



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.14

(21) Номер заявки
202091557

(22) Дата подачи заявки
2018.12.21

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА, СОДЕРЖАЩИЕ ТОЛЬКО ТЯЖЕЛЫЕ ЦЕПИ, КОТОРЫЕ СВЯЗЫВАЮТСЯ С CD22

(31) 62/609,759

(32) 2017.12.22

(33) US

(43) 2020.11.18

(86) PCT/US2018/067299

(87) WO 2019/126756 2019.06.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТЕНЕОБИО, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Альдред Шелли Форс, Ван Схотен
Вим, Огана Хизер Энн Н., Дэйвисон
Лора Мэри, Харрис Кэтрин,
Рангасвами Удай, Тринклеин
Нейтан Д. (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-2017275363
Nathan Trinklein ET AL.: "Abstract LB-090: Sequence-based discovery of fully human anti-CD3 and anti-PDL1 single domain antibodies using novel transgenic rats", Cancer Research, 1 July 2016 (2016-07-01), XP055476414, Retrieved from the Internet: URL: http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/14_Supplement/LB-090 [retrieved on 2018-05-17], abstract

Ben Buelow ET AL.: "Development of a fully human T cell engaging bispecific antibody for the treatment of multiple myeloma", 2 June 2017 (2017-06-02), page 1, XP055476656, Retrieved from the Internet: URL: http://www.teneobio.com/wp-content/uploads/2018/01/Poster_1.pdf [retrieved on 2018-05-18], the whole document

JANSSENS RICK ET AL.: "Generation of heavy-chain-only antibodies in mice", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 103, no. 41, 10 October 2006 (2006-10-10), pages 15130-15135, XP002494537, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0601108103, See e.g. the abstract

CHIUAN LEOW ET AL.: "Single Domain Antibodies as New Biomarker Detectors", DIAGNOSTICS: OPEN ACCESS JOURNAL, vol. 7, no. 4, 1 December 2017 (2017-12-01), page 52, XP055574908, CH ISSN: 2075-4418, DOI: 10.3390/diagnostics7040052, The whole document but see e.g. the abstract or section 5.1

AMIRI SOLMAZ AGHA ET AL.: "A novel anti-CD22 scFv-apoptin fusion protein induces apoptosis in malignant B-cells", AMB EXPRESS, vol. 7, 2 June 2017 (2017-06-02), XP009512235, see e.g. the abstract

ZAREI NAJMEH ET AL.: "High efficient expression of a functional humanized single-chain variable fragment (scFv) antibody against CD22 in Pichia pastoris", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 98, no. 24, December 2014 (2014-12), pages 10023-10039, XP009512236, see e.g. the abstract

US-A1-2017174770

FARAJI FATEMEH ET AL.: "Development and characterization of a camel id single-domain antibody directed to human CD22 biomarker", BIOTECHNOLOGY AND APPLIED BIOCHEMISTRY, vol. 65, no. 5, September 2018 (2018-09), pages 718-725, XP009512221, see e.g. the abstract

WO-A1-2018039180

(57) В изобретении раскрыты антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи (UniAbs™), наряду со способами получения таких антител, композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, и их применение для лечения В-клеточных расстройств, характеризующихся экспрессией CD22.

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/609759, поданной 22 декабря 2017 г., описание которой включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Область техники

Данное изобретение относится к антителам человека, содержащим только тяжелые цепи, (например, UniAbs™), которые связываются с CD22. Данное изобретение также относится к способам получения таких антител, композициям, включая фармацевтические композиции, содержащие такие антитела, и их применению для лечения В-клеточных расстройств, которые характеризуются экспрессией CD22.

Уровень техники

CD22.

CD22, также известный как SIGLEC-2 (UniProt P20273), является рецептором клеточной поверхности, который экспрессируется на зрелых В-клетках. CD22 содержит несколько доменов Ig и является членом суперсемейства иммуноглобулинов. Внеклеточный домен CD22 взаимодействует с фрагментами сиаловой кислоты, включая те, которые присутствуют на белке клеточной поверхности CD45. Считается, что CD22 функционирует как ингибиторный рецептор для сигналинга В-клеточных рецепторов. Наряду с CD20 и CD19, ограниченная экспрессия В-клеток CD22 делает его привлекательной мишенью для терапевтического лечения В-клеточных злокачественных новообразований. Моноклональные антитела, специфичные к CD22, были описаны в литературе (например, Jabbour, Elias, et al. "Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia." *Blood* 125.26 (2015): 4010-4016) и терапевтически использовались в качестве стандартных препаратов моноклональных антител (например, эспратузумаба), а также в качестве конъюгатов антитело-лекарственное средство (инотузумаб озогамидин). Кроме того, в клинической практике для лечения лейкемии использовались Т-клетки анти-CD22 химерного антигенного рецептора (Fry, Terry J., et al. "CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy." *Nature medicine* (2017)).

Антитела, содержащие тяжелые цепи.

В обычном антителе IgG, ассоциация тяжелой цепи и легкой цепи частично обусловлена гидрофобным взаимодействием между константной областью легкой цепи и константным доменом CH1 тяжелой цепи. В областях тяжелой цепи каркаса 2 (FR2) и каркаса 4 (FR4) имеются дополнительные остатки, которые также способствуют этому гидрофобному взаимодействию между тяжелой и легкой цепями.

Известно, однако, что сыворотка верблюдовых (подотряд Tylopoda, который включает верблюдов, дромадеров и лам) содержит основной тип антител, состоящих исключительно из парных H-цепей (антитела, содержащие только тяжелые цепи или UniAbs™). UniAbs™ Camelidae (*Camelus dromedarius*, *Camelus bactrianus*, *Lama glama*, *Lama guanaco*, *Lama alpaca* и *Lama vicugna*) имеют уникальную структуру, состоящую из одного вариабельного домена (VHH), шарнирной области и двух константных доменов (CH2 и CH3), которые высокоомологичны доменам CH2 и CH3 классических антител. Данные UniAbs™ не имеют первого домена константной области (CH1), который присутствует в геноме, но подвергается сплайсингу во время процессинга мРНК. Отсутствие домена CH1 объясняет отсутствие легкой цепи в UniAbs™, поскольку этот домен является местом закрепления константного домена легкой цепи. Такие UniAbs™ естественным образом эволюционировали для придания антигенсвязывающей специфичности и высокой аффинности тремя CDR из обычных антител или их фрагментов (Muyldermans, 2001; *J Biotechnol* 74:277-302; Revets et al., 2005; *Expert Opin Biol Ther* 5:111-124). Хрящевые рыбы, такие как акулы, также выработали особый тип иммуноглобулина, обозначенный как IgNAR, который лишен легких полипептидных цепей и полностью состоит из тяжелых цепей. Молекулами IgNAR можно манипулировать с помощью молекулярной инженерии для получения вариабельного домена полипептида с одной тяжелой цепью (vNAR) (Nuttall et al. *Eur. J. Biochem.* 270, 3543-3554 (2003); Nuttall et al. *Function and Bioinformatics* 55, 187-197 (2004); Dooley et al., *Molecular Immunology* 40, 25-33 (2003)).

Способность антител, содержащих только тяжелые цепи, лишенных легкой цепи, связывать антиген была установлена в 1960-х годах (Jaton et al. (1968) *Biochemistry*, 7, 4185-4195). Тяжелая цепь иммуноглобулина, физически отделенная от легкой цепи, сохранила 80% антигенсвязывающей активности относительно тетрамерного антитела. Sitia et al. (1990) *Cell*, 60, 781-790 продемонстрировали, что удаление домена CH1 из перегруппированного гена μ мыши приводит к получению антитела, содержащего только тяжелые цепи, лишенного легкой цепи, в клеточной культуре млекопитающих. Вырабатываемые антитела сохраняли специфичность связывания VH и эффекторные функции.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, с высокой специфичностью и аффинностью могут создаваться против различных антигенов посредством иммунизации (van der Linden, R. H., et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1431, 37-46 (1999)), а часть VHH может быть легко клонирована и экспрессирована в дрожжах (Frenken, L. G. J., et al. *J. Biotechnol.* 78, 11-21 (2000)). Их уровни экспрессии, растворимости и стабильности значительно выше, чем у классических фрагментов F(ab) или Fv (Ghahroudi, M. A. et al. *FEBS Lett.* 414, 521-526 (1997)).

Мыши, у которых λ (лямбда) локус легкой (L)-цепи и/или λ и κ (каппа) локусы L-цепи были функ-

ционально подавлены, и антитела, продуцируемые такими мышами, описаны в патентах США № 7541513 и 8367888. Рекомбинантное продуцирование антител, содержащих только тяжелые цепи, у мышей и крыс было описано, например, в WO 2006008548; публикации заявки на патент США № 20100122358; Nguyen et al., 2003, Immunology; 109(1), 93-101; Brüggemann et al., Crit. Rev. Immunol; 2006, 26(5):377-90; and Zou et al., 2007, J Exp Med; 204(13): 3271-3283. Получение нокаутных крыс с помощью микроинъекций эмбрионам цинк-пальцевой нуклеазы описано в Geurts et al., 2009, Science, 325(5939):433. Растворимые антитела, содержащие только тяжелые цепи, и трансгенные грызуны, содержащие гетерологичный локус тяжелой цепи, продуцирующий такие антитела, описаны в патентах США № 8883150 и 9365655. Структуры CAR-T, содержащие однодоменные антитела в качестве связывающего (нацеливающего) домена, описаны, например, в Iri-Sofla et al., 2011, Experimental Cell Research 317:2630-2641 и Jamnani et al., 2014, Biochim Biophys Acta, 1840:378-386.

Сущность изобретения

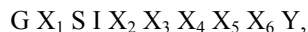
Аспекты изобретения относятся к антителам, содержащим только тяжелые цепи, включая, без ограничения, UniAbs™, с аффинностью связывания к CD22. Дополнительные аспекты изобретения относятся к способам получения таких антител, композициям, содержащим такие антитела, и их применению для лечения В-клеточных расстройств, которые характеризуются экспрессией CD22.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержащее только тяжелые цепи, которое связывается с CD22, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (a) CDR1, имеющую две или менее замены в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10, и/или (b) CDR2, имеющую две или менее замены в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-17, и/или (c) CDR3, имеющую две или менее замены в любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 18-23. В некоторых вариантах осуществления последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 присутствуют в каркасе человека. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, дополнительно содержит последовательность константной области тяжелой цепи в отсутствие последовательности CH1.

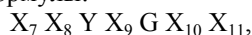
В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10, и/или (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-17, и/или (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит: (a) последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-10, и (b) последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 11-17, и (c) последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит: (a) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 или (b) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 19, или (c) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 24-84. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 24-84. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое связывается с CD22, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую (a) последовательность CDR1 формулы:



где X_1 представляет собой D или G; X_2 представляет собой S, T, I или N; X_3 представляет собой S или D; X_4 представляет собой G, S или N; X_5 представляет собой D, G или S, а X_6 представляет собой Y или H; и (b) последовательность CDR2 формулы:



где X_7 представляет собой I или V; X_8 представляет собой Y или H; X_9 представляет собой S или T; X_{10} представляет собой A, V или S, а X_{11} представляет собой T или A; и (c) последовательность CDR3 формулы:



где X_{12} представляет собой T, A или K; X_{13} представляет собой D или E, а X_{14} представляет собой N или S.

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое связывается с CD22, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасе VH человека, причем последовательности CDR представляют собой последовательности, имеющие две или менее замены в последовательности CDR, выбранной из группы, состоящей

из SEQ ID NO: 1-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасе VH человека, причем последовательности CDR выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-23.

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое связывается с CD22, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую: (а) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18 или (b) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 19, или (с) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20 в каркасе VH человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, является мультиспецифичным. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, является биспецифичным. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет аффинность связывания с двумя различными белками CD22. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет аффинность связывания с двумя разными эпитопами на одном и том же белке CD22. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет аффинность связывания с эффекторной клеткой. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет аффинность связывания с Т-клеточным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет аффинность связывания с CD3. В некоторых вариантах осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, имеет формат CAR-T.

