(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292555 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.03

(22) Дата подачи заявки
2021.03.15

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ Siglec-3/CD33

(31) **62/989,071; 62/989,093; 62/989,120; 62/989,187; 62/989,230**
(32) **2020.03.13**
(33) **US**
(86) **PCT/IB2021/052121**
(87) **WO 2021/181366 2021.09.16**

(71) Заявитель:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК (US)

(72) Изобретатель:
Дунан Патрик Джон, Ганешан Раджкумар, Деребе Мехабав Гетахун, Венкатарамани Сатхьядеви, Сингх Санджая, Гревал Икбал С., Вихаген Карла Р. (US)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В., Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А., Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к антигенсвязывающим доменам, которые связывают белок CD33, являющийся поверхностным антигеном миелоидных клеток, предусматривающим антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, кодирующим их полинуклеотидам, векторам, клеткам-хозяевам, способам получения и их применению.

202292555 A1

202292555 A1

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ SIGLEC-3/CD33

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/989093, поданной 13 марта 2020 года, предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/989071, поданной 13 марта 2020 года, предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/989120, поданной 13 марта 2020 года, предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/989187, поданной 13 марта 2020 года, и предварительной заявке на патент США с серийным номером 62/989230, поданной 13 марта 2020 года.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим доменам, которые связывают белок CD33, являющийся поверхностным антигеном миелоидных клеток, предусматривающим антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, кодирующим их полинуклеотидам, векторам, клеткам-хозяевам, способам получения и их применению.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, также известный как связывающий сиаловую кислоту иммуноглобулин-подобный лектин 3 (Siglec-3), является представителем связывающего сиаловую кислоту семейства белков. CD33 представляет собой однопроходный трансмембранный белок типа I с N-концевым доменом связывания сиаловой кислоты в его внеклеточном домене (ECD) и внутриклеточным иммунорецепторным ингибирующим мотивом на основе тирозина (ITIM) (Uniprot.org) [4].

В нормальных клетках CD33 участвует в поддержании иммунных клеток и в межклеточных взаимодействиях [5]. Белок CD33 экспрессируется по меньшей мере в костном мозге, легком, коже, аппендиксе, селезенке, лимфатических узлах и миндалинах. Экспрессия mRNA CD33 обнаружена в самых разных тканях и органах, включая без ограничения костный мозг, головной мозг, глаз, легкое, эндокринные ткани, слюнные железы, пищевод, желудок, толстую кишку, прямую кишку, печень, желчный пузырь, поджелудочную железу, почку, мочевой пузырь, мужские и женские репродуктивные ткани, предстательную железу, молочную железу, сердце, гладкую

мускулатуру, скелетную мускулатуру, жировую ткань, кожу, тимус, аппендикс, селезенку, лимфатические узлы, миндалину, гранулоциты и кровь (например, PBMC, дендритные клетки и лимфоциты). См., например, www.proteinatlas.org/ENSG00000105383-CD33/tissue.

CD33 экспрессируется у 90% пациентов с AML [6] и является одним из наиболее широко изученных поверхностных антигенов для иммунотерапии AML. Было изучено несколько подходов для нацеливания на CD33, включая конъюгаты антитело-лекарственное средство/антитело-токсин, химерные антигенные рецепторы (CAR) и биспецифические антитела перенаправления Т-клеток [7]. Существует потребность в дополнительных связывающих CD33 доменах для терапевтических и диагностических целей.

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой тип лейкоза линии миелоидных клеток, характеризующийся быстрым развитием и прогрессированием [1]. AML является гетерогенным заболеванием с широко варьирующими молекулярными изменениями вместе с различными клиническими исходами. Более того, AML характеризуется способностью бластов AML, или лейкозных клеток, к самообновлению, непрерывной пролиферации и ускользанию от иммунной системы, что приводит к рецидиву заболевания из незначительных клонов [2]. Соответственно, исторически считается, что AML имеет один из самых низких показателей долгосрочной выживаемости, при этом общая 5-летняя выживаемость взрослых с AML составляет приблизительно 27%. Показатели выживаемости находятся в строгой обратной зависимости от возраста [3]. Исторически сложилось так, что основные стратегии лечения AML включают химиотерапию, а также трансплантацию стволовых клеток. Однако в последние годы предпринимают активные усилия по разработке иммунотерапии AML с использованием ключевых поверхностных антигенов. Одним из поверхностных антигенов, в высокой степени экспрессируемых в клетках, подверженных AML, является CD33.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27,

или его связывающему CD33 фрагменту.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;

b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;

c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;

d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;

e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;

f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или

g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает CD33, где выделенный белок содержит VHH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или

m) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает CD33, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

b) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

c) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

d) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

e) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или

f) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или

m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140. В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382, и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272,273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354,

355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272;

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273;

n) VH под SEQ ID NO: 291 и VL под SEQ ID NO: 271;

o) VH под SEQ ID NO: 292 и VL под SEQ ID NO: 271;

p) VH под SEQ ID NO: 293 и VL под SEQ ID NO: 271;

q) VH под SEQ ID NO: 294 и VL под SEQ ID NO: 271;

r) VH под SEQ ID NO: 295 и VL под SEQ ID NO: 271;

s) VH под SEQ ID NO: 296 и VL под SEQ ID NO: 271;

t) VH под SEQ ID NO: 297 и VL под SEQ ID NO: 271;

u) VH под SEQ ID NO: 298 и VL под SEQ ID NO: 271;

v) VH под SEQ ID NO: 299 и VL под SEQ ID NO: 271;

w) VH под SEQ ID NO: 300 и VL под SEQ ID NO: 271;

x) VH под SEQ ID NO: 301 и VL под SEQ ID NO: 271;

y) VH под SEQ ID NO: 302 и VL под SEQ ID NO: 271;

z) VH под SEQ ID NO: 303 и VL под SEQ ID NO: 271;

aa) VH под SEQ ID NO: 304 и VL под SEQ ID NO: 271;

ab) VH под SEQ ID NO: 305 и VL под SEQ ID NO: 271;

ac) VH под SEQ ID NO: 306 и VL под SEQ ID NO: 271;

ad) VH под SEQ ID NO: 307 и VL под SEQ ID NO: 271;

ae) VH под SEQ ID NO: 308 и VL под SEQ ID NO: 271;

af) VH под SEQ ID NO: 309 и VL под SEQ ID NO: 271;
ag) VH под SEQ ID NO: 310 и VL под SEQ ID NO: 271;
ah) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 311;
ai) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 312;
aj) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 313;
ak) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 314;
al) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 315;
am) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 316;
an) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 317;
ao) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 318;
ap) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 319;
aq) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 320;
ar) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 321;
as) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 322;
at) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 323;
au) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 324;
av) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 325;
aw) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 326;
ax) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 327;
ay) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 328;
az) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 329;
ba) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 330;
bb) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 331;
bc) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 332;
bd) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 333;
be) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 334;
bf) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 335;
bg) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 336;
bh) VH под SEQ ID NO: 337 и VL под SEQ ID NO: 272;
bi) VH под SEQ ID NO: 338 и VL под SEQ ID NO: 272;
bj) VH под SEQ ID NO: 339 и VL под SEQ ID NO: 272;
bk) VH под SEQ ID NO: 340 и VL под SEQ ID NO: 272;
bl) VH под SEQ ID NO: 341 и VL под SEQ ID NO: 272;
bm) VH под SEQ ID NO: 342 и VL под SEQ ID NO: 272;

bn) VH под SEQ ID NO: 343 и VL под SEQ ID NO: 272;

bo) VH под SEQ ID NO: 344 и VL под SEQ ID NO: 272;

bp) VH под SEQ ID NO: 345 и VL под SEQ ID NO: 272;

bq) VH под SEQ ID NO: 346 и VL под SEQ ID NO: 272;

br) VH под SEQ ID NO: 347 и VL под SEQ ID NO: 272;

bs) VH под SEQ ID NO: 348 и VL под SEQ ID NO: 272;

bt) VH под SEQ ID NO: 349 и VL под SEQ ID NO: 272;

bu) VH под SEQ ID NO: 350 и VL под SEQ ID NO: 272;

bv) VH под SEQ ID NO: 351 и VL под SEQ ID NO: 272;

bw) VH под SEQ ID NO: 352 и VL под SEQ ID NO: 272;

bx) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 353;

by) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 354;

bz) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 355;

ca) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 356;

cb) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 357;

cc) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 358;

cd) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 359;

ce) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 360;

cf) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 361;

cg) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 362;

ch) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 363;

ci) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 364;

cj) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 365;

ck) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 366;

