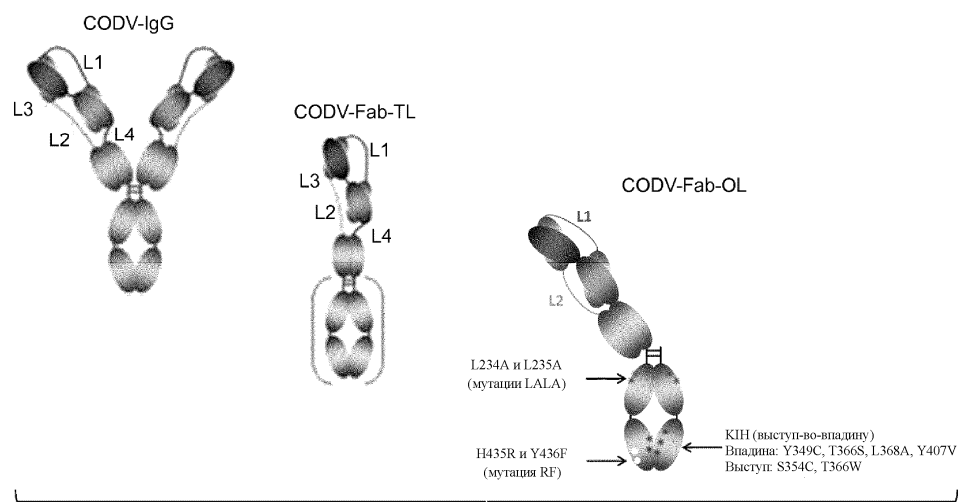


Фиг. 15

Длинные кости, медиана + или – Mad



Фиг. 16



Фиг. 17



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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