Аспекты изобретения относятся к фармацевтическим композициям, содержащим антитело, содержащее только тяжелые цепи, как описано в данном документе.

Аспекты изобретения относятся к способам лечения В-клеточного расстройства, характеризующегося экспрессией CD22, включающим введение субъекту с указанным расстройством антитела или фармацевтической композиции, как описано в данном документе. В определенных других аспектах изобретение относится к применению антитела, описанного в данном документе, при получении лекарственного средства для лечения В-клеточного расстройства, характеризующегося экспрессией CD22. В еще других аспектах изобретение относится к антителу, описанному в данном документе, для применения в лечении В-клеточного расстройства, характеризующегося экспрессией CD22. Что касается данных аспектов, и в некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ). В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ). В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой системную красную волчанку (СКВ). В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой ревматоидный артрит (РА). В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой рассеянный склероз (РС).

Аспекты изобретения относятся к полинуклеотидам, кодирующим антитело, описанное в данном документе, векторам, содержащим такие полинуклеотиды, и клеткам, содержащим такие векторы.

Аспекты изобретения относятся к способам получения антитела, описанным в данном документе, включающим выращивание клетки, описанной в данном документе, в условиях, благоприятных для экспрессии антитела, и выделение антитела из клетки.

Аспекты изобретения относятся к способам получения антитела, описанным в данном документе, включающим иммунизацию животного UniRat при помощи CD22 и идентификацию CD22-связывающих последовательностей тяжелой цепи.

Данные и другие аспекты будут дополнительно объяснены в остальной части раскрытия, включая примеры.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны уникальные аминокислотные последовательности CDR антитела к CD22, содержащего только тяжелые цепи.

На фиг. 2 показаны аминокислотные последовательности вариабельного домена антитела к CD22, содержащего только тяжелые цепи.

На фиг. 3 показаны аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антитела к CD22, содержащего только тяжелые цепи.

На фиг. 4 показана биологическая активность антитела к CD22, содержащего только тяжелые цепи.

На фиг. 5A представлен график, изображающий процент специфического лизиса как функцию концентрации антител для клеток Daudi.

На фиг. 5B представлен график, изображающий процент специфического лизиса как функцию концентрации антител для клеток Raji.

На фиг. 5C представлен график, изображающий процент специфического лизиса как функцию концентрации антител для клеток Ramos.

На фиг. 5D представлена схематическая иллюстрация биспецифичного антитела к CD22xCD3 в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения.

На фиг. 6 представлена серия графиков, показывающих титр сыворотки как функцию разбавления.

Детальное описание предпочтительных вариантов осуществления

При практической реализации настоящего изобретения применяют, если не указано иное, традиционные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие способы подробно описаны в литературе, например, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); и Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988).

Когда приводится диапазон значений, следует понимать, что данное изобретение охватывает каждое промежуточное значение с точностью до десятого знака нижнего предела, если в контексте явно не указано иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона, а также любое другое указанное или промежуточное значение в таком указанном диапазоне. Верхний и нижний пределы данных меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также включены в данное изобретение с учетом любого специальным образом исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключающие один или оба этих включенных предела, также включены в данное изобретение.

Если не указано иное, остатки антител в данном документе нумеруются в соответствии с системой нумерации Kabat (e.g., Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Для обеспечения полного понимания настоящего изобретения в нижеследующем подробном описании изложены многочисленные конкретные детали. Однако для специалиста в данной области техники будет очевидно, что настоящее изобретение может применяться на практике и без одной или более указанных конкретных деталей. В других случаях общеизвестные отличительные признаки и процедуры, хорошо известные специалистам в данной области техники, не были описаны во избежание затруднения понимания изобретения.

Все приведенные в настоящем документе ссылки, включая патентные заявки и публикации, включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

I. Определения.

Под термином "содержащий" подразумевается, что перечисленные элементы требуются для композиции/способа/набора, однако для формирования композиции/способа/набора и т.д. в рамках формулы изобретения могут быть включены и другие элементы.

Под термином "состоящий по существу из" подразумевается ограничение рамок описанной композиции или способа указанными материалами или поэтапными действиями, не оказывающими существенного влияния на основную и новую характеристику(-и) объекта изобретения.

Под термином "состоящий из" подразумевается исключение любого элемента, поэтапного действия или ингредиента, не указанного в формуле изобретения, из композиции, способа или набора.

Остатки антител в данном документе пронумерованы в соответствии с системой нумерации Kabat и системой нумерации EU. Система нумерации Kabat обычно используется для обозначения остатка в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Система нумерации EU" или "индекс EU" обычно используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU, описанный в Kabat et al., выше). "Индекс EU в соответствии с Kabat" относится к нумерации остатков EU человеческого антитела IgG1. Если не указано иное, то в данном документе ссылки на номера остатков в вариабельном домене антител означают нумерацию остатков в соответствии с системой нумерации Kabat. Если не указано иное, то в данном документе ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков в соответствии с системой нумерации EU.

Термин "моноклональное антитело" в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов обычных (поликлональных) антител, которые обычно включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одиночной детерминанты на антигене. Моноклональные антитела в соответствии с данным изобретением могут быть получены гибридомным способом, впервые описанным Kohler et al. (1975) Nature 256:495, также могут быть получены, например, способами получения рекомбинантного белка (см., например, патент США № 4816567).

Термин "вариабельный", в контексте данного документа, в связи с антителами относится к тому факту, что последовательности некоторых частей вариабельных доменов антитела сильно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время вариабельность не является равномерно распределенной по вариабельным доменам антител. Она сосредоточена в трех сегментах вариабельных доменов как легкой, так и тяжелой цепи, называемых гипервариабельными областями. Более консервативные фрагменты вариабельных доменов называются каркасными областями (FR). Вариабельные домены нативных легких и тяжелых цепей содержат по четыре FR, преимущественно принимающих конфигурацию β -листа и соединенных тремя гипервариабельными областями, образующими петли, соединяющие структуры β -типа, а в некоторых случаях, являющиеся их частью. Гипервариабельные области каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости FR и, вместе с гипервариабельными областями другой цепи, участвуют в образовании антиген-связывающего сайта антител (см. Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ).

Термин "гипервариабельная область" при применении в данном документе, относится к аминокислотным остаткам антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область обычно содержит аминокислотные остатки из "области, определяющей комплементарность" или "CDR" (например, остатки 31-35 (H1), 50-65 (H2) и 95-102 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) и/или остатки из остатков "гипервариабельной петли" 26-32 (H1), 53-55 (H2) и 96-101 (H3) в вариабельном домене тяжелой цепи; Chothia и Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Каркасная область" или остатки "FR", как определено в данном документе, представляют собой остатки гипервариабельной области, отличные от остатков вариабельного домена.

Примерные обозначения CDR показаны в данном документе, однако специалисту в данной области техники будет понятно, что обычно используется ряд определений CDR, включая определение по Kabat (см. "Zhao et al. A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions." *Mol Immunol.* 2010;47:694-700), которое основано на изменчивости последовательности и является наиболее часто используемым. Определение по Chothia основано на расположении областей замкнутой структуры (Chothia et al. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions." *Nature.* 1989; 342:877-883). Представляющие интерес альтернативные определения CDR включают, без ограничения, те, которые раскрыты Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool." *J Mol Biol.* 2001;309:657-670; Ofran et al. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes." *J Immunol.* 2008;181:6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires." *J Mol Recognit.* 2004;17:132-143; и Padlan et al. "Identification of specificity-determining residues in antibodies." *Faseb J.* 1995;9:133-139., содержание каждого из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

Термины "антитело, содержащее только тяжелые цепи", "антитело с тяжелыми цепями" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся в самом широком смысле к антителам, в которых отсутствует легкая цепь обычного антитела. Термины, в частности, включают, без ограничения, гомодимерные антитела, содержащие антигенсвязывающий домен VH и константные домены CH2 и CH3, в отсутствие домена CH1; функциональные (антигенсвязывающие) варианты таких антител, растворимые варианты VH, Ig-NAR, содержащие гомодимер одного вариабельного домена (V-NAR) и пяти С-подобных константных доменов (C-NAR), и их функциональные фрагменты; и растворимые однодоменные антитела (sUniDabs™). В одном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена вариабельной области, состоящего из каркаса 1, CDR1, каркаса 2, CDR2, каркаса 3, CDR3 и каркаса 4. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена по меньшей мере части шарнирной области и доменов CH2, и CH3. В другом варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена по меньшей мере части шарнирной области и домена CH2. В дополнительном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи, состоит из антигенсвязывающего домена, по меньшей мере части шарнирной области и домена CH3. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, у которых домен CH2 и/или CH3 усечен, также включены в данный документ. В дополнительном варианте осуществления тяжелая цепь состоит из антигенсвязывающего домена и по меньшей мере одного домена CH (CH1, CH2, CH3 или CH4), но без шарнирной области. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может быть в форме димера, в котором две тяжелые цепи дисульфидно связаны друг с другом, ковалентно или нековалентно связаны друг с другом. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, может принадлежать к подклассу IgG, но также в данном документе

включены антитела, относящиеся к другим подклассам, таким как подкласс IgM, IgA, IgD и IgE. В конкретном варианте осуществления антитело, содержащее только тяжелые цепи имеет подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, в частности подтип IgG1. В одном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, в данном документе используются в качестве связывающего (нацеливающего) домена химерного антигенного рецептора (CAR). Определение, в частности, включает антитела человека, содержащие только тяжелые цепи, называемые UniAbs™, продуцируемые трансгенными крысами с иммуноглобулином человека (UniRat™). Вариабельные области (VH) UniAbs™ называют UniDabs™, и являются универсальными строительными блоками, которые могут быть связаны с областями Fc или сывороточным альбумином для разработки новых терапевтических средств с мультиспецифичностью, повышенной эффективностью и увеличенным периодом полужизни. Поскольку гомодимерные UniAbs™ лишены легкой цепи и, следовательно, домена VL, антиген распознается одним единственным доменом, то есть вариабельным доменом тяжелой цепи антитела, содержащего только тяжелые цепи (VH).

Термины "CD22" и "кластер дифференцировки-22" используемые в данном документе относятся к молекуле лектинов семейства SIGLEC, обнаруживаемой на поверхности зрелых В-клеток и в меньшей степени в некоторых незрелых В-клетках. Термин "CD22" включает белок CD22 человека и любого вида животных, отличных от человека, и, в частности, включает CD22 человека, а также CD22 млекопитающих, отличных от человека.

Используемый в данном документе термин "CD22 человека" включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи CD22 человека (UniProt P20273) независимо от их источника или способа получения. Таким образом, "CD22 человека" включает CD22 человека, естественно экспрессируемый клетками, и CD22, экспрессируемый в клетках, трансфицированных геном CD22 человека.

Термины "анти-CD22 антитело, содержащее только тяжелые цепи", "антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи", "анти-CD22 антитело, содержащее тяжелые цепи" и "антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения антитела, содержащего только тяжелые цепи, как определено выше, для иммуноспецифического связывания с CD22, включая CD22 человека, как определено выше. Определение включает, без ограничения, антитела человека, содержащие только тяжелые цепи, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или трансгенные мыши, экспрессирующие иммуноглобулин человека, включая UniRats™, продуцирующие антитела UniAb™ к CD22 человека, как определено выше.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" в отношении эталонной полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны с аминокислотными остатками в эталонной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения в случае необходимости гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательности, и не считая любые консервативные замены частью идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной последовательности может быть выполнено различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Для целей данного документа, тем не менее, значения % идентичности аминокислотной последовательности получены с использованием программы для сравнения последовательностей ALIGN-2.