cl) VH под SEQ ID NO: 367 и VL под SEQ ID NO: 85;

cm) VH под SEQ ID NO: 368 и VL под SEQ ID NO: 85;

cn) VH под SEQ ID NO: 369 и VL под SEQ ID NO: 85;

co) VH под SEQ ID NO: 370 и VL под SEQ ID NO: 85;

cp) VH под SEQ ID NO: 371 и VL под SEQ ID NO: 85;

cq) VH под SEQ ID NO: 372 и VL под SEQ ID NO: 85;

cr) VH под SEQ ID NO: 373 и VL под SEQ ID NO: 85;

cs) VH под SEQ ID NO: 374 и VL под SEQ ID NO: 85;

ct) VH под SEQ ID NO: 375 и VL под SEQ ID NO: 85;

cu) VH под SEQ ID NO: 376 и VL под SEQ ID NO: 85;

cv) VH под SEQ ID NO: 377 и VL под SEQ ID NO: 85;

cw) VH под SEQ ID NO: 378 и VL под SEQ ID NO: 85;

cx) VH под SEQ ID NO: 379 и VL под SEQ ID NO: 85;

cy) VH под SEQ ID NO: 380 и VL под SEQ ID NO: 85;

cz) VH под SEQ ID NO: 381 и VL под SEQ ID NO: 85;

da) VH под SEQ ID NO: 382 и VL под SEQ ID NO: 85;

db) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 383;

dc) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 384;

dd) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 385;

de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 386;

df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 387;

dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 388;

dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 389;

de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 390;

df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 391;

dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 392;

dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 393;

di) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 394;

dj) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 395;

dk) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 396;

dl) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 397; или

dm) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 398.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272;

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273;

n) VH под SEQ ID NO: 291 и VL под SEQ ID NO: 271;

o) VH под SEQ ID NO: 292 и VL под SEQ ID NO: 271;

p) VH под SEQ ID NO: 293 и VL под SEQ ID NO: 271;

q) VH под SEQ ID NO: 294 и VL под SEQ ID NO: 271;

r) VH под SEQ ID NO: 295 и VL под SEQ ID NO: 271;

s) VH под SEQ ID NO: 296 и VL под SEQ ID NO: 271;

t) VH под SEQ ID NO: 297 и VL под SEQ ID NO: 271;

u) VH под SEQ ID NO: 298 и VL под SEQ ID NO: 271;

v) VH под SEQ ID NO: 299 и VL под SEQ ID NO: 271;

w) VH под SEQ ID NO: 300 и VL под SEQ ID NO: 271;

x) VH под SEQ ID NO: 301 и VL под SEQ ID NO: 271;

y) VH под SEQ ID NO: 302 и VL под SEQ ID NO: 271;

z) VH под SEQ ID NO: 303 и VL под SEQ ID NO: 271;

aa) VH под SEQ ID NO: 304 и VL под SEQ ID NO: 271;

ab) VH под SEQ ID NO: 305 и VL под SEQ ID NO: 271;

ac) VH под SEQ ID NO: 306 и VL под SEQ ID NO: 271;

ad) VH под SEQ ID NO: 307 и VL под SEQ ID NO: 271;

ae) VH под SEQ ID NO: 308 и VL под SEQ ID NO: 271;

af) VH под SEQ ID NO: 309 и VL под SEQ ID NO: 271;

ag) VH под SEQ ID NO: 310 и VL под SEQ ID NO: 271;

ah) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 311;

ai) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 312;

aj) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 313;

ak) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 314;

al) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 315;

am) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 316;

an) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 317;

ao) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 318;

ap) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 319;

aq) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 320;

ar) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 321;

as) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 322;
at) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 323;
au) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 324;
av) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 325;
aw) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 326;
ax) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 327;
ay) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 328;
az) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 329;
ba) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 330;
bb) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 331;
bc) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 332;
bd) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 333;
be) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 334;
bf) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 335;
bg) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 336;
bh) VH под SEQ ID NO: 337 и VL под SEQ ID NO: 272;
bi) VH под SEQ ID NO: 338 и VL под SEQ ID NO: 272;
bj) VH под SEQ ID NO: 339 и VL под SEQ ID NO: 272;
bk) VH под SEQ ID NO: 340 и VL под SEQ ID NO: 272;
bl) VH под SEQ ID NO: 341 и VL под SEQ ID NO: 272;
bm) VH под SEQ ID NO: 342 и VL под SEQ ID NO: 272;
bn) VH под SEQ ID NO: 343 и VL под SEQ ID NO: 272;
bo) VH под SEQ ID NO: 344 и VL под SEQ ID NO: 272;
bp) VH под SEQ ID NO: 345 и VL под SEQ ID NO: 272;
bq) VH под SEQ ID NO: 346 и VL под SEQ ID NO: 272;
br) VH под SEQ ID NO: 347 и VL под SEQ ID NO: 272;
bs) VH под SEQ ID NO: 348 и VL под SEQ ID NO: 272;
bt) VH под SEQ ID NO: 349 и VL под SEQ ID NO: 272;
bu) VH под SEQ ID NO: 350 и VL под SEQ ID NO: 272;
bv) VH под SEQ ID NO: 351 и VL под SEQ ID NO: 272;
bw) VH под SEQ ID NO: 352 и VL под SEQ ID NO: 272;
bx) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 353;
by) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 354;
bz) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 355;

ca) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 356;
cb) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 357;
cc) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 358;
cd) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 359;
ce) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 360;
cf) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 361;
cg) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 362;
ch) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 363;
ci) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 364;
cj) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 365;
ck) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 366;
cl) VH под SEQ ID NO: 367 и VL под SEQ ID NO: 85;
cm) VH под SEQ ID NO: 368 и VL под SEQ ID NO: 85;
cn) VH под SEQ ID NO: 369 и VL под SEQ ID NO: 85;
co) VH под SEQ ID NO: 370 и VL под SEQ ID NO: 85;
cp) VH под SEQ ID NO: 371 и VL под SEQ ID NO: 85;
cq) VH под SEQ ID NO: 372 и VL под SEQ ID NO: 85;
cr) VH под SEQ ID NO: 373 и VL под SEQ ID NO: 85;
cs) VH под SEQ ID NO: 374 и VL под SEQ ID NO: 85;
ct) VH под SEQ ID NO: 375 и VL под SEQ ID NO: 85;
cu) VH под SEQ ID NO: 376 и VL под SEQ ID NO: 85;
cv) VH под SEQ ID NO: 377 и VL под SEQ ID NO: 85;
cw) VH под SEQ ID NO: 378 и VL под SEQ ID NO: 85;
cx) VH под SEQ ID NO: 379 и VL под SEQ ID NO: 85;
cy) VH под SEQ ID NO: 380 и VL под SEQ ID NO: 85;
cz) VH под SEQ ID NO: 381 и VL под SEQ ID NO: 85;
da) VH под SEQ ID NO: 382 и VL под SEQ ID NO: 85;
db) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 383;
dc) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 384;
dd) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 385;
de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 386;
df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 387;
dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 388;
dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 389;

de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 390;

df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 391;

dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 392;

dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 393;

di) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 394;

dj) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 395;

dk) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 396;

dl) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 397; или

dm) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 398.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140. В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221 274, 275 или 276. В частности, аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает миелоидный CD33, где выделенный белок содержит

a) определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 196.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно;

e) SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно;

f) SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно;

g) SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или

h) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку по пункту 32 или пункту 33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой Fab.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному белку, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой VHH. В некоторых вариантах осуществления

выделенный белок представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH). В некоторых вариантах осуществления L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140. В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

Настоящее изобретение относится к любому выделенному белку, описанному выше, где белок конъюгирован с удлиняющим период полужизни фрагментом. В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбуминсвязывающий домен или полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой моноспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит Fc-область. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3. В некоторых вариантах

осуществления выделенный белок конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig. В некоторых вариантах осуществления выделенный белок конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2). В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;
b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;
c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или
d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания белка с Fcγ-рецептором (FcγR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит

по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в домене CH3 константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

Настоящее изобретение относится к любому выделенному белку, описанному выше, где белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR). В некоторых вариантах осуществления CAR содержит

a) внеклеточный домен, содержащий любой из выделенных белков, описанных выше;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

В некоторых вариантах осуществления

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки или любых их комбинаций.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному мультиспецифическому белку, содержащему первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита. В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой антиген Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген Т-клетки представляет собой антиген $CD8^+$ Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой антиген NK-клетки. В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8,

PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C. В определенных вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой CD3ε. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, предусматривают scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, предусматривают Fab. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, предусматривают VHH. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, предусматривает scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH). В некоторых вариантах осуществления L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140. В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 под любым из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11 и HCDR3 под любым из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 или 17. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;
b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;
c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;
d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;
e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;

f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или

g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 или 74 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79 или 80. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или

m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно; или

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) HCDR1 под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, LCDR1 под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig. В определенных вариантах осуществления мультиспецифический белок, дополнительно содержащий второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig. В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140. В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A,

N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ рецептором (FcγR). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления выделенный мультиспецифический белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбраны из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A,Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V,

T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

a) L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig или

b) L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

Настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату, содержащему любой из упомянутых выше выделенных белков, конъюгированный с терапевтическим средством или визуализирующим средством. Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей любой из упомянутых выше выделенных белков и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему любой из упомянутых выше выделенных белков. Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему полинуклеотид, кодирующий любой из упомянутых выше выделенных белков. Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любой из упомянутых выше выделенных белков.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения любого из упомянутых выше выделенных белков, при этом способ включает культивирование клетки-хозяина в условиях, при которых экспрессируется белок, и извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином. В другом аспекте настоящее изобретение относится к иммуноконъюгату, содержащему любой из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, конъюгированный с терапевтическим средством или визуализирующим средством.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения любого из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, включающему культивирование любой клетки-хозяина, описанной выше, в условиях,

при которых экспрессируется мультиспецифический белок, и извлечение мультиспецифического белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества любого из упомянутых выше выделенных белков, любого из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, любого из упомянутых выше иммуноконъюгатов или любой из упомянутых выше фармацевтических композиций субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 клеток у субъекта, включающему введение любого из упомянутых выше выделенных белков, любого из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, любого из упомянутых выше иммуноконъюгатов или любой из упомянутых выше фармацевтических композиций субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие CD33 клетки являются раковыми клетками. В некоторых вариантах осуществления экспрессирующие CD33 клетки не являются раковыми клетками.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение любого из упомянутых выше выделенных белков, любого из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, любого из упомянутых выше иммуноконъюгатов или любой из упомянутых выше фармацевтических композиций субъекту для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33, включающему введение любого из упомянутых выше выделенных белков, любого из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, любого из упомянутых выше иммуноконъюгатов или любой из упомянутых выше фармацевтических композиций субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

В некоторых вариантах осуществления упомянутых выше трех аспектов рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления гематологический рак представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления гематологический

рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN). В некоторых вариантах осуществления выделенный белок или выделенный мультиспецифический белок вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию или облучение, или любую их комбинацию. Настоящее изобретение также относится к способу выявления присутствия гематологического рака у субъекта, включающему введение любого из упомянутых выше иммуноконъюгатов субъекту с подозрением на гематологический рак и визуализацию биологических структур, с которыми связан иммуноконъюгат, с выявлением тем самым присутствия гематологического рака.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему любой из упомянутых выше выделенных белков, любой из упомянутых выше выделенных мультиспецифических белков, любой из упомянутых выше иммуноконъюгатов или любую из упомянутых выше фармацевтических композиций.

Настоящее изобретение также относится к антиидиотипическому антителу, связывающемуся с любым из упомянутых выше выделенных белков.

Настоящее изобретение также относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере одни костимуляторный домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

a) В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

В некоторых вариантах осуществления

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 под любым из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11 и HCDR3 под любым из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;

b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;

c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;

d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;

e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;

f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или

g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 253, 254 или 255, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 256, 257 или 258, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 259, 260 или 261, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 265 или 266, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 267 или 268 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79, 80, 269 или 270. В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;
l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или
m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272, 273. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;
k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или
m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;
b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;
c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;
d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;
e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;
f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;
g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;
h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно; или
i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит первый линкер (L1) между VL и VH.

В определенных вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, дополнительно содержит сигнальный полипептид. В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки и их комбинации. В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 163. В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164. В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 165. В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 162. В некоторых вариантах осуществления CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

В некоторых вариантах осуществления CAR представляет собой мультиспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления Т-клетка

представляет собой $CD8^+$ Т-клетку. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;
b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;
c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или
d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;
b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;
c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;
d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244,

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному лимфоциту, экспрессирующему любой из упомянутых выше CAR. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит. В некоторых вариантах осуществления лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку. В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему любой из упомянутых выше CAR. Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, кодирующий любой из упомянутых выше CAR. Настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид или вектор. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей любой из упомянутых выше лимфоцитов и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего рак с экспрессией CD33, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества любого из упомянутых выше лимфоцитов субъекту, нуждающемуся в этом, при этом лимфоцит опосредует уничтожение рака с экспрессией CD33 у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

В другом аспекте представлен способ целевого уничтожения раковой клетки, при этом способ включает приведение раковой клетки в контакт с любым из упомянутых выше лимфоцитов, при этом лимфоцит индуцирует целевое уничтожение раковой клетки. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией

CD33 представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

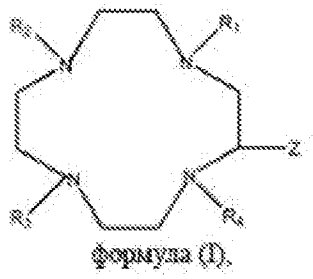
В другом аспекте представлен способ выявления присутствия рака у субъекта, включающий

a) приведение клеточного образца, полученного от субъекта, в контакт с любым из упомянутых выше CAR, с образованием тем самым комплекса CAR-клетка, и

b) выявление комплекса CAR-клетка, где выявление комплекса CAR-клетка указывает на присутствие рака у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой гематологический рак. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

В другом аспекте представлен иммуноконъюгат, содержащий любой из упомянутых выше выделенных белков, конъюгированный с радиоактивным средством. В некоторых вариантах осуществления радиоактивное средство содержит ион радиометалла. В некоторых вариантах осуществления ион радиометалла представляет собой ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{255}Fm, ^{227}Th, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{89}Zr или ^{111}In. В определенных вариантах осуществления ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac, ^{111}In или ^{89}Zr. В определенных вариантах осуществления ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac. В некоторых вариантах осуществления ион радиометалла иммуноконъюгата конъюгирован с хелатирующим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил; и

Z представляет собой $(CH2)_nY$, при этом

n равняется 1-10, и

Y представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, Z представляет собой водород; и

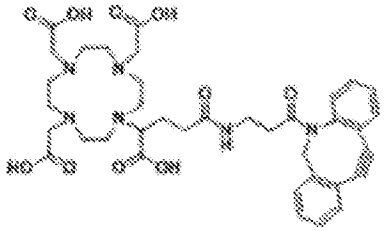
каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

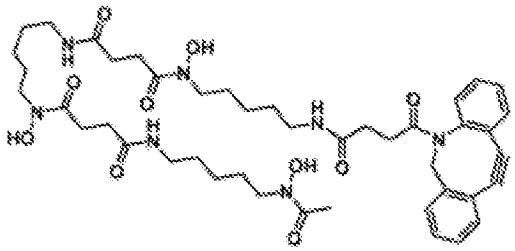
X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, хелант содержит открытоцепочечный лиганд.

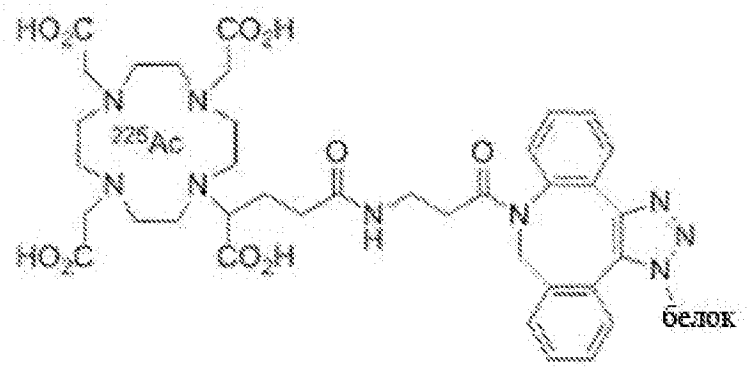
В некоторых вариантах осуществления хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (II):



или структуру формулы (III):



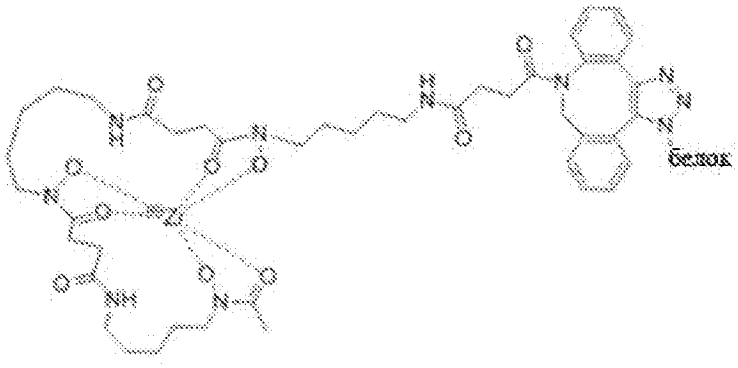
Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгату формулы (IV),



формула (IV),

где белок представляет собой любой из упомянутых выше выделенных белков.

Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгату формулы (V),



формула (V),

где белок представляет собой любой из упомянутых выше выделенных белков.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 раковую клетку у субъекта.

Настоящее изобретение относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту

средства для нацеливания терапевтического средства на одну или несколько из экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 клетку у субъекта.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 клетку у субъекта.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Файл настоящей заявки на патент содержит по меньшей мере одну фигуру, выполненную в цвете. Копии настоящей заявки на патент с цветной(-ыми) фигурой(-ами) будут предоставлены ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

На **фиг. 1** показаны репрезентативные сенсограммы BIAcore 8K взаимодействий антител vHH к CD33 с антигенами hu CD33 (FL ECD и домен IgC2).

На **фиг. 2A** и **2B** показано связывание антител к CD33 с линиями клеток-мишеней. На графиках показаны профили нелинейной регрессии антител к CD33 человека при 4°C. Построены графики зависимости медианной интенсивности флуоресценции (MFI) от логарифмической концентрации антитела. Связывание проводили путем инкубирования клеток с серийными разбавлениями антитела при 4°C с последующим выявлением с помощью конъюгированного с PE козьего F(ab')2 к IgG человека - Fc-антитела. Верхний хит для каждой клеточной линии обозначен красным цветом, а связывание линтузумаба показано на синих кривых.

На **фиг. 3** показано зависимое от времени и температуры связывание различных антител к CD33 с линиями клеток-мишеней. На графиках показаны профили нелинейной регрессии связывания антител к CD33 человека при 37°C и 4°C. Построены графики зависимости медианной интенсивности флуоресценции (MFI) от логарифмических концентраций антитела. Связывание проводили путем инкубирования клеток с серийными разбавлениями непосредственно конъюгированных антител при 37°C и 4°C.

На **фиг. 4A-4D** показана интернализация антител к CD33 на линиях клеток-мишеней с высокой, средней и низкой экспрессией. Клетки культивировали с серийными разбавлениями антител к CD33 вместе с белком A-MMAF в течение 96 ч. Через 96 часов к клеткам добавляли реагент CellTitre-Glo для измерения жизнеспособности клеток. Лунки только с белком A-MMAF считали на 100% жизнеспособными. Клетки HDLM-2 использовали в качестве клеточной линии без экспрессии. Снижение жизнеспособности клеток указывает на интернализацию антитела. На графиках показан нелинейный регрессионный анализ жизнеспособности клеток в зависимости от логарифмической концентрации антитела.

На **фиг. 5** показана кинетика интернализации антитела к CD33. Антитела к CD33 метили красителями pHAb и инкубировали с клетками при концентрации 100 нМ при 37˚C в течение указанных моментов времени, после чего клетки промывали и собирали на проточном цитометре. На графиках показаны значения MFI в указанные моменты времени.

На **фиг. 6** показана экспрессия CD33 на линиях клеток-мишеней. Линии клеток с высокой, средней и низкой экспрессией CD33 идентифицировали с применением антитела к человеческому CD33 от Biolegend. Клетки MOLM-13, Kasumi-1, OCI-AML-3 и HDLM2 окрашивали антителом (оранжевые гистограммы) или изотипическим контролем IgG мыши (синие гистограммы) и рассчитывали кратность изменения по сравнению с изотипом для каждой линии клеток.

На **фиг. 7** показана целостность антител и значения DAR после конъюгирования с красителями pHAb. Антитела метили красителями pHAb и анализировали на SDS-PAGE. Отношения лекарственного средства к антителу (DAR) рассчитывали путем измерения OD при 280 и 530 нм и поправки на поглощение красителя при 280 нм.

На **фиг. 8A и 8B** показана специфичность определения кинетики интернализации антител, опосредованной pHAb. На фиг. 8A антитела к CD33 метили красителями pHAb и инкубировали с клетками Kasumi-1 или OCI-AML-3 при концентрации 100 нМ при 4˚C в течение указанных моментов времени, после чего клетки промывали и собирали на проточном цитометре. На графиках показаны значения MFI в указанные моменты времени. При 4˚C интернализацию не наблюдали. На фиг. 8B показано, что антитела также инкубировали с клетками HDLM-2 при 37˚C. Усиление MFI не наблюдали.

На **фиг. 9** показана сводная таблица значений EC_{50} связывания антител к CD33 для линий клеток с высокой (MOLM-13), средней (Kasumi-1) и низкой (OCI-AML-3)

плотностью рецепторов. Связывание осуществляли при 4°C с серийными разбавлениями антитела.

На **фиг. 10** показана сводная таблица интернализации антитела к CD33 на различных линиях клеток-мишеней. Для MOLM-13 и OCI-AML-3 указаны значения EC_{50}. Для Kasumi-1 показан % жизнеспособности при концентрации 100 нМ.

На **фиг. 11** представлена схема, на которой продемонстрировано связывание биспецифического антитела к TRGV9/к CD33 для привлечения γδ Т-клеток к раковой клетке, которая является CD33+, и для индуцирования гибели раковой клетки.

На **фиг. 12** показаны результаты анализа целостности биспецифического антитела VG4 с помощью геля SDS-PAGE (в невосстанавливающих условиях).

На **фиг. 13-15** показаны результаты анализов связывания антитела к CD33 (клон C33B904) с панелью линий опухолевых клеток, измеренные с помощью FACS. EC50 для MOLM-13 (с высокой плотностью рецепторов) составляла 134,3 нМ, для Kasumi-1 (с умеренной плотностью) составляла 82,2 нМ и для OCI-AML-3 (с низкой поверхностной плотностью) составляла 16,4 нМ.

На **фиг. 16-17** представлены результаты эксперимента, из которого видно, что биспецифическое антитело к TRGV9/к CD33 опосредует цитотоксичность γδ Т-клеток в отношении экспрессирующих CD33 клеток Kasumi-3 *in vitro*. В эксперименте обогащенные γδ Т-клетки (эффекторы), выделенные из PBMC, культивированных с золедроновой кислотой + IL-2 + IL-15 в течение 12 дней, совместно культивировали с меченными CFSE клетками Kasumi-3 (мишени) в отношениях 1:1 и 5:1 E:T в присутствии различных концентраций биспецифического антитела в течение 24 часов. На кривых зависимости ответа от дозы показано, что биспецифические антитела к TRGV9/к CD33 и к TRGV9/к NULL опосредуют цитотоксичность γδ Т-клеток в отношении экспрессирующих CD33 клеток kasumi-3 зависимым от дозы образом при отношениях 1:1 и 5:1 E:T. Представленные в данном документе значения цитотоксичности вычитали из исходного значения цитотоксичности, наблюдаемого в отсутствие биспецифического антитела. Значения EC_{50} рассчитывали, как описано в способах. Представленные в данном документе репрезентативные данные получены в одном эксперименте.

На **фиг. 18** представлены результаты экспериментов, из которых видно, что биспецифическое антитело к TRGV9/к CD33 опосредует цитотоксичность γδ Т-клеток в отношении экспрессирующих CD33 клеток Kasumi-3 *in vitro*. PBMC здоровых доноров (эффекторы), культивированные с золедроновой кислотой + IL-2 + IL-15 в

течение 12 дней, совместно культивировали с меченными CFSE клетками Kasumi-3 (мишени) в отношениях 1:1 E:T в присутствии различных концентраций биспецифического антитела в течение 24 часов.

На **фиг. 19** показан in silico анализ потенциального риска посттрансляционных модификаций (PTM). Выделены некоторые потенциальные мотивы риска PTM (DG, NG, DP).

На **фиг. 20** показаны результаты анализов для оценки термостабильности scFv, полученных из библиотеки NNK на основе C33B1475 (SEQ ID NO: 274). Для оценки термостабильности каждого варианта проводили анализы ELISA. Надосадочные жидкости E. coli подвергали тепловой обработке при 55°C, 60°C, 65°C и сигналы люминесценции нормализовали по отношению к необработанному находящемуся при комнатной температуре тому же клону.

На **фиг. 21** показаны результаты анализа для оценки термостабильности scFv, полученного из библиотеки NNK на основе C33B1516 (SEQ ID NO: 275). Для оценки термостабильности каждого варианта проводили анализы ELISA. Надосадочные жидкости E. coli подвергали тепловой обработке при 55°C, 60°C, 65°C и сигналы люминесценции нормализовали по отношению к необработанному находящемуся при комнатной температуре тому же клону.

На **фиг. 22** показаны результаты анализа для оценки термостабильности scFv, полученного из библиотеки NNK на основе C33B1517 (SEQ ID NO: 216). Для оценки термостабильности каждого варианта проводили анализы ELISA. Надосадочные жидкости E. coli подвергали тепловой обработке при 55°C, 60°C, 65°C и сигналы люминесценции нормализовали по отношению к необработанному находящемуся при комнатной температуре тому же клону.

На **фиг. 23** показаны результаты анализа для оценки термостабильности scFv, полученного из библиотеки NNK на основе C33B1522 (SEQ ID NO: 213). Для оценки термостабильности каждого варианта проводили анализы ELISA. Надосадочные жидкости E. coli подвергали тепловой обработке при 55°C, 60°C, 65°C и сигналы люминесценции нормализовали по отношению к необработанному находящемуся при комнатной температуре тому же клону.

На **фиг. 24** показана таблица с перечнем вариантов последовательностей VH и VL, идентифицированных в ходе скрининга библиотеки NNK.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Раскрываемые способы можно легче понять при обращении к следующему подробному описанию, рассматриваемому в сочетании с прилагаемыми графическими материалами, которые образуют часть настоящего раскрытия. Следует учитывать, что раскрытые способы не ограничиваются конкретными способами, описанными и/или показанными в данном документе, и что терминология, используемая в данном документе, представлена с целью описания конкретных вариантов осуществления исключительно в качестве примера и не предполагает ограничения заявленных способов.

Все патенты, опубликованные заявки на патент и публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки, как если бы они были полностью изложены в данном документе.

При наличии перечня, если не указано иное, следует понимать, что каждый отдельный элемент из этого перечня и каждая комбинация из этого перечня представляет собой отдельный вариант осуществления. Например, перечень вариантов осуществления, представленный в виде "**A, B или C**", следует интерпретировать как включающий варианты осуществления "A", "B", "C", "A или B", "A или C", "B или C" или "A, B или C".

Применяемая в данном описании и прилагаемой формуле изобретения форма единственного числа также предусматривает объекты во множественном числе, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, упоминание "клетки" включает комбинацию двух или более клеток и т. п.

Переходные термины "**содержащий**", "**по сути состоящий из**" и "**состоящий из**" предназначены для обозначения их общепринятых значений в профессиональном языке патентов; то есть (i) термин "содержащий", который является синонимом терминов "включающий", "включающий в себя" или "характеризующийся", является включающим или открытым и не исключает дополнительные, не упомянутые элементы или стадии способа; (ii) термин "состоящий из" исключает любые элемент, стадию или ингредиент, не указанные в пункте формулы изобретения; и (iii) термин "по сути состоящий из" ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или стадиями "и теми, которые существенно не влияют на основную(-ые) и новую(-ые) характеристику(-и)" заявляемого изобретения. Также предусмотрены варианты осуществления, описанные посредством фразы "содержащий" (или ее эквивалентов), как и те варианты осуществления, которые независимо описаны посредством терминов "состоящий из" и "по сути состоящий из".

Термин "**приблизительно**" означает в пределах приемлемого диапазона погрешности для конкретного значения, как определено специалистом в данной области, что будет частично зависеть от способа измерения или определения значения, т. е. от ограничений измерительной системы. Если явно не указано иное, то в разделе "Примеры" или в других местах в данном описании в контексте конкретного анализа, результата или варианта осуществления, термин "приблизительно" означает в пределах одного стандартного отклонения в соответствии с практикой в уровне техники, или в диапазоне до 5%, в зависимости от того, что больше.

Термины "**активация**", или "**стимуляция**", или "**активированный**", или "**стимулированный**" относятся к индукции изменения биологического состояния клетки, приводящего к экспрессии маркеров активации, продуцированию цитокинов, пролиферации или опосредованию цитотоксичности в отношении клеток-мишеней. Клетки могут быть активированы первичными стимулирующими сигналами. Костимулирующие сигналы могут усиливать величину первичных сигналов и подавлять гибель клеток после первоначальной стимуляции, что приводит к более длительному состоянию активации и, следовательно, к более высокой цитотоксической способности. Термин "**костимулирующий сигнал**" относится к сигналу, который в комбинации с первичным сигналом, таким как лигирование TCR/CD3, приводит к пролиферации Т-клеток и/или NK-клеток и/или к повышающей регуляции или понижающей регуляции ключевых молекул.

Термин "**альтернативная каркасная структура**" относится к одноцепочечному белковому каркасу, который содержит структурированное ядро, связанное с вариабельными доменами с высокой конформационной толерантностью. Вариабельные домены допускают введение вариации без нарушения целостности каркасной структуры, и поэтому вариабельные домены могут быть сконструированы и отобраны для связывания с конкретным антигеном.

Термин "**антителозависимая клеточная цитотоксичность**", "**антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность**" или "**ADCC**" относится к механизму индуцирования гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с эффекторными клетками, обладающими литической активностью, такими как естественные киллерные (NK) клетки, моноциты, макрофаги и нейтрофилы через Fc гамма рецепторы (FcγR), экспрессированные на эффекторных клетках.

Термин "**антителозависимый клеточный фагоцитоз**" или "**ADCP**" относится к механизму устранения покрытых антителами клеток-мишеней путем интернализации фагоцитарными клетками, такими как макрофаги или дендритные клетки.

Термин "**антиген**" относится к любой молекуле (например, белку, пептиду, полисахариду, гликопротеину, гликолипиду, нуклеиновой кислоте, их частям или их комбинациям), способной связываться антигенсвязывающим доменом или Т-клеточным рецептором, что может вызывать иммунный ответ. Иллюстративные иммунные ответы включают продуцирование антител и активацию иммунных клеток, таких как Т-клетки, В-клетки или NK-клетки. Антигены могут быть экспрессированы генами, синтезированы или очищены из биологических образцов, таких как образец ткани, образец опухоли, клетка или жидкость с другими биологическими компонентами, организмами, субъединицами белков/антигенов, убитыми или инактивированными целыми клетками или лизатами.

Термин "**антигенсвязывающий фрагмент**" или "**антигенсвязывающий домен**" относится к части белка, которая связывает антиген. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть синтетическими, ферментативно получаемыми или генетически сконструированными полипептидами и включают части иммуноглобулина, которые связывают антиген, такие как VH, VL, VH и VL, фрагменты Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd и Fv, доменные антитела (dAb), состоящие из одного домена VH или одного домена VL, акульи вариабельные домены IgNAR, верблюжьи домены VH, домены VHH, минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют CDR антитела, такие как части FR3-CDR3-FR4, HCDR1, HCDR2 и/или HCDR3 и LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3, альтернативные каркасные структуры, которые связывают антиген, и мультиспецифические белки, содержащие антигенсвязывающие фрагменты. Антигенсвязывающие фрагменты (такие как VH и VL) могут быть соединены вместе с помощью синтетического линкера с образованием различных типов конструкций одиночных антител, где домены VH/VL могут спариваться внутримолекулярно или межмолекулярно в тех случаях, когда домены VH и VL экспрессируются отдельными одиночными цепями, с образованием одновалентного антигенсвязывающего домена, такого как одноцепочечный Fv (scFv) или диатело. Антигенсвязывающие фрагменты также могут быть конъюгированы с другими антителами, белками, антигенсвязывающими фрагментами или альтернативными каркасными структурами, которые могут быть моноспецифическими

или мультиспецифическими, для конструирования биспецифических и мультиспецифических белков.

Термин "**антитела**" рассматривается в широком смысле и включает молекулы иммуноглобулина, в том числе моноклональные антитела, включая мышиные, человеческие, гуманизированные и химерные моноклональные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, мультиспецифические антитела, такие как биспецифические, триспецифические, тетраспецифические и т. д., димерные, тетрамерные или мультимерные антитела, одноцепочечные антитела, доменные антитела и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которые содержат антигенсвязывающий сайт требуемой специфичности. "Полноразмерные антитела" состоят из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), связанных между собой дисульфидными связями, а также их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (состоящей из доменов CH1, шарнирной области, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, организованных от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам IgA, IgD, IgE, IgG и IgM в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделены на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи антитела любого вида позвоночных животных можно отнести к одному из двух четко различающихся типов, а именно каппа (k) и лямбда (λ), исходя из аминокислотных последовательностей их константных доменов.