"Выделенным" антителом является такое, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонента его естественной среды. Загрязняющий компонент естественного окружения представляет собой вещества, которые влияют на диагностическое или терапевтическое применение антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных вариантах осуществления антитело будет очищено (1) до более 95% по массе антитела, как определено методом Лоури, и наиболее предпочтительно более 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя секвенатор с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности (SDS-PAGE) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием красителя Кумасси синего или, предпочтительнее, красителя на основе серебра. Выделенное антитело включает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

Антитела по настоящему изобретению включают мультиспецифичные антитела. Мультиспецифичные антитела имеют более чем одну специфичность связывания. Термин "мультиспецифичный", в частности, включает "биспецифичный" и "триспецифичный", а также аффинность независимого специфического связывания высшего порядка, такую как полиэпитопная специфичность высшего порядка, а также тетравалентные антитела и фрагменты антител. "Мультиспецифичные" антитела, в частности, включают

антитела, содержащие комбинацию различных связывающих объектов, а также антитела, содержащие более чем один и тот же связывающий объект. Термины "мультиспецифичное антитело", "мультиспецифичное антитело, содержащее только тяжелые цепи", "мультиспецифическое антитело, содержащее тяжелые цепи" и "мультиспецифичное UniAb™" используются в данном документе в самом широком смысле и охватывают все антитела с более чем одной специфичностью связывания. Мультиспецифичные антитела к CD22, содержащие тяжелые цепи, по данному изобретению, в частности, включают антитела, иммуноспецифически связывающиеся с более чем одним неперекрывающимся эпитопом на белке CD22, таким как CD22 человека.

"Эпитоп" представляет собой участок на поверхности молекулы антигена, с которым связывается одна молекула антитела. Обычно антиген имеет несколько или много разных эпитопов и вступает в реакцию со многими различными антителами. Термин, в частности, включает линейные эпитопы и конформационные эпитопы.

"Эпитопное картирование" представляет собой процесс идентификации сайтов связывания или эпитопов антител на их целевых антигенах. Эпитопы антител могут быть линейными или конформационными эпитопами. Линейные эпитопы образованы непрерывной последовательностью аминокислот в белке. Конформационные эпитопы образуются из аминокислот, которые являются прерывистыми в последовательности белка, но которые объединяются при сворачивании белка в его трехмерную структуру.

Термин "полиэпитопная специфичность" относится к способности специфически связываться с двумя или более различными эпитопами на одной или разных мишенях. Как отмечено выше, данное изобретение, в частности, включает антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, с полиэпитопной специфичностью, то есть антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, связывающиеся с двумя или более неперекрывающимися эпитопами на белке CD22, таком как CD22 человека. Термин "неперекрывающийся эпитоп(ы)" или "неконкурентный эпитоп(ы)" антигена определяется в данном документе как означающий эпитоп(ы), которые распознаются одним членом пары антигенспецифичных антител, но не другим членом. Пары антител или антигенсвязывающие области, нацеленные на один и тот же антиген на мультиспецифичном антителе, распознающие неперекрывающиеся эпитопы, не конкурируют за связывание с этим антигеном и способны связывать этот антиген одновременно.

Антитело связывает "по существу тот же эпитоп", что и эталонное антитело, когда два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Наиболее широко используемыми и быстрыми способами для определения того, связываются ли два эпитопа с идентичными или стерически перекрывающимися эпитопами, являются анализы конкурентного связывания, которые могут быть сконфигурированы во всем количестве различных форматов с использованием либо меченого антигена, либо меченого антитела. Обычно антиген иммобилизуют в 96-луночной планшете, и способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител измеряют с использованием радиоактивных или ферментных меток.

Термин "валентный", в контексте настоящего документа, относится к указанному количеству сайтов связывания в молекуле антитела.

"Поливалентное" антитело имеет два или более сайтов связывания. Таким образом, термины "двухвалентный", "трехвалентный" и "четырёхвалентный" относятся к наличию двух сайтов связывания, трех сайтов связывания и четырех сайтов связывания, соответственно. Таким образом, биспецифичное антитело по изобретению является по меньшей мере двухвалентным и может быть трехвалентным, четырехвалентным или иным образом поливалентным.

Известно большое разнообразие способов и конфигураций белка и используется для получения биспецифичных моноклональных антител (BsMAB), триспецифичных антител и тому подобного.

Термин "биспецифичная трехцепочечная антителоподобная молекула" или "ТСА" используется в настоящем документе для обозначения антителоподобных молекул, включающих, состоящих по существу или состоящих из трех полипептидных субъединиц, две из которых содержат, состоят по существу из или состоят из одной тяжелой и одной легкой цепи моноклонального антитела, или функциональных антигенсвязывающих фрагментов таких цепей антитела, содержащие антигенсвязывающую область и по меньшей мере один СН-домен. Данная пара тяжелая цепь/легкая цепь обладает специфичностью связывания для первого антигена. Третья полипептидная субъединица содержит, состоит по существу или состоит из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего участок Fc, содержащий домены CH2 и/или CH3, и/или CH4, в отсутствие домена CH1, и антигенсвязывающий домен, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена, причем такой связывающий домен происходит из или имеет идентичность последовательности варибельной области тяжелой или легкой цепи антитела. Части такой варибельной области могут кодироваться сегментами гена V_H и/или V_L, сегментами гена D и J_H, или сегментами гена J_L. Варибельная область может кодироваться реаранжированными генными сегментами V_HDJ_H, V_LDJ_L, V_HJ_L или V_LJ_L. Белок ТСА использует антитело, содержащее только тяжелые цепи, как определено выше.

Термин "химерный антигенный рецептор" или "CAR" используется в данном описании в самом широком смысле для обозначения сконструированного рецептора, который прививает желаемую специфичность связывания (например, антигенсвязывающую область моноклонального антитела или другого

лиганда) к охватывающему мембрану и внутриклеточному сигнальному доменам. Как правило, рецептор используется для прививки специфичности моноклонального антитела на Т-клетку для создания химерных антигенных рецепторов (CAR). (J Natl Cancer Inst, 2015; 108(7):dvj439; and Jackson et al., Nature Reviews Clinical Oncology, 2016; 13:370-383).

Термин "антитело человека" используется в данном документе для включения антител, которые имеют переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. В данном документе, антитела человека могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека зародышевой линии, например, мутации, введенные случайным или специфичным для сайта мутагенезом *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*. Термин "антитело человека", в частности, включает антитела, содержащие только тяжелые цепи, имеющие последовательности переменной области тяжелой цепи человека, продуцируемые трансгенными животными, такими как трансгенные крысы или мыши, в частности UniAbs™, продуцируемые UniRats™, как определено выше.

Под "химерным антителом" или "химерным иммуноглобулином" подразумевается молекула иммуноглобулина, содержащая аминокислотные последовательности по меньшей мере из двух разных локусов Ig, например, трансгенное антитело, содержащее часть, кодируемую локусом Ig человека, и часть, кодируемую локусом Ig крысы. Химерные антитела включают трансгенные антитела с нечеловеческими Fc-областями или искусственными Fc-областями, и человеческие идиотипы. Такие иммуноглобулины могут быть выделены из животных по изобретению, которые были сконструированы для получения таких химерных антител.

Используемый в данном документе термин "эффекторная клетка" относится к иммунной клетке, которая участвует в эффекторной фазе иммунного ответа, в отличие от когнитивной и активационной фаз иммунного ответа. Некоторые эффекторные клетки экспрессируют специфические рецепторы Fc и выполняют специфические иммунные функции. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка, такая как естественная клетка-киллер, способна индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ). Например, моноциты и макрофаги, которые экспрессируют FcR, участвуют в специфическом уничтожении клеток-мишеней и представлении антигенов другим компонентам иммунной системы или связываются с клетками, которые представляют антигены. В некоторых вариантах осуществления эффекторная клетка может осуществлять фагоцитоз антигена-мишени или клетки-мишени.

"Эффекторные клетки человека" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют рецепторы, такие как рецепторы Т-клеток или FcR, и осуществляют эффекторные функции. Предпочтительно, такие клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ, включают, естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы; причем NK-клетки являются предпочтительными. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови или МПКК, как описано в данном документе.

Термин "иммунная клетка" используется в данном описании в самом широком смысле, включая, без ограничения, клетки миелоидного или лимфоидного происхождения, например лимфоциты (такие как В-клетки и Т-клетки, включая цитолитические Т-клетки (ЦТЛ)), клетки-киллеры, естественные клетки-киллеры (NK), макрофаги, моноциты, эозинофилы, полиморфно-ядерные клетки, такие как нейтрофилы, гранулоциты, тучные клетки и базофилы.

"Эффекторные функции" антитела относятся к той биологической активности, которая относится к области Fc (области Fc нативной последовательности или области Fc варианта аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплемент-зависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; подавление рецепторов поверхности клетки. (например, В-клеточный рецептор, BCR) и т.д.

"Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" и "АЗКЦ" соответствуют опосредованной клетками реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют рецепторы Fc (FcR) (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. Первичные клетки, опосредующие АЗКЦ, естественные клетки-киллеры, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. данные по экспрессии FcR на гемопоэтических клетках обобщены в табл. 3 на странице 464 публикации Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Для оценки активности АЗКЦ интересующей молекулы может быть проведен анализ АЗКЦ *in vitro*, описанный в патенте США № 5500362 или 5821337. Эффекторные клетки, пригодные для такого анализа, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МПКК) и естественные клетки-киллеры (NK). В качестве альтернативы или дополнения, АЗКЦ-активность молекулы, представляющей интерес, можно оценить *in vivo*, например, в животной модели, например, согласно описанию в публикации Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998).

"Комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к способности молекулы лизиро-

вать мишень в присутствии комплемента. Путь активации комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с молекулой (например, антителом), образующей комплекс с распознаваемым антигеном. Для оценки активации комплемента, может быть выполнен анализ CDC, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

"Аффинность связывания" относится к силе суммарного количества нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антителом) и ее связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, как используется в данном документе, "аффинность связывания" относится к аффинности собственного связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом можно выразить константой диссоциации (K_d). Аффинность может быть измерена обычными методами, известными в данной области техники. Низкоаффинные антитела обычно связывают антиген медленно и склонны легко диссоциировать, тогда как высокоаффинные антитела обычно связывают антиген быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными.

Используемый в данном документе термин " K_d " или "значение K_d " относится к константе диссоциации, определенной методом интерферометрии BioLayer, с использованием прибора Octet QK384 (Fortebio Inc., Menlo Park, CA) в режиме кинетики. Например, анти-мышинные Fc-датчики загружают со слитым Fc-антигеном мыши и затем погружают в лунки, содержащие антитела, для измерения зависимых от концентрации скоростей (k_{on}). Скорости диссоциации антител (k_{off}) измеряются на последнем этапе, когда датчики погружают в лунки, содержащие только буфер. K_d представляет собой соотношение k_{off}/k_{on} . (Подробнее см. Conception, J, et al., Comb Chem High Throughput Screen, 12(8), 791-800, 2009).

Термины "лечение", "лечить" и тому подобное используются в данном документе для обозначения достижения желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предотвращения заболевания или его симптомов и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного явления, связанного с этим заболеванием. В контексте данного документа термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, и включает в себя:

- (a) предотвращение появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого это заболевание еще не диагностировано;
- (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; или
- (c) облегчение заболевания, т.е. регрессию заболевания.

Терапевтическое средство можно вводить до, во время или после начала заболевания или травмы. Лечение текущего заболевания, при котором лечение стабилизирует или уменьшает нежелательные клинические симптомы пациента, представляет особый интерес. Такое лечение желательно проводить до полной потери функции в пораженных тканях. Терапия субъекту может быть введена во время симптоматической стадии заболевания, и в некоторых случаях после симптоматической стадии заболевания.

Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество активного агента, которое необходимо для придания терапевтического эффекта у субъекта. Например, "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое вызывает, ослабляет или иным образом вызывает улучшение патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических состояний, связанных с заболеванием, или которое повышает устойчивость к расстройству.

Термины "В-клеточные новообразования" или "зрелые В-клеточные новообразования" в контексте данного изобретения включают мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, В-клеточную пролимфоцитарную лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз, лимфому из мантийных клеток, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), множественную миелому, лимфоплазмацитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны селезенки, новообразования плазматических клеток, такие как миелома клеток плазмы, плазмоцитомы, болезнь отложения моноклональных иммуноглобулинов, болезнь тяжелых цепей, MALT-лимфома, узловая В-клеточная лимфома из клеток маргинальной зоны, внутрисосудистая В-крупноклеточная лимфома, первичная выпотная лимфома, лимфоматоидный гранулематоз, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, волосатоклеточный лейкоз, первичная выпотная лимфома и СПИД-ассоциированная неходжкинская лимфома.

Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения млекопитающего, которого оценивают на предмет лечения и/или которое подвергается лечению. В одном варианте осуществления млекопитающее является человеком. Термины "субъект", "индивидуум" и "пациент" охватывают, без ограничения, индивидуумов, имеющих рак, индивидуумов с аутоиммунными заболеваниями, патогенными инфекциями и тому подобное. Субъектами могут быть люди, но также могут быть и другие млекопитающие, в частности те млекопитающие, которые могут быть использованы в качестве лабораторных моделей заболеваний человека, например, мышь, крыса и т.д.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к составу, который находится в такой форме, которая позволяет биологической активности активного ингредиента быть эффективной, и который не

содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться композиция. Такие составы являются стерильными. "Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества" (носители, адъюванты) являются таковыми, которые резонно могут вводиться субъекту-млекопитающему и обеспечивать эффективную дозу используемого активного ингредиента.

"Стерильная" композиция является асептической или свободной от, или практически не содержит любых живых микроорганизмов и их спор. "Замороженная" композиция является композицией при температуре ниже 0°C.

"Стабильная композиция" является таковой, в которой белок практически полностью сохраняет свою физическую стабильность и/или химическую стабильность и/или биологическую активность во время хранения. Предпочтительно, композиция практически полностью сохраняет свою физическую или химическую стабильность, а также свою биологическую активность. Период хранения в общем выбран на основании срока годности композиции. Разнообразные техники для измерения стабильности белка известны в данной области техники и рассмотрены в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301. Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones. A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), например. Стабильность может быть измерена при выбранной температуре для выбранного периода времени. Стабильность может быть оценена качественно и/или количественно различными способами, включая оценку образования агрегатов (например, с использованием эксклюзионной хроматографии, путем измерения мутности и/или визуальным контролем); путем оценки неоднородности заряда с помощью катионообменной хроматографии, изоэлектрического фокусирования изображения (icIEF) или электрофореза в капиллярной зоне; анализ аминоконцевой или карбоксиконцевой последовательности; масс-спектрометрический анализ; SDS-PAGE анализ для сравнения восстановленного и интактного антитела; анализ пептидной карты (например, триптический или LYS-C); оценку биологической активности или антигенсвязывающей функции антитела; и т.п. Нестабильность может включать в себя одно или несколько из: агрегации, дезамидирования (например, Asn дезамидирование), окисление (например, окисление Met), изомеризации (например, изомеризации Asp), отсечение/гидролиз/фрагментация (например, фрагментация шарнирной области), образование сукцинимидов, неспаренный цистеин(ы), удлинение N-конца, обработка C-конца, различия гликозилирования, и т.п.

II. Подробное описание сущности изобретения

Антитела к CD22.

Данное изобретение относится к семейству тесно связанных антител, содержащих только тяжелые цепи, которые связываются с CD22 человека. Антитела данного семейства содержат последовательности CDR, как определено в данном документе и показано на фиг. 1, и иллюстрируются приведенными последовательностями вариативной области тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO: 24-84, указанными на фиг. 2. Семейства антител обеспечивают ряд преимуществ, которые благоприятствуют применению их в качестве клинического(-их) терапевтического(-их) агента(-ов). Антитела включают членов с диапазоном аффинностей связывания, позволяющих выбирать конкретную последовательность с желаемой аффинностью связывания.

Подходящее антитело может быть выбрано из представленных в данном документе, для разработки и терапевтического или другого применения, включая, без ограничения, использование в качестве биспецифичного антитела, например, приведенного на фиг. 5B, или триспецифичного антитела или части структуры CAR-T.

Определение аффинности к белку-кандидату может быть выполнено с использованием способов, известных в данной области, таких как измерения Biacore. Члены семейства антител могут иметь аффинность к CD22 с Kd от около 10^{-6} до около 10^{-11} , в том числе без ограничения: от около 10^{-6} до около 10^{-10} ; от около 10^{-6} до около 10^{-9} ; от около 10^{-6} до около 10^{-8} ; от около 10^{-8} до около 10^{-11} ; от около 10^{-8} до около 10^{-10} ; от около 10^{-8} до около 10^{-9} ; от около 10^{-9} до около 10^{-11} ; от около 10^{-9} до около 10^{-10} ; или любое значение в этих диапазонах. Выбор аффинности может быть подтвержден биологической оценкой для модуляции, например, блокирование, биологическая активность CD22, включая анализы *in vitro*, доклинические модели и клинические испытания, а также оценку потенциальной токсичности.

Члены семьи антител описанные в данном документе не являются перекрестно-реактивными с CD22 белком макака *Cynomolgus*, но могут быть сконструированными для получения перекрестной реактивности с белком CD22 макака *Cynomolgus* или белками CD22 других видов, при необходимости.

Семейство специфических для CD22 антител в данном документе включает домен VH, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 в каркасе VH человека. Последовательности CDR могут быть расположены, например, в области около аминокислотных остатков 26-35; 53-59; и 98-117, для CDR1, CDR2 и CDR3 соответственно, предоставленных примерных последовательностей вариативной области, приведенных в SEQ ID NO: 24-84. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что последовательности CDR могут находиться в других положениях, если выбрана другая каркасная последовательность, хотя, как правило, порядок последовательностей остается неизменным.

Последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 антител к CD22 по данному изобретению могут охватываться следующими структурными формулами, где X обозначает вариативную аминокислоту, которая

может представлять собой специфические аминокислоты, как указано ниже.

CDR1.

G X₁ S I X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ Y,

где X₁ представляет собой D или G;

X₂ представляет собой S, T, I или N;

X₃ представляет собой S или D;

X₄ представляет собой G, S, или N;

X₅ представляет собой D, G или S; а

X₆ представляет собой Y или H.

CDR2.

X₇ X₈ Y X₉ G X₁₀ X₁₁,

где X₇ представляет собой I или V;

X₈ представляет собой Y или H;

X₉ представляет собой S или T;

X₁₀ представляет собой A, V или S; а

X₁₁ представляет собой T или A.

CDR3.

X₁₂ R X₁₃ D S S X₁₄ W R S,

где X₁₂ представляет собой T, A или K;

X₁₃ представляет собой D или E; а

X₁₄ представляет собой N или S.

Иллюстративные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 показаны на фиг. 1 и 3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению содержит последовательность CDR1 любой из SEQ ID NO: 1-10. В конкретном варианте осуществления последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению содержит последовательность CDR2 любой из SEQ ID NO: 11-17. В конкретном варианте осуществления последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению содержит последовательность CDR3 любой из SEQ ID NO: 18-23. В конкретном варианте осуществления последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 18.

В дополнительном варианте осуществления антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению содержит последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18.

В дополнительных вариантах осуществления антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению, содержит любую из аминокислотных последовательностей вариabельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: от 24 до 84 (фиг. 2).

В другом дополнительном варианте осуществления антитело к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению, содержит вариabельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR в антителе к CD22, содержащее только тяжелые цепи, по данному изобретению, содержит одну или две аминокислотные замены относительно последовательности CDR1, CDR2 и/или CDR3 или набора последовательностей CDR1, CDR2 и CDR3 в любой из SEQ ID NO: 1-23 (фиг. 1). В некоторых вариантах осуществления указанная аминокислотная замена(ы) представляет собой одно или два аминокислотных положения 4-6 CDR1 и/или одно или два аминокислотных положения 2, 4-7 CDR2, и/или одно или два аминокислотных положения 5-12 CDR3, относительно формул, предложенных выше. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, будут содержать последовательность вариabельной области тяжелой цепи с по меньшей мере около 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, по меньшей мере 95% идентичности, по меньшей мере 98% идентичности, или по меньшей мере 99% идентичности любым последовательностям вариabельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 24-84 (показанным на фиг. 2).

В некоторых вариантах осуществления предлагаются биспецифичные или мультиспецифичные антитела, которые могут иметь любую из конфигураций, обсуждаемых в данном документе, включая, без ограничения, биспецифичную трехцепочечную антителоподобную молекулу. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело может содержать по меньшей мере одну вариabельную область тяжелой цепи, обладающую специфичностью связывания для CD22, и по меньшей мере одну вариabельную область тяжелой цепи, имеющую специфичность связывания для белка, отличного от CD22. В некоторых вариантах осуществления биспецифичное антитело может содержать пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая обладает специфичностью связывания для первого антигена, и тяжелую цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержащего часть Fc, содержащую CH2 и/или CH3 и/или домены CH4, в отсутствие домена CH1, и антигенсвязывающего домена, который связывает эпитоп второго антигена или другой эпитоп первого антигена. В одном конкретном варианте осуществления биспецифич-

ное антитело содержит пару тяжелая цепь/легкая цепь, которая обладает специфичностью связывания для антигена на эффекторной клетке (например, белок CD3 на Т-клетке), а тяжелая цепь из антитела, содержащего только тяжелые цепи, содержит антигенсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания для CD22.

В некоторых вариантах осуществления, когда белок по изобретению представляет собой биспецифичное антитело, одно плечо антитела (один связывающий фрагмент) является специфичным для CD22 человека, в то время как другой фрагмент может быть специфичным для клеток-мишеней, ассоциированных с опухолью антигенов, целевых антигенов, например, интегринов и т.д., антигенов патогенов, белков контрольных точек и тому подобное. Клетки-мишени конкретно включают раковые клетки, включая без ограничения, клетки из гематологической опухоли, например В-клеточные опухоли, как описано выше.

Различные форматы биспецифичных антител находятся в пределах объема изобретения, включая без ограничения одноцепочечные полипептиды, двухцепочечные полипептиды, трехцепочечные полипептиды, четырехцепочечные полипептиды и кратные им полипептиды. В данном документе биспецифичные антитела конкретно включают биспецифичные антитела Т-клеток, связывающиеся с CD22, который избирательно экспрессируется на зрелых В-клетках, и CD3 (антитела к CD22хCD3). Такие антитела индуцируют сильное опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих CD22.

Получение антител к CD22, содержащих только тяжелые цепи.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, по данному изобретению могут быть получены при помощи методов, известных в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи в данном случае продуцируются трансгенными животными, включая трансгенных мышей и крыс, предпочтительно крыс, у которых эндогенные гены иммуноглобулина нокаутированы или отключены. В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, по настоящему изобретению продуцируются в UniRat™. UniRat™ имеют молчащие гены собственного эндогенного иммуноглобулина и используют транслокус тяжелой цепи иммуноглобулина человека для экспрессии разнообразного, естественно оптимизированного репертуара полностью человеческих HCAb. В то время как эндогенные локусы иммуноглобулина у крыс могут быть нокаутированы или заглушены с использованием различных технологий, в UniRat™ технология цинк-пальцевой (эндо)нуклеазы (ZNF) была использована для инактивации эндогенного J-локуса тяжелой цепи крысы, локуса Cκ легкой цепи и локуса Cλ легкой цепи. Конструкции ZNF для микроинъекции в ооциты могут продуцировать нокаутные (KO) линии IgH и IgL. Подробнее см., например, Geurts et al., 2009, Science 325:433. Characterization of Ig heavy chain knockout rats has been reported by Menoret et al., 2010, Eur. J. Immunol. 40:2932-2941. Преимущества технологии ZNF заключаются в том, что негомологичное присоединение конца для подавления гена или локуса посредством делеций размером до нескольких т.п.н. также может обеспечить сайт-мишень для гомологичной интеграции (Cui et al., 2011, Nat Biotechnol 29:64-67). Антитела тяжелой цепи человека, продуцируемые в UniRat™, называются UniAbs™ и могут связывать эпитопы, которые нельзя атаковать обычными антителами. Их высокая специфичность, аффинность и небольшой размер делают их идеальными для моно- и полиспецифичных применений.

В дополнение к UniAbs™, в частности, в данный документ включены антитела, содержащие только тяжелые цепи, лишенные верблужьего каркаса и мутаций VHH, и их функциональные области VH. Такие антитела, содержащие только тяжелые цепи, можно, например, продуцировать у трансгенных крыс или мышей, которые содержат полностью человеческие генные локусы, содержащие только тяжелые цепи, как описано, например, в WO 2006/008548, но также можно использовать других трансгенных млекопитающих, таких как кролик, морская свинка, крыса, предпочтительными являются крысы и мыши. Антитела, содержащие только тяжелые цепи, включая их функциональные фрагменты VHH или VH, также могут быть получены с помощью технологии рекомбинантных ДНК путем экспрессии кодирующей нуклеиновой кислоты в подходящем эукариотическом или прокариотическом хозяине, включая, например, клетки млекопитающих (например, клетки CHO), кишечную палочку или дрожжи.

Домены антител, содержащих только тяжелые цепи, сочетают в себе преимущества антител и низкомолекулярных лекарственных средств: могут быть моно- или мультивалентными; имеют низкую токсичность; и экономически выгодны в производстве. Из-за их небольшого размера эти домены легко вводить, включая пероральное или местное введение, они характеризуются высокой стабильностью, включая желудочно-кишечную стабильность; и их период полужизни может быть адаптирован к желаемому применению или показаниям. Кроме того, домены VH и VHH HCAb могут быть получены экономически эффективным способом.

В конкретном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, по данному изобретению, включая UniAbs™, имеют нативный аминокислотный остаток в первом положении области FR4 (аминокислотное положение 101 согласно системе нумерации Kabat), замещенный другим аминокислотным остатком, который способен разрушать поверхностно экспонированный гидрофобный пэтч, содержащий или связанный с нативным аминокислотным остатком в этом положении. Такие гидрофоб-

ные пэтки обычно скрыты на границе с константной областью легкой цепи антитела, но становятся открытыми для поверхности в HCAb и, по меньшей мере, частично, для нежелательной агрегации и ассоциации легкой цепи HCAb. Замещенный аминокислотный остаток предпочтительно является заряженным и, более предпочтительно, является положительно заряженным, таким как лизин (Lys, K), аргинин (Arg, R) или гистидин (His, H), предпочтительно аргинин (R). В предпочтительном варианте осуществления антитела, содержащие только тяжелые цепи, полученные от трансгенных животных, содержат мутацию Trp-Arg в положении 101. Полученные HCAb предпочтительно имеют высокую антигенсвязывающую аффинность и растворимость в физиологических условиях в отсутствие агрегации.

В рамках данного изобретения были идентифицированы антитела IgG человека, содержащие только тяжелые цепи, к CD22 с уникальными последовательностями от животных UniRat™ (UniAb™), которые связывают CD22 человека в ИФА связывания белка и клеток (рекомбинантный внеклеточный домен CD22). Идентифицированные последовательности варибельной области тяжелой цепи (VH) (см. фиг. 2) являются положительными в отношении связывания белка CD22 человека и/или в отношении связывания с клетками CD22+, и все они являются отрицательными в отношении связывания с клетками, которые не экспрессируют CD22.

Антитела, описанные в данном документе, связывают CD22-положительную лимфому Беркитта в клеточной линии Daudi (ATCC® CCL-213™), и некоторые перекрестно реагируют с белком CD22 яванского макака. Кроме того, они могут быть сконструированы для обеспечения перекрестной реактивности с белком CD22 любых видов животных, если это желательно.

Антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, такие как UniAbs™, могут иметь аффинность к CD22 с Kd от около 10^{-6} до около 10^{-11} , в том числе без ограничения: от около 10^{-6} до около 10^{-10} ; от около 10^{-6} до около 10^{-9} ; от около 10^{-6} до около 10^{-8} ; от около 10^{-8} до около 10^{-11} ; от около 10^{-8} до около 10^{-10} ; от около 10^{-8} до около 10^{-9} ; от около 10^{-9} до около 10^{-11} ; от около 10^{-9} до около 10^{-10} , или любое значение в этих диапазонах. Выбор аффинности может быть подтвержден биологической оценкой для модуляции, например, блокирование, биологическая активность CD22, включая анализы *in vitro*, доклинические модели и клинические испытания, а также оценку потенциальной токсичности.

Антитела, содержащие только тяжелые цепи, которые связываются с неперекрывающимися эпитопами на белке CD22, например UniAbs™, можно идентифицировать с помощью анализов конкурентного связывания, таких как иммуноферментные анализы (ИФА) или анализы конкурентного связывания с помощью проточной цитометрии, например, можно использовать конкуренцию между известными антителами, связывающимися с антигеном-мишенью, и интересующим антителом. Используя этот подход, можно разделить набор антител на те, которые конкурируют с эталонным антителом, и те, которые не конкурируют. Неконкурентные антитела идентифицируются как связывающиеся с отдельным эпитопом, который не перекрывается с эпитопом, связанным с эталонным антителом. Часто одно антитело иммобилизуется, антиген связывается, а второе меченое (например, биотинилированное) антитело тестируется в ИФА на способность связывать захваченный антиген. Его также можно проводить с использованием платформ поверхностного плазмонного резонанса (SPR), включая ProteOn XPR36 (BioRad, Inc), Biacore 2000 и Biacore T200 (GE Healthcare Life Sciences), и томограф MX96 SPR (Ibis technologies BV), а также на биослойные интерферометрические платформы, такие как Octet Red384 и Octet HTX (ForteBio, Pall Inc). Для дальнейших деталей смотрите примеры в данном документе.

Как правило, антитело "конкурирует" с эталонным антителом, если оно вызывает снижение связывания эталонного антитела с антигеном-мишенью на около 15-100%, что определено стандартными методами, такими как анализы конкурентного связывания, описанные выше. В различных вариантах осуществления относительное ингибирование составляет по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или выше.

Фармацевтические композиции, применения и способы лечения.

Другим аспектом настоящего изобретения является предложение фармацевтических композиций, содержащих одно или более антител по настоящему изобретению в смеси с подходящим фармацевтически приемлемым носителем. Фармацевтически приемлемые носители, используемые в данном документе, например, но не ограничиваются ими, адъюванты, твердые носители, вода, буферы или другие носители, используемые в данной области для хранения терапевтических компонентов или их комбинаций.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAb™), которое связывается с CD22. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит мультиспецифичное (включая биспецифичное) антитело, содержащее только тяжелые цепи, (например, UniAb™) со специфичностью связывания для двух или более неперекрывающихся эпитопов на белке CD22. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит мультиспецифичное (включая биспецифичное) антитело, содержа-

щее только тяжелые цепи, (например, UniAb™) со специфичностью связывания с CD22 и со специфичностью связывания с мишенью связывания на эффекторной клетке (например, мишенью связывания на Т-клетке, такой как, например, белок CD3 на Т-клетке).

Фармацевтическую композицию антител, используемых согласно настоящему изобретению, готовят для хранения путем смешивания белков, имеющих желаемую степень чистоты, с необязательными фармацевтически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), например, в форме лиофилизированных композиций или водных растворов. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно стерильны и по существу изотоничны и произведены согласно условиям правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). Фармацевтические композиции могут быть предложены в единичной дозированной форме (например, дозированной форме для единичного введения). Подходящая лекарственная форма зависит от выбранного пути введения. Антитела описанные в данном документе могут вводиться посредством внутривенной инъекции или инфузии, или подкожно. Для инъекционного введения, антитела описанные в данном документе могут быть составлены в водных растворах, предпочтительно в физиологически-совместимых буферах для уменьшения дискомфорта в месте инъекции. Раствор может содержать носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы как описано выше. В качестве альтернативы, антитела могут быть лиофилизированы для смешивания с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением.

Составы антител раскрыты, например, в патенте США № 9034324. Подобные составы могут быть использованы для антител, содержащих только тяжелые цепи, включая UniAbs™, по данному изобретению. Композиции антитела для подкожного введения описаны, например, в патентах США 20160355591 и США 20160166689.

Способы применения.

Антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, мультиспецифичные антитела и фармацевтические композиции, описанные в данном документе, можно применять для лечения заболеваний и состояний, характеризующихся экспрессией CD22, включая, без ограничения, состояния и заболевания, описанные далее в данном документе. Аспекты данного изобретения также относятся к применению антитела, описанного в данном документе, при получении лекарственного средства для лечения В-клеточного расстройства, характеризующегося экспрессией CD22. Аспекты данного изобретения также относятся к антителу, описанному в данном документе, для применения в лечении В-клеточного расстройства, характеризующегося экспрессией CD22.

CD22 представляет собой трансмембранный белок типа I с молекулярной массой 135 кДа, который экспрессируется на низких уровнях в пре- и незрелых В-клетках, максимально в зрелых В-клетках и в конечном итоге подавляется в плазматических клетках. (Например, Walker et al., Immunology, 2008 Mar; 123(3) 314-25). CD22 в большом количестве экспрессируется в фолликулярных (первичных и вторичных зонах В-клеток), В-клетках мантийных и маргинальных зон и, как сообщается, присутствует в 60-80% образцов от пациентов со злокачественными опухолями В-клеток (Alderson et al., Clin. Cancer Res 2009;15(3) February 11, 2009). Из-за его наблюдаемой экспрессии в ряде гематологических злокачественных новообразований, CD22 является многообещающей мишенью для терапии на основе антител.

В одном аспекте антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, (например, UniAbs™) и фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть использованы для лечения гематологических злокачественных опухолей, характеризующихся экспрессией CD22, включая, без ограничения, диффузную В-крупноклеточную лимфому (ДВККЛ), неходжкинскую лимфому, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и В-клеточный острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

Диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДВККЛ или DLBCL) является наиболее распространенной формой неходжкинской лимфомы среди взрослых (Blood 1997 89 (11): 3909-18), с оценкой ежегодной заболеваемости от 7 до 8 случаев на 100000 человек в год в США и Великобритании. Она характери-

зуется как агрессивный рак, который может возникнуть практически в любой части тела. Причины ДВККЛ не совсем понятны, и он может быть вызван нормальными В-клетками, а также злокачественной трансформацией других типов клеток лимфомы или лейкоза. Подходы к лечению обычно включают химиотерапию и облучение, и в результате общая пятилетняя выживаемость составляет в среднем около 58% для взрослых. Хотя некоторые моноклональные антитела продемонстрировали перспективность лечения ДВККЛ, последовательная клиническая эффективность еще не была окончательно продемонстрирована. Поэтому существует большая потребность в новых способах лечения, включая иммунотерапию, для лечения ДВККЛ.

В другом аспекте антитела к CD22, содержащие только тяжелые цепи, (например, UniAbs™) и фармацевтические композиции по данному изобретению могут быть использованы для лечения аутоиммунных нарушений, характеризующихся патогенными В-клетками, которые экспрессируют CD22, включая, без ограничения, системную красную волчанку (СКВ), ревматоидный артрит (РА) и рассеянный склероз (РС).

Эффективные дозы композиций по данному изобретению для лечения заболевания варьируются в зависимости от многих различных факторов, включая способы введения, место назначения, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарственные препараты, и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациентом является человек, но млекопитающие, отличные от человека, также могут поддаваться лечению, например, домашние животные, такие как собаки, кошки, лошади и т.д., лабораторные млекопитающие, такие как кролики, мыши, крысы и т.д., и тому подобное. Для оптимизации безопасности и эффективности можно подбирать лекарственные дозировки.

Уровни дозировки могут быть легко определены обычным квалифицированным врачом и могут быть изменены при необходимости, например, при необходимости изменения реакции субъекта на терапию. Количество действующего вещества, которое можно комбинировать с материалами носителя для получения единичной лекарственной формы, варьируется в зависимости от хозяина, который поддается лечению, и конкретного способа введения. Стандартные лекарственные формы обычно содержат от около 1 до около 500 мг действующего вещества.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическая дозировка агента может составлять от около 0,0001 до 100 мг/кг и более обычно от 0,01 до 5 мг/кг от массы тела хозяина. Например, дозировка может составлять 1 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или в пределах 1-10 мг/кг. Примерный режим лечения включает введение один раз каждые две недели или один раз в месяц или один раз каждые от 3 до 6 месяцев. Терапевтические вещества по настоящему изобретению обычно вводят несколько раз. Интервалы между однократными дозами могут быть еженедельными, ежемесячными или ежегодными. Интервалы также могут быть нерегулярными, на что указывает измерение уровня терапевтического вещества в крови пациента. Альтернативно, терапевтические вещества по настоящему изобретению можно вводить в виде композиции с замедленным высвобождением, и в этом случае требуется менее частое введение. Дозировка и частота варьируются в зависимости от периода полувыведения полипептида у пациента.