Термин "**биспецифическая**" относится к молекуле (такой как антитело), которая специфически связывает два разных антигена или два разных эпитопа в одном и том же антигене. Биспецифическая молекула может характеризоваться перекрестной реактивностью по отношению к другим родственным антигенам, например к тому же антигену других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например, *Macaca cynomolgus* (яванский макак, cyno) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который является общим для двух или более различных антигенов.

Термин "**рак**" относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. В результате нерегулируемого деления и роста клеток образуются злокачественные опухоли, которые проникают в соседние ткани, а также могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровоток. Термин "рак" или "раковая ткань" может включать опухоль.

Используемый в данном документе термин "**химерный антигенный рецептор**" (CAR) определяется как рецептор клеточной поверхности, включающий внеклеточный домен, связывающий мишень, трансмембранный домен и внутриклеточный домен передачи сигнала в комбинации, которая в природе не встречается вместе в одном белке. Сюда входят рецепторы, в которых внеклеточный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала не встречаются вместе на одном рецепторном белке. CAR предназначены в первую очередь для применения с лимфоцитами, такими как Т-клетки и естественные киллерные (NK) клетки.

Термин "**комплемент-зависимая цитотоксичность**" или "**CDC**", относится к механизму индуцирования гибели клеток, при котором Fc эффекторный домен связанного с мишенью белка связывается и активирует компонент комплемента C1q, который в свою очередь активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клеток-мишеней. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, что облегчает CDC за счет связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

Термин "**определяющие комплементарность области**" (CDR) означает области антитела, которые связывают антиген. В VH содержатся три CDR (HCDR1, HCDR2, HCDR3), и в VL содержатся три CDR (LCDR1, LCDR2, LCDR3). CDR могут быть определены с применением различных методик картирования, таких как картирование по Kabat (Wu et al. (1970) J Exp Med 132: 211-50; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), Chothia (Chothia et al. (1987) J Mol Biol 196: 901-17), IMGT (Lefranc et al. (2003) Dev Comp Immunol 27: 55-77), AbM (Martin and Thornton J Bmol Biol 263: 800-15, 1996) и Contact, которые основаны на анализе доступных кристаллических структур комплекса (MacCallum, R. M., Martin, A. C. R. and Thornton, J. T. "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography" J. Mol. Biol. 262:732-745). Описано соответствие между различными методиками картирования и нумерацией вариабельной области (см., например, Lefranc et al. (2003)

Dev Comp Immunol 27: 55-77; Honegger and Pluckthun, J Mol Biol (2001) 309:657-70; международная база данных ImMunoGeneTics (IMGT); веб-ресурс, www.imgt.org). Доступные программы, такие как abYsis от UCL Business PLC, можно применять для картирования CDR. Используемый в данном документе термин "CDR", "HCDR1", "HCDR2", "HCDR3", "LCDR1", "LCDR2" и "LCDR3" включает CDR, определенные любым из способов, описанных выше, Kabat, Chothia, IMGT, AbM или Contact, если в данном описании явным образом не указано иное. CDR последовательностей под SEQ ID NO. 1-17, 28-51, 62-80, 89-94, 98-104, 141-146, 149-154, 167-169, 172-174, 176-178, 180, 182-184, 186, 187, 189-191, 193-195, 197-199, 201, 236-244, 253-261 и 265-270 определены согласно Kabat. CDR последовательностей под SEQ ID NO. 399-434 определены согласно AbM. CDR последовательностей под SEQ ID NO. 435-470, определены согласно Chothia. CDR последовательностей под SEQ ID NO. 471-506 определены согласно IMGT. CDR последовательностей под SEQ ID NO. 507-542 определены согласно Contact.

Термины "**снижение**", "**понижение**", "**ослабление**", "**уменьшение**" или "**устранение**" в целом относятся к способности тестируемой молекулы опосредовать уменьшенный ответ (т. е. эффект в направлении передачи сигнала) по сравнению с ответом, опосредованным контролем или средой-носителем. Примерами ответов являются экспансия Т-клеток, активация Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fcγ или усиление эффекторных функций Fc, таких как усиление ADCC, CDC и/или ADCP. Снижение может представлять собой статистически значимую разницу в измеренном ответе между тестируемой молекулой и контролем (или средой-носителем) или снижение измеренного ответа, например снижение в приблизительно 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или больше, например в 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или больше (включая все целые числа и десятичные дроби между и выше 1, например 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин "**дифференцировка**" относится к способу снижения действенности или пролиферации клетки или перевода клетки в более ограниченное в развитии состояние.

Термин "**кодировать**" или "**кодирующий**" относится к генетически детерминированному свойству определенных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, cDNA или mRNA, служить матрицами для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих либо

определенную последовательность нуклеотидов (например, rRNA, tRNA и mRNA), либо определенную последовательность аминокислот и вытекающие из этого биологические свойства. Таким образом, ген, cDNA или РНК кодирует белок, если транскрипция и трансляция mRNA, соответствующей этому гену, приводит к продуцированию белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая нить, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности mRNA, так и некодирующая нить, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или cDNA, могут называться кодирующими белок или другой продукт этого гена или cDNA.

Термины "**усиление**", "**обеспечение**", "**повышение**", "**расширение**" или "**улучшение**" в целом относятся к способности тестируемой молекулы опосредовать более сильный ответ (т. е. эффект в направлении передачи сигнала) по сравнению с ответом, опосредованным контролем или средой-носителем. Примерами ответов являются экспансия Т-клеток, активация Т-клеток или опосредованное Т-клетками уничтожение опухолевых клеток или связывание белка с его антигеном или рецептором, усиленное связывание с Fcγ или усиление эффекторных функций Fc, таких как усиление ADCC, CDC и/или ADCP. Усиление может представлять собой статистически значимую разницу в измеренном ответе между тестируемой молекулой и контролем (или средой-носителем) или усиление измеренного ответа, например усиление в приблизительно 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 30 раз или больше, например в 500, 600, 700, 800, 900 или 1000 раз или больше (включая все целые числа и десятичные дроби между и выше 1, например 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 и т. д.).

Термин "**экспансия**" относится к результатам деления и гибели клеток.

Термины "**экспрессировать**" и "**экспрессия**" относятся к хорошо известной транскрипции и трансляции, происходящей в клетках или *in vitro*. Таким образом, продукт экспрессии, например белок, экспрессируется клеткой или *in vitro* и может быть внутриклеточным, внеклеточным или трансмембранным белком.

Термин "**вектор экспрессии**" относится к вектору, который может быть использован в биологической системе или в восстановленной биологической системе для направления трансляции полипептида, кодируемого полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в векторе экспрессии.

Термин "**dAb**" или "**dAb-фрагмент**" относится к фрагменту антитела, состоящему из домена VH (Ward et al., Nature 341:544 546 (1989)).

Термин "**Fab**" или "**Fab-фрагмент**" относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH, CH1, VL и CL.

Термин "**F(ab')$_2$**" или "**F(ab')$_2$-фрагмент**" относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области.

Термин "**Fd**" или "**Fd-фрагмент**" относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и CH1.

Термин "**Fv**" или "**Fv-фрагмент**" относится к фрагменту антитела, состоящему из доменов VH и VL из одного плеча антитела.

"**Полноразмерное антитело**" состоит из двух тяжелых цепей (HC) и двух легких цепей (LC), связанных между собой дисульфидными связями, а также их мультимеров (например, IgM). Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (VH) и константного домена тяжелой цепи, при этом константный домен тяжелой цепи состоит из субдоменов CH1, шарнира, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех сегментов FR, организованных от амино- к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4.

Термин "**генетическая модификация**" относится к введению "чужеродного" (т. е. внешнего или внеклеточного) гена, последовательности ДНК или РНК в клетку-хозяина, чтобы клетка-хозяин экспрессировала введенные ген или последовательность для продуцирования необходимого вещества, обычно белка или фермента, кодируемого введенным геном или последовательностью. Введенный ген или последовательность могут также называться "клонированными" или "чужеродными" геном или последовательностью, могут включать регуляторные или контрольные последовательности, функционально связанные с полинуклеотидом, кодирующим химерный антигенный рецептор, такие как старт-последовательность, стоп-последовательность, промоторные, сигнальные, секреторные или другие последовательности, используемые генетическим механизмом клетки. Ген или последовательность могут включать нефункциональные последовательности или последовательности с неизвестной функцией. Клетка-хозяин, которая получает и экспрессирует введенную ДНК или РНК, была "генетически сконструирована". ДНК

или РНК, вводимые в клетку-хозяина, могут происходить из любого источника, включая клетки одного и того же рода или вида, что и клетка-хозяин, или из другого рода или вида.