Как правило, композиции готовят в виде инъекционных препаратов, либо в виде жидких растворов, либо суспензий; также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, подходят для внутривенного или подкожного введения, непосредственно или после восстановления из твердой (т.е. лиофилизированной) композиции. Препарат также может быть эмульгирован или инкапсулирован в липосомы или микрочастицы, такие как полилактид, полигликолид или сополимер, для усиления адьювантного эффекта, как описано выше. Langer, Science 249: 1527, 1990 и Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. Вещества по данному изобретению можно вводить в форме депо-инъекции или препарата имплантата, который может быть составлен таким образом, чтобы обеспечить длительное или пульсирующее высвобождение действующего вещества. Фармацевтические композиции, как правило, сформулированы как стерильные, практически изотонические и полностью соответствующие всем нормам Правил производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

Токсичность антител и структур антител, описанных в данном документе, может быть определена стандартными фармацевтическими процедурами на клеточных культурах или экспериментальных животных, например, путем определения LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции) или LD₁₀₀ (доза, летальная до 100% популяции).

Соотношение доз между токсическим и терапевтическим эффектом является терапевтическим показателем. Данные, полученные из этих анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы при составлении диапазона доз, который не токсичен для применения у людей. Дозировка антител, описанных в данном документе, предпочтительно находится в диапазоне циркулирующих концентраций, которые включают эффективную дозу с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах данного диапазона в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. Точный состав, способ введения и дозировка могут быть выбра-

ны индивидуально врачом с учетом состояния пациента.

Композиции для введения обычно содержат антитело или другой абляционный агент, растворенный в фармацевтически приемлемом носителе, предпочтительно в водном носителе. Могут быть использованы различные водные носители, например забуференный солевой раствор и тому подобное. Данные растворы являются стерильными и, как правило, не содержат нежелательных веществ. Данные композиции могут быть стерилизованы обычными, хорошо известными способами стерилизации. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения их к физиологическим условиям, такие как регулирующие pH агенты и буферные агенты, регулирующие токсичность агенты и тому подобное, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и тому подобное. Концентрация активного агента в данных составах может варьироваться в широких пределах и будет выбираться в основном на основе объемов жидкости, вязкости, массы тела и тому подобного в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента (например, Remington's Pharmaceutical Science (15th ed., 1980) и Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman et al., eds., 1996)).

Также в объем изобретения входят наборы, содержащие активные агенты и их составы, изобретения и инструкции по применению. Набор может дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный компонент, например, химиотерапевтический препарат и др. Наборы обычно включают этикетку, указывающую на предполагаемое применение содержимого набора. Термин "этикетка", используемый в данном документе, включает любые письменные или записанные материалы, поставляемые в комплекте или вместе с ним, или иным образом сопровождающие набор.

Теперь, когда изобретение полностью описано, для специалиста в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отклонения от сущности или объема изобретения.

Примеры

Материалы и методы.

Связывание белка CD22.

Эксперименты по кинетическому связыванию для определения аффинности антиген-антитело проводили на системе Octet QK-384 (ForteBio) с использованием двухслойной интерферометрии. Биосенсоры анти-человеческого IgG Fc Capture (AHC) (Forte Bio, №: партии 18-5064) гидратировали в буфере для анализа (1x PBS, 0,1% БСА, 0,02% Tween-20, pH 7,2) и предварительно обрабатывали в 100 mM глицине pH 1,5. Исходный уровень был установлен в буфере для анализа на уровне 120 с. Биосенсоры АНС затем иммобилизовали с UniAbs™ в концентрации 5 мкг/мл в течение 120 с. Другой исходный уровень (120 с) был установлен в буфере для анализа. Затем их погружали в 7-точечную серию разведений 1:2 белка CD22 человека в буфере для анализа, начиная с 250 нМ. Последняя лунка колонки анализа содержала только буфер для анализа для проверки неспецифического связывания между буфером и загруженными биосенсорами и использовалась в качестве контрольной лунки. Ассоциация наблюдалась в течение 600 с, с последующей диссоциацией в течение 900 с. Анализ данных проводили с использованием Octet Data Analysis v9.0 (ForteBio). Кинетики связывания анализировали с использованием модели связывания 1:1.

Связывание клеток CD22.

Связывание с CD22-положительными клетками оценивали с помощью проточной цитометрии (Guava easyCyte 8HT, EMD Millipore) с использованием клеточной линии Daudi (ATCC). Вкратце, 100000 клеток-мишеней окрашивали серией разведений очищенного UniAbs™ в течение 30 мин при 4°C. После инкубации клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии (1X ФСБ, 1% БСА, 0,1% NaN₃) и окрашивали козым F(ab')₂ анти-человеческим IgG, конъюгированным с R-фикоэритрином (PE) (Southern Biotech, кат. № 2042-09) для обнаружения связанных с клетками антител. После 20-минутной инкубации при 4°C клетки дважды промывали буфером для проточной цитометрии и затем измеряли среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) с помощью проточной цитометрии. Значения EC50 рассчитывали с использованием GraphPad Prism 7. Связывание с CD22-положительными клетками яванского макака определяли с использованием того же протокола со следующими модификациями: клетки-мишени представляли собой клетки CHO, стабильно трансфицированные для экспрессии внеклеточного домена CD22 яванского макака, и каждое антитело тестировали в одной концентрации (~1,7 мкг/мл) поэтому значения EC50 не были рассчитаны.

Пример 1. Генетически сконструированные крысы, экспрессирующие антитела, содержащие только тяжелые цепи.

Локус IgH человека и крысы был сконструирован и собран из нескольких частей. Это включало модификацию и объединение генов C-области крысы ниже J_H человека, а затем добавление выше области V_H6 -D-сегмента человека. Два ВАС с отдельными кластерами генов V_H человека [ВАС6 и ВАС3] затем совместно вводили с помощью ВАС, называемого Georg, кодирующим собранную и модифицированную область, включающую V_H6 человека, все D, все J_H и модифицированный Cγ2a/1/2b (ΔC_H1) крысы.

Были получены трансгенные крысы, несущие искусственные локусы иммуноглобулинов тяжелой цепи в неупорядоченной конфигурации. IgG2a(ΔC_H1), IgG1(ΔC_H1), IgG2b(ΔC_H1) гены отсутствовали в

СН1 сегменте. Гены константной области IgE, IgA и 3' энхансер были включены в ВАС Georg. ОТ-ПЦР и анализ сыворотки (ИФА) трансгенных крыс выявили продуктивную перестройку локусов трансгенных иммуноглобулинов и экспрессию в сыворотке только антител, содержащие только тяжелые цепи, различных изотипов. Трансгенные крысы скрещивались с крысами с мутированными эндогенными локусами тяжелой цепи и легкой цепи, ранее описанными в публикации патента США 2009/0098134 A1. Анализ таких животных продемонстрировал инактивацию экспрессии тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина крысы и высокий уровень экспрессии антител, содержащих только тяжелые цепи, с переменными областями, кодируемыми генами V, D и J человека. Иммунизация трансгенных крыс приводила к получению сывороточных ответов с высоким титром антиген-специфических антител, содержащие только тяжелые цепи. Данные трансгенные крысы, экспрессирующие антитела, содержащие только тяжелые цепи, с областью VDJ человека, были названы UniRats™.

Пример 2. Иммунизация.

Иммунизация рекомбинантным внеклеточным доменом CD22.

Двенадцать животных UniRat (6 HC27, 6 HC28) были иммунизированы рекомбинантным белком CD22 человека. Животных иммунизировали в соответствии со стандартным протоколом с использованием адъюванта Titermax/Alhydrogel. Рекомбинантный внеклеточный домен CD22 был приобретен у R&D Systems и разбавлен стерильным физиологическим раствором и объединен с адъювантом. Иммуноген комбинировали с адъювантами Titermax и Alhydrogel. Первая иммунизация (прайминг) иммуногеном в Titermax проводилась на левой и правой ногах. Последующие бустерные иммунизации были проведены в присутствии Alhydrogel и за три дня до отбора бустов были проведены иммуногеном в ФСБ. Сыворотку собирали у крыс при последнем заборе крови для определения сывороточных титров.

Результаты сывороточных титров.

Сводная информация о сывороточном титре представлена на фиг. 6. На графиках, изображенных на фиг. 6, каждая линия представляет отдельное животное. На условных обозначениях графиков показан идентификационный номер каждого отдельного животного. Активность связывания для серии сывороток с 8-точечным разведением тестировали с помощью ИФА против белка huCD22+ Fc, huCD22+His-метка, белка макака резуса CD22+His-метка и белка-мишени без His-метки. Среди этой группы животных наблюдался диапазон уровней реактивности сыворотки как к белку CD22 человека, так и макака резуса. Также наблюдался ответ сыворотки на His-метку белка.

Пример 3. Связывание с CD22-экспрессирующими клеточными линиями.

На фиг. 4 приведена активность связывания мишени антител к CD22, содержащих только тяжелые цепи, которые описаны в данном документе. В столбце 1 показан идентификационный номер (ID) клона антитела к CD22, содержащего только тяжелые цепи. В столбце 2 показана аффинность связывания с белком (KD), измеренная в молярности. В столбце 3 показана константа диссоциации связывания с белком (скорость K-off), измеренная в сах. В столбце 4 показано связывание с клетками Daudi, измеренное как кратность по сравнению с фоновым сигналом MFI. В столбце 5 показано связывание с клетками CHO, стабильно экспрессирующими CD22 яванского макака, измеренное как кратность по сравнению с фоновым сигналом MFI. В столбце 6 показано связывание с клетками CHO, которые не экспрессируют CD22, измеренное как кратность по сравнению с фоновым сигналом MFI.

Пример 4. Опосредованное биспецифичным антителами уничтожение опухолевых клеток человека путем перенаправления активированных Т-клеток.

Три различных CD22-положительных клеточных линии опухоли лимфомы Беркитта (Daudi, Raji и Ramos) были помечены красителем и инкубированы с увеличивающимися количествами биспецифичного антитела в присутствии предварительно активированных Т-клеток человека. Биспецифичное антитело состояло из анти-CD3-связывающего плеча, спаренного с анти-CD22 VH-связывающим доменом, что схематически изображено на фиг. 5D. Антитело отрицательного контроля содержало связывающий домен VH, который не связывался с CD22. CD22-отрицательные клетки K562 не проявляли специфического лизиса (данные не представлены). Данные трех биспецифичных антител, содержащих три различных связывающих домена к CD22 на основе только тяжелой цепи, спаренные с одним и тем же связывающим доменом к CD3, представлены на фиг. 5A, сравнивали с отрицательным контролем и демонстрировали опосредованное антителами уничтожение CD22-положительных опухолевых клеток Daudi посредством перенаправления активированных Т-клеток. Данные по двум биспецифичным антителам, содержащим один и тот же анти-CD22-связывающий домен на основе только тяжелой цепи, спаренный с двумя различными анти-CD3-связывающими доменами, представлены на фиг. 5B, сравнивали с отрицательным контролем и демонстрировали опосредованное антителами уничтожение CD22-положительных опухолевых клеток Raji посредством перенаправления активированных Т-клеток. Данные по двум биспецифичным антителам, содержащим один и тот же анти-CD22-связывающий домен на основе только тяжелой цепи, спаренный с двумя различными анти-CD3-связывающими доменами, представлены на фиг. 5C, сравнивали с отрицательным контролем и демонстрировали опосредованное антителами уничтожение CD22-положительных опухолевых клеток Ramos посредством перенаправления активированных Т-клеток.

Несмотря на то что в настоящем документе были показаны и описаны предпочтительные варианты

осуществления настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные варианты осуществления приведены исключительно с целью иллюстрации. Множество вариаций, изменений и замен будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от объема и сущности настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты осуществления настоящего изобретения, описанные в настоящем документе, могут применяться при практической реализации настоящего изобретения. Предполагается, что нижеследующая формула изобретения определяет объем изобретения и, что таким образом охватываются способы и структуры в пределах объема данной формулы изобретения и их эквивалентов.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, которое связывается с CD22, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18; или

(b) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 19; или

(c) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20.