Термин "**гетерологичный**" относится к двум или более полинуклеотидам или двум или более полипептидам, которые не встречаются в одной и той же взаимосвязи друг с другом в природе.

Термин "**гетерологичный полинуклеотид**" относится к не встречающемуся в природе полинуклеотиду, который кодирует два или более неоантигенов, которые описаны в данном документе.

Термин "**гетерологичный полипептид**" относится к не встречающемуся в природе полипептиду, содержащему два или более неоантигенов, которые описаны в данном документе.

Термин "**клетка-хозяин**" относится к любой клетке, содержащей гетерологичную нуклеиновую кислоту. Примером гетерологичной нуклеиновой кислоты является вектор (например, вектор экспрессии).

Термин "**человеческое антитело**" относится к антителу, которое оптимизировано таким образом, что оно вызывает минимальный иммунный ответ при введении субъекту-человеку. Вариабельные области человеческого антитела получены из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Если человеческое антитело содержит константную область или часть константной области, то константная область также получена из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелых и легких цепей, которые "получены из" последовательностей человеческого происхождения, если вариабельные области человеческого антитела получены из системы, использующей человеческие иммуноглобулины зародышевой линии или перестроенные гены иммуноглобулинов. Такие иллюстративные системы представляют собой библиотеки генов человеческого иммуноглобулина, представленные на фаге, и трансгенных животных, отличных от человека, таких как мыши или крысы, несущие локусы человеческого иммуноглобулина. "Человеческое антитело", как правило, содержит аминокислотные различия при сравнении с иммуноглобулинами, экспрессирующимися у людей, вследствие различий между системами, используемыми для получения человеческого антитела и локусов человеческого иммуноглобулина, введения соматических мутаций или преднамеренного введения замен в каркасную последовательность или CDR, или того и другого. Как правило, "человеческое

антитело" на по меньшей мере приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентично по аминокислотной последовательности аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим иммуноглобулином зародышевой линии или перестроенными генами иммуноглобулина. В некоторых случаях "человеческое антитело" может содержать консенсусные каркасные последовательности, полученные в результате анализа человеческих каркасных последовательностей, например, которые описаны в Knappik et al., (2000) J Mol Biol 296:57-86, или синтетическую HCDR3, включенную в библиотеки генов человеческого иммуноглобулина, представленные на фаге, например, которая описана в Shi et al., (2010) J Mol Biol 397:385-96, и публикации международной заявки на патент № WO2009/085462. Антитела, в которых по меньшей мере одна CDR получена от вида, отличного от человека, не включены в определение термина "человеческое антитело".

Термин "**гуманизированное антитело**" относится к антителу, в котором по меньшей мере одна CDR получена от вида, отличного от человека, и по меньшей мере одна каркасная последовательность получена из последовательностей человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело может содержать замены в каркасных последовательностях таким образом, что каркасные последовательности могут не являться точными копиями экспрессируемого человеческого иммуноглобулина или последовательностей гена человеческого иммуноглобулина зародышевой линии.

Термин "**в комбинации с**" означает, что два или более терапевтических средства вводят субъекту вместе в смеси, одновременно как отдельные средства или последовательно как отдельные средства в любом порядке.

Термин "**домен внутриклеточной передачи сигнала**" или "**цитоплазматический домен передачи сигнала**" относится к внутриклеточной части молекулы. Это функциональная часть белка, которая действует путем передачи информации внутри клетки для регулирования клеточной активности через определенные пути передачи сигнала путем генерирования вторых мессенджеров или функционирования в качестве эффекторов, отвечая на такие мессенджеры. Домен внутриклеточной передачи сигнала генерирует сигнал, который обеспечивает иммунную эффекторную функцию CAR-содержащей клетки, например CAR-T-клетки.

Термин "**выделенный**" относится к гомогенной популяции молекул (таких как синтетические полинуклеотиды или полипептиды), которая была по сути отделена и/или очищена от других компонентов системы, в которой получают молекулы, такой

как рекомбинантная клетка, а также белку, который был подвергнут по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. Термин "выделенный" относится к молекуле, которая по сути не содержит другого клеточного материала и/или химических веществ, и охватывает молекулы, которые выделены до более высокой чистоты, например до 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% чистоты.

Термин "**модулировать**" относится к усиленной или пониженной способности тестируемой молекулы опосредовать усиленный или пониженный ответ (т. е. эффект в направлении передачи сигнала) по сравнению с ответом, опосредованным контролем или средой-носителем.

Термин "**моноклональное антитело**" относится к антителу, полученному из по сути гомогенной популяции молекул антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных хорошо известных изменений, таких как удаление С-концевого лизина из тяжелой цепи антитела или посттрансляционные модификации, такие как изомеризация или дезамидирование аминокислот, окисление метионина или дезамидирование аспарагина или глутамина. Моноклональные антитела обычно связывают один антигенный эпитоп. Биспецифическое моноклональное антитело связывает два разных антигенных эпитопа. Моноклональные антитела могут характеризоваться гетерогенным гликозилированием в пределах популяции антител. Моноклональное антитело может быть моноспецифическим или мультиспецифическим, как, например, биспецифическим, или моновалентным, бивалентным или поливалентным.

Термин "**мультиспецифическая**" относится к молекуле, такой как антитело, которая специфически связывает два или более разных антигена или два или более разных эпитопа в одном и том же антигене. Мультиспецифическая молекула может характеризоваться перекрестной реактивностью по отношению к другим родственным антигенам, например к тому же антигену других видов (гомологов), таких как человек или обезьяна, например *Macaca fascicularis* (яванский макак, cyno) или *Pan troglodytes*, или может связывать эпитоп, который является общим для двух или более различных антигенов.

Термины "**естественная киллерная клетка**" и "**NK-клетка**" используют в данном документе взаимозаменяемо и синонимично. NK-клетка относится к дифференцированным лимфоцитам с фенотипом $CD16^+$ $CD56^+$ и/или $CD57^+$ TCR^-. NK-клетки характеризуются способностью связываться с клетками, не экспрессирующими

"собственные" антигены MHC/HLA, и уничтожать их путем активации специфических цитолитических ферментов, способностью уничтожать опухолевые клетки или другие больные клетки, экспрессирующие лиганд для активирующих рецепторов NK, и способностью высвобождать белковые молекулы, называемые цитокинами, которые стимулируют или ингибируют иммунный ответ.

Термин "**функционально связанный**" и подобные фразы при использовании в отношении нуклеиновых кислот или аминокислот, относятся к функциональной связи последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей, соответственно, находящихся в функциональных взаимосвязях друг с другом. Например, функционально связанные промотор, энхансерные элементы, открытая рамка считывания, 5' и 3' UTR и терминаторные последовательности приводят к точному продуцированию молекулы нуклеиновой кислоты (например, РНК) и в некоторых случаях к продуцированию полипептида (т. е. экспрессии открытой рамки считывания). Функционально связанный пептид относится к пептиду, в котором функциональные домены пептида расположены на соответствующем расстоянии друг от друга для обеспечения предполагаемой функции каждого домена.

Термин "**фармацевтическая комбинация**" относится к комбинации двух или более активных ингредиентов, вводимых либо вместе, либо раздельно.

Термин "**фармацевтическая композиция**" относится к композиции, которая является результатом объединения активного ингредиента и фармацевтически приемлемого носителя.

Термин "**фармацевтически приемлемый носитель**" или "вспомогательное вещество" относится к ингредиенту фармацевтической композиции, отличному от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Иллюстративными фармацевтически приемлемыми носителями являются буфер, стабилизатор или консервант.

Термин "**полинуклеотид**" или "**нуклеиновая кислота**" относится к синтетической молекуле, содержащей цепь нуклеотидов, ковалентно связанных сахарно-фосфатным остовом или другим эквивалентным ковалентным химическим соединением. cDNA является типичным примером полинуклеотида. Полинуклеотид может представлять собой молекулу ДНК или РНК.

Термины "**предупреждать**", "**предупреждающий**", "**предупреждение**" или "**профилактика**" заболевания или нарушения означает предупреждение возникновения нарушения у субъекта.

Термин "**пролиферация**" относится к усилению деления клеток, либо симметричного, либо асимметричного деления клеток.

Термин "**промотор**" относится к минимальным последовательностям, необходимым для инициации транскрипции. Промотор может также включать энхансеры или репрессорные элементы, которые усиливают или подавляют транскрипцию, соответственно.