2. Антитело, содержащее только тяжелые цепи по п.1, где последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 находятся в каркасе VH человека.

3. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 24.

4. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.3, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 24.

5. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 25.

6. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.5, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 25.

7. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.1, где переменная область тяжелой цепи содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 32.

8. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.7, где переменная область тяжелой цепи содержит SEQ ID NO: 32.

9. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.1, дополнительно содержащее последовательность константной области тяжелой цепи.

10. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.9, где в последовательности константной области тяжелой цепи отсутствует последовательность CH1.

11. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.9, где последовательность константной области тяжелой цепи содержит домен CH2 и домен CH3.

12. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.1, дополнительно содержащее область IgG4 Fc человека.

13. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.12, где область IgG4 Fc человека является вариантом области IgG4 Fc человека.

14. Антитело, содержащее только тяжелые цепи, по п.12, где область IgG4 Fc человека является сайленсированной областью IgG4 Fc человека.

15. Мультиспецифичное антитело, содержащее первый связывающий фрагмент, который имеет специфичность связывания с CD22 и второй связывающий фрагмент, где первый связывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

(a) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 11 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 18; или

(b) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 19; или

(c) последовательность CDR1 SEQ ID NO: 1, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 12 и последовательность CDR3 SEQ ID NO: 20.

16. Мультиспецифичное антитело по п.15, которое является биспецифичным антителом.

17. Мультиспецифичное антитело по п.15, где второй связывающий фрагмент имеет аффинность связывания с эффекторной клеткой.

18. Мультиспецифичное антитело по п.15, где второй связывающий фрагмент имеет аффинность связывания с Т-клеточным антигеном.

19. Мультиспецифичное антитело по п.15, где второй связывающий фрагмент имеет аффинность связывания с CD3.

20. Полинуклеотид, кодирующий антитело, содержащее только тяжелые цепи по любому из пп.1-14.

21. Применение антитела, содержащего только тяжелые цепи по любому из пп.1-14 или мультиспецифичное антитело по любому из пп.15-19 для лечения В-клеточного расстройства, характеризующегося экспрессией CD22.

22. Применение по п.21, где В-клеточное расстройство представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ).

23. Применение по п.21, где В-клеточное расстройство представляет собой хроническую лимфоцитарную лейкемию.

24. Применение по п.21, где В-клеточное расстройство представляет собой фолликулярную лимфому.

25. Применение по п.21, где расстройство выбирают из группы, состоящей из диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), системной красной волчанки (SLE), ревматоидного артрита (RA), и рассеянного склероза (MS).

26. Полинуклеотид, кодирующий мультиспецифичное антитело по любому из пп.15-19.

SEQ aa CDR1	SEQ aa CDR2	SEQ aaCDR3
GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSVGT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
GDSISSGGYY (SEQ ID NO: 2)	IYYSVAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
GGSISSGDYY (SEQ ID NO: 3)	IYYSVAT (SEQ ID NO: 13)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYTGST (SEQ ID NO: 14)	AREDSSSWRS (SEQ ID NO: 21)
GGSFSGYY (SEQ ID NO: 5)	VYYTGAT (SEQ ID NO: 15)	KRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 22)
GDSISSSSYY (SEQ ID NO: 6)	IHYSGST (SEQ ID NO: 16)	ARDDSSNWRS (SEQ ID NO: 23)
GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 7)	IYYSVSA (SEQ ID NO: 17)	
GGSISSSSHY (SEQ ID NO: 8)		
GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 9)		
GGSISSSSHY (SEQ ID NO: 10)		

Фиг. 1

ИН клона	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO:
335207	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	24
335161	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLENR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	25
335254	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSSWRSRGQGLTVTVSS	26
335260	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSSWRSRGQGLTVTVSS	27
335151	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	28
335170	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	29
335176	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	30
335181	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGGYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	31
335244	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSSWRSRGQGLTVTVSS	32
335154	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	33
335201	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	34
335261	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLENR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSSWRSRGQGLTVTVSS	35
335293	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSSWRSRGQGLTVTVSS	36
335203	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIROPKGLWIGHIYYSVGTYYNPSLKNR VTISVDSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	37

Фиг. 2

Клон ИИ	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
335185	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	38
335206	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	39
335245	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	40
335218	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	41
335160	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	42
335158	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	43
324508	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLENR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	44
335307	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	45
335301	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	46
335323	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	47
335271	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	48
335234	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	49
335182	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	50
335186	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	51
335233	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	52

Клон ИИ	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO.
335224	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYTGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	53
335210	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSRNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	54
335311	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVYGGFSGYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	55
335159	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGVYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	56
335188	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGVYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	57
335274	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	58
335226	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	59
335333	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	60
335283	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	61
335297	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	62
335273	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	63
335187	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	64
335295	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSRNQFSLNLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	65
335220	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	66
335173	QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLSRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLVTVSS	67

Фиг. 2 (продолжение)

Клон ИН	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO:
335219	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGVTYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	68
335236	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGVTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	69
335266	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGVTYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	70
335208	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	71
335195	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	72
335285	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGVTYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	73
335150	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGVTYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	74
335316	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	75
335189	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSVYYTGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	76
335179	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKS RV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	77
335230	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	78
335166	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	79
335242	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	80
335162	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGAAYYHPSLKS RV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	81
335171	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGATYYNPSLKNRV TISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	82

Клон ИН	SEQ_aa_FR1_FR4	SEQ ID NO:
335232	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGDSISSGDYYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	83
335263	QLQLQESGPGLVKPSFETLSLTCTVSGDSINDNSHYWGWIRQPPGKGLEWIGHIYYSGATYYNPSLKNR VTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCTREDSSNWRSRGQGLTVTVSS	84

Фиг. 2 (продолжение)

ИН клон	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aa_CDR3
335207	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335161	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335254	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335260	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335151	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335170	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335176	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335181	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 2)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335244	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335154	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335201	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335261	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335293	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335203	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335185	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335206	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335245	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335218	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335160	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335158	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 3)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
324508	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 3)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335307	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335301	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335323	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 2)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335271	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 20)
335234	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWR (SEQ ID NO: 18)
335182	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)
335186	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TRDDSSNWR (SEQ ID NO: 19)

Фиг. 3

ИН клона	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aaCDR3
335233	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335224	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYTGST (SEQ ID NO: 14)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335210	GGSISSGDYY (SEQ ID NO: 3)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335311	GGSFSGYY (SEQ ID NO: 5)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335159	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335188	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335274	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335226	GDSISSSSYY (SEQ ID NO: 6)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335333	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	AREDSSSWRS (SEQ ID NO: 21)
335283	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335297	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335273	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335187	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335295	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335220	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335173	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335219	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335236	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335266	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335208	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335195	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335285	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335150	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGVT (SEQ ID NO: 11)	KRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 22)
335316	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)
335189	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	VYYTGAT (SEQ ID NO: 15)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335179	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 16)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335230	GGSISSSSHY (SEQ ID NO: 8)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335166	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGST (SEQ ID NO: 13)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335242	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335162	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 9)	IYYSGSA (SEQ ID NO: 17)	ARDDSSNWRS (SEQ ID NO: 23)

ИН клона	SEQ_aa_CDR1	SEQ_aa_CDR2	SEQ_aaCDR3
335171	GGSISSSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TRDDSSNWRS (SEQ ID NO: 19)
335232	GDSISSGDYY (SEQ ID NO: 1)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSNWRS (SEQ ID NO: 18)
335263	GGSISSSSHY (SEQ ID NO: 10)	IYYSGAT (SEQ ID NO: 12)	TREDSSSWRS (SEQ ID NO: 20)

Фиг. 3 (продолжение)

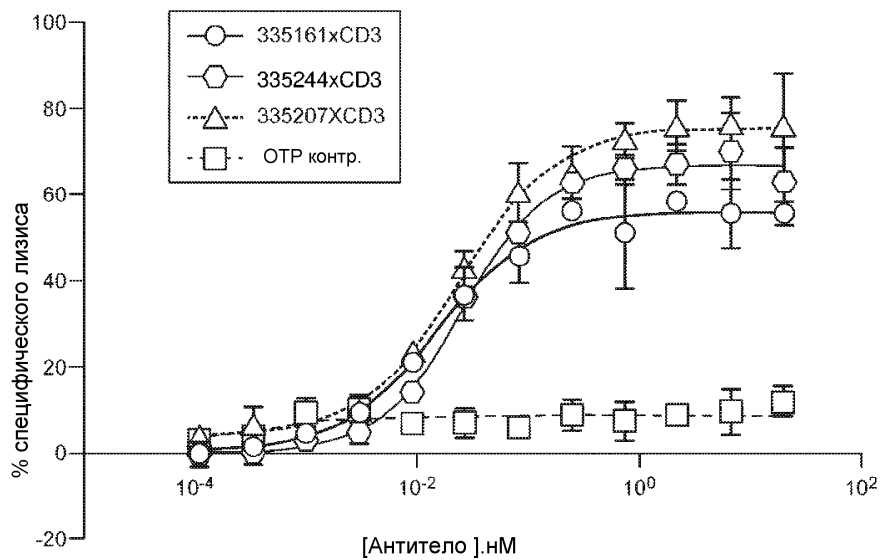
ИН клона	KD (M)	Kdis (1/c)	связывание клеток Daudi	CHO_cyCD22	CHO_cyOFFtgt
335161	2.66E-09	2.40E-04	811.0	208.0	5.2
335254	2.83E-09	2.45E-04	733.0	194.0	5.1
335260	3.17E-09	2.75E-04	725.0	185.0	5.1
335207	3.24E-09	2.94E-04	776.0	209.0	5.3
335151	3.77E-09	3.21E-04	861.0	222.0	5.3
335170	6.50E-09	3.40E-04	791.0	181.0	5.3
335176	4.62E-09	3.79E-04	848.0	212.0	5.3
335181	9.44E-09	4.43E-04	809.0	234.0	5.4
335244	5.07E-09	4.45E-04	752.0	198.0	5.2
335154	5.41E-09	4.46E-04	837.0	232.0	5.3
335201	5.19E-09	4.67E-04	761.0	199.0	5.5
335261	5.27E-09	5.10E-04	748.0	181.0	5.1
324510	6.42E-09	5.54E-04	690.0	172.0	5.2
335293	7.41E-09	5.57E-04	742.0	179.0	5.3
335203	6.80E-09	6.41E-04	729.0	194.0	5.3
335185	8.43E-09	6.47E-04	754.0	220.0	5.5
324317	8.48E-09	6.58E-04	709.0	173.0	5.2
335206	7.53E-09	6.90E-04	735.0	189.0	5.3
335245	7.44E-09	7.02E-04	742.0	192.0	5.4
335218	8.91E-09	7.05E-04	711.0	204.0	5.1
335160	8.51E-09	7.24E-04	750.0	218.0	5.2
335158	4.23E-08	8.01E-04	883.0	193.0	5.4
324508	1.25E-08	8.28E-04	839.0	162.0	5.2
335307	1.03E-08	1.02E-03	737.0	176.0	5.0
335301	1.26E-08	1.29E-03	716.0	166.0	5.0
335323	1.41E-08	1.30E-03	720.0	169.0	5.3
335271	2.16E-08	1.31E-03	711.0	147.0	5.2
335234	1.24E-08	1.37E-03	734.0	161.0	5.2
335182	2.24E-08	1.58E-03	750.0	192.0	5.3

Фиг. 4

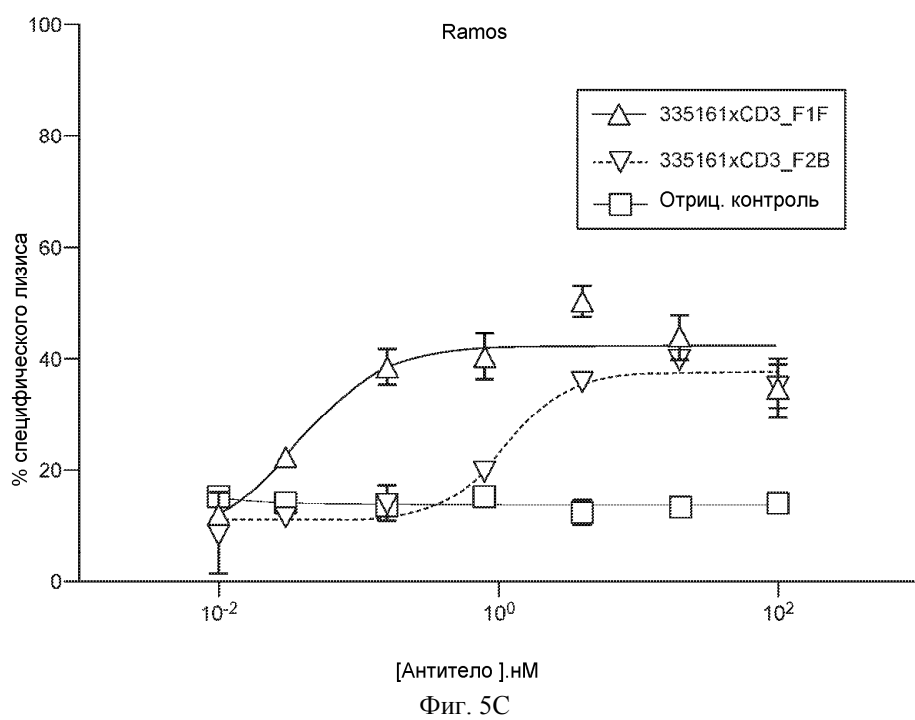
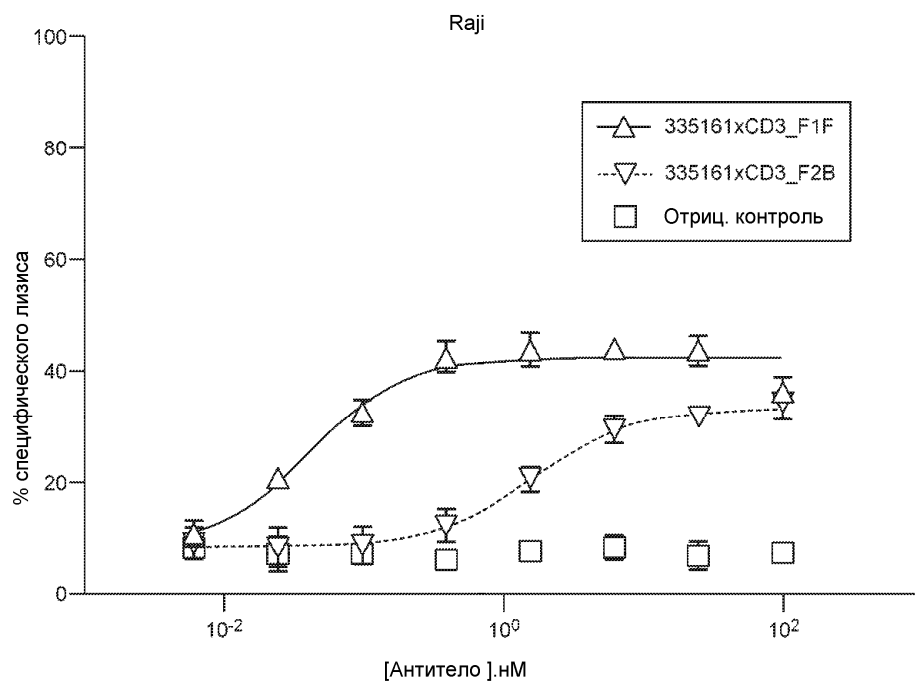
ИН клона	KD (M)	Kdis (1/c)	связывание клеток Daudi	CHO_cyCD22	CHO_cyOFFtgt
335186	1.76E-08	1.72E-03	402.0	33.5	5.5
335233	1.90E-08	2.01E-03	697.0	166.0	5.3
335224	2.34E-08	2.07E-03	689.0	173.0	5.4
335210	6.25E-08	2.28E-03	735.0	159.0	5.2
335311	2.66E-09	2.77E-03	151.0	11.7	5.1
335159	1.61E-08	3.58E-03	532.0	61.7	5.4
335188	5.30E-08	4.12E-03	663.0	113.0	5.3
335274	2.36E-08	4.30E-03	414.0	26.0	5.1
335226	2.55E-08	4.37E-03	221.0	12.0	5.2
335333	2.24E-08	4.37E-03	372.0	21.2	5.0
335283	3.69E-08	4.57E-03	513.0	42.4	5.2
335297	2.88E-08	4.80E-03	107.0	12.3	5.2
335273	4.22E-08	4.87E-03	385.0	23.1	5.2
335187	1.28E-07	5.12E-03	531.0	60.7	6.0
335295	3.16E-08	5.21E-03	491.0	43.8	5.1
335220	4.82E-08	5.31E-03	322.0	18.4	5.4
335173	3.05E-08	5.43E-03	393.0	26.7	5.5
335219	9.06E-08	5.50E-03	590.0	76.2	5.2
335236	2.73E-08	5.62E-03	338.0	18.4	5.3
335266	3.85E-08	5.79E-03	411.0	29.2	5.1
335208	5.84E-08	5.93E-03	452.0	34.0	5.4
335195	1.50E-07	5.99E-03	420.0	33.0	5.4
335285	1.14E-07	6.07E-03	620.0	94.7	5.1
335150	1.41E-08	6.08E-03	86.3	8.8	5.2
335316	2.35E-08	6.62E-03	103.0	9.6	5.1
335189	3.60E-08	6.92E-03	410.0	28.6	5.3
335179	1.48E-07	8.91E-03	88.8	10.5	5.5
335230	7.52E-08	8.92E-03	47.1	7.8	5.3
335166	3.30E-08	9.15E-03	422.0	35.5	5.2
335242	7.97E-08	9.30E-03	136.0	11.3	5.2
335162	9.96E-08	9.41E-03	23.3	9.1	5.2

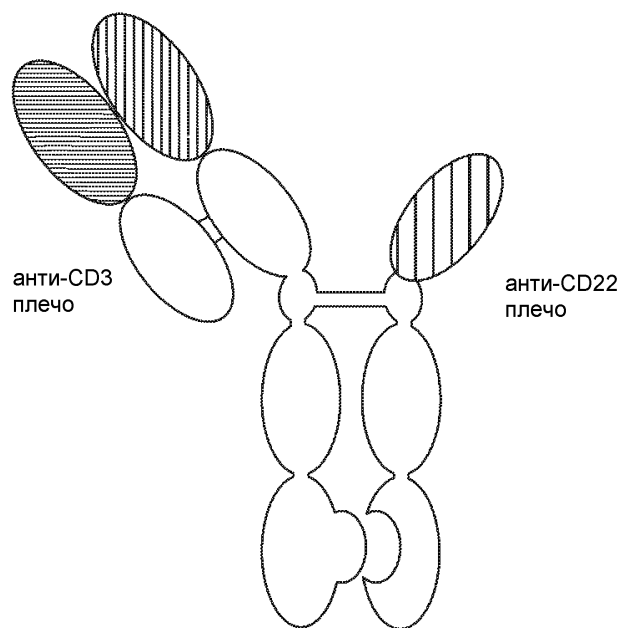
ИН клона	KD (M)	Kdis (1/c)	связывание клеток Daudi	CHO_cyCD22	CHO_cyOFFtgt
335171	8.45E-08	1.24E-02	471.0	39.0	5.4
335232	2.46E-08	1.83E-02	288.0	42.5	5.3
335263	2.58E-06	3.85E-02	30.0	8.2	5.2

Фиг. 4 (продолжение)

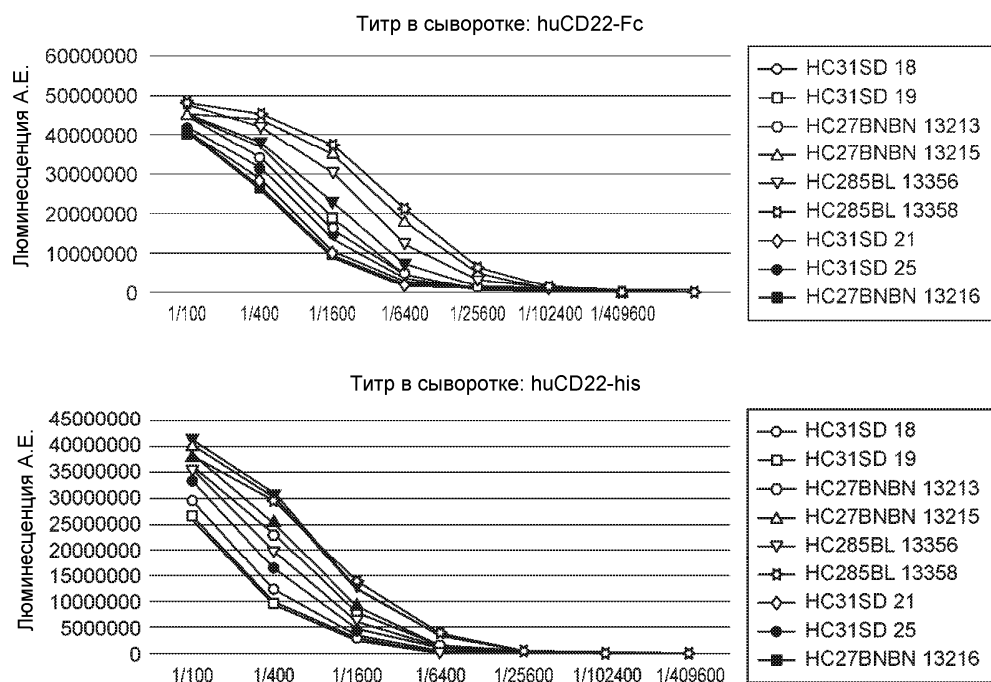


Фиг. 5A

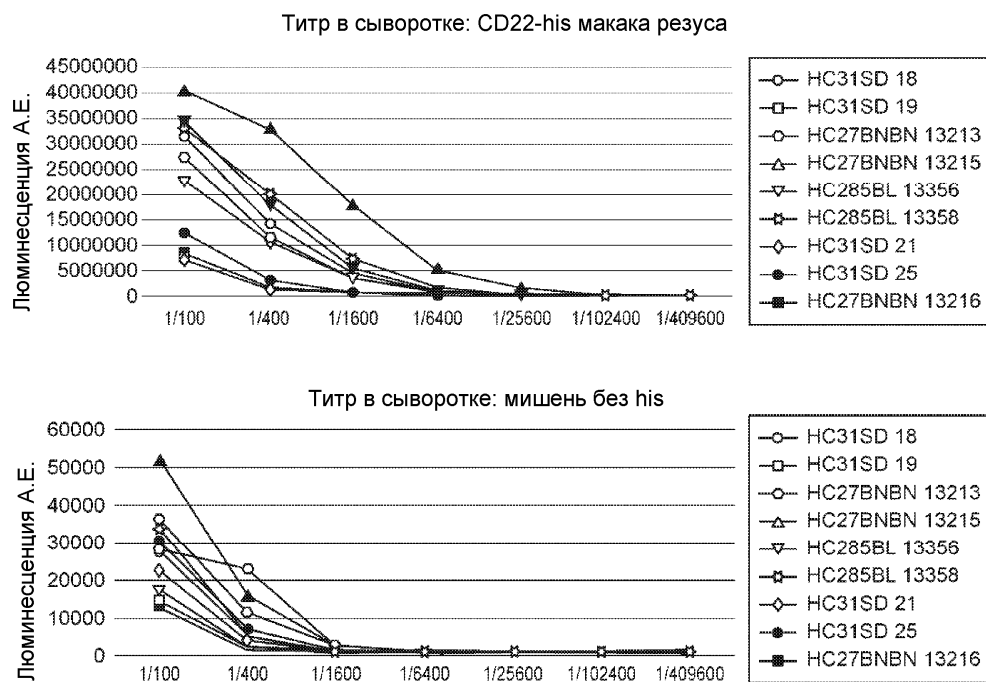




Фиг. 5D



Фиг. 6



Фиг. 6 (продолжение)



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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