Термин "**белок**" или "**полипептид**" используют в данном документе взаимозаменяемо и относятся к молекуле, которая содержит один или несколько полипептидов, каждый из которых состоит по меньшей мере из двух аминокислотных остатков, соединенных пептидной связью. Белок может быть мономером или представлять собой белковый комплекс из двух или более субъединиц, при этом субъединицы являются одинаковыми или разными. Небольшие полипептиды, состоящие из менее чем 50 аминокислот, могут называться "пептидами". Белок может представлять собой гетерологичный слитый белок, гликопротеин или белок, модифицированный посттрансляционными модификациями, такими как фосфорилирование, ацетилирование, миристоилирование, пальмитоилирование, гликозилирование, окисление, формилирование, амидирование, цитруллинирование, полиглутамилирование, АДФ-рибозилирование, пегилирование или биотинилирование. Белок может быть экспрессирован рекомбинантно.

Термин "**рекомбинантный**" относится к полинуклеотидам, полипептидам, векторам, вирусам и другим макромолекулам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантным способом.

Термин "**регуляторный элемент**" относится к любому действующему в цис- или транс-положении генетическому элементу, который контролирует некоторые аспекты экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот.

Термин "**рецидивный**" относится к заболеванию или признакам и симптомам заболевания, которые возвращаются после периода улучшения после предшествующего лечения терапевтическим средством.

Термин "**рефрактерный**" относится к заболеванию, которое не отвечает на лечение. Рефрактерное заболевание может быть устойчивым к лечению до или в начале лечения, или рефрактерное заболевание может стать устойчивым во время лечения.

Термин "**одноцепочечный Fv**" или "**scFv**" относится к слитому белку, включающему по меньшей мере один фрагмент антитела, включающий вариабельную

область легкой цепи (VL), и по меньшей мере один фрагмент антитела, включающий вариабельную область тяжелой цепи (VH), где VL и VH смежно связаны через полипептидный линкер, и способному экспрессироваться в виде одноцепочечного полипептида. Если не указано, то как используется в данном документе, scFv может иметь вариабельные области VL и VH в любом порядке, например по отношению к N-концу и C-концу полипептида, scFv может содержать VL-линкер-VH или может содержать VH-линкер-VL.

Термины "**специфически связывается**", "**специфическое связывание**", "**специфически связывающийся**" или "**связывает**" относятся к связыванию белковой молекулы с антигеном или эпитопом в антигене с большей аффинностью, чем с другими антигенами. Как правило, белковая молекула связывается с антигеном или эпитопом в антигене с равновесной константой диссоциации (K_D), составляющей приблизительно $1x10^{-7}$ M или меньше, например приблизительно $5x10^{-8}$ M или меньше, приблизительно $1x10^{-8}$ M или меньше, приблизительно $1x10^{-9}$ M или меньше, приблизительно $1x10^{-10}$ M или меньше, приблизительно $1x10^{-11}$ M или меньше или приблизительно $1x10^{-12}$ M или меньше, как правило с K_D, которая является в по меньшей мере сто раз меньшей, чем ее K_D для связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином).

Термин "**субъект**" включает любого человека или не являющего человеком животного. Термин "не являющееся человеком животное" включает всех позвоночных, например млекопитающих и не являющихся млекопитающими, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д. Термины "субъект" и "пациент" могут быть использованы в данном документе взаимозаменяемо.

Термин "**Т-клетка**" и "**Т-лимфоцит**" являются взаимозаменяемыми и используются в данном документе как синонимы. Т-клетка включает тимоциты, наивные Т-лимфоциты, Т-клетки памяти, незрелые Т-лимфоциты, зрелые Т-лимфоциты, покоящиеся Т-лимфоциты или активированные Т-лимфоциты. Т-клетка может представлять собой Т-хелперную (Th) клетку, например Т-хелперную клетку 1 (Th1) или Т-хелперную клетку 2 (Th2). Т-клетка может представлять собой хелперную Т-клетку (HTL; $CD4^+$ Т-клетку) $CD4^+$ Т-клетку, цитотоксическую Т-клетку (CTL; $CD8^+$ Т-клетку), инфильтрующую опухоль цитотоксическую Т-клетку (TIL; $CD8^+$ Т-клетку), $CD4^+CD8^+$ Т-клетку или любую другую подгруппу Т-клеток. Также включены "NKT-клетки", которые относятся к специализированной популяции Т-клеток,

экспрессирующих полуинвариантный αβ Т-клеточный рецептор, но также экспрессирующих ряд молекулярных маркеров, которые обычно ассоциируются с NK-клетками, такими как NK1.1. NKT-клетки включают $NK1.1^+$ и $NK1.1^-$, а также $CD4^+$, $CD4^-$, $CD8^+$ и $CD8^-$ клетки. TCR на NKT-клетках уникален тем, что он распознает гликолипидные антигены, представленные MHC I-подобной молекулой CD Id. NKT-клетки могут оказывать как защитное, так и вредное воздействие из-за своей способности продуцировать цитокины, способствующие либо воспалению, либо иммунной толерантности. Также включены "гамма-дельта Т-клетки (γδ Т-клетки)", которые относятся к специализированной популяции, представляющей собой небольшую подгруппу Т-клеток, обладающих отдельным TCR на своей поверхности, и в отличие от большинства Т-клеток, в которых TCR состоит из двух гликопротеиновых цепей, обозначаемых как α- и β-TCR-цепи, TCR в γδ Т-клетках состоит из γ-цепи и δ-цепи. γδ Т-клетки могут играть роль в иммунном надзоре и иммунной регуляции, и было обнаружено, что они являются важным источником IL-17 и вызывают устойчивый ответ $CD8^+$ цитотоксических Т-клеток. Также включены "регуляторные Т-клетки" или "Treg", которые относятся к Т-клеткам, подавляющим аномальный или чрезмерный иммунный ответ и играющим роль в иммунной толерантности. Treg обычно представляют собой транскрипционный фактор Foxp3-положительные $CD4^+$Т-клетки и могут также включать транскрипционный фактор Foxp3-отрицательные регуляторные Т-клетки, которые являются IL-10-продуцирующими $CD4^+$Т-клетками.

Термины "**терапевтически эффективное количество**" или "**эффективное количество**", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к количеству, эффективному при дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения необходимого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность терапевтического средства или комбинации терапевтических средств вызывать необходимій ответ у индивидуума. Иллюстративные показатели эффективного терапевтического средства или комбинации терапевтических средств включают, например, улучшение самочувствия пациента, уменьшение опухолевой нагрузки, остановку или замедление роста опухоли и/или отсутствие метастазирования раковых клеток в другие места в организме.

Термин "**трансдукция**" относится к введению чужеродной нуклеиновой кислоты в клетку с использованием вирусного вектора.

Термины "**лечить**", "**лечащий**" или "**лечение**" заболевания или нарушения, такого как рак, относится к достижению одного или нескольких из следующего: уменьшение тяжести и/или продолжительности нарушения, ингибирование ухудшения симптомов, характерных для нарушения, которое лечат, ограничение или предупреждение рецидива нарушения у субъектов, которые ранее имели нарушение, или ограничение, или предупреждение рецидива симптомов у субъектов, которые ранее имели симптомы нарушения.

Термин "**опухолевая клетка**" или "**раковая клетка**" относится к раковой, предраковой или трансформированной клетке *in vivo*, *ex vivo* или в культуре ткани, которая имеет спонтанные или индуцированные фенотипические изменения. Эти изменения не обязательно связаны с поглощением нового генетического материала. Хотя трансформация может произойти в результате инфекции трансформирующим вирусом и включения новой геномной нуклеиновой кислоты, поглощения экзогенной нуклеиновой кислоты, она также может произойти спонтанно или после воздействия канцерогена, в результате чего мутирует эндогенный ген. Трансформация/рак проявляется морфологическими изменениями, иммортализацией клеток, аберрантным контролем роста, образованием очагов, пролиферацией, злокачественностью, модуляцией уровней опухолеспецифических маркеров, инвазивностью, ростом опухоли у подходящих животных-хозяев, таких как бестимусные мыши, и т. п., *in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*.

Термины "**вариант**", "**мутант**" или "**измененный**" относятся к полипептиду или полинуклеотиду, который отличается от эталонного полипептида или эталонного полинуклеотида одной или несколькими модификациями, например одной или несколькими заменами, вставками или делециями.

Нумерация аминокислотных остатков в константной области антитела по всему настоящему описанию соответствует индексу EC, как описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), если явно не указано иное.

Мутации в константных областях Ig обозначаются следующим образом: L351Y_F405A_Y407V относится к мутациям L351Y, F405A и Y407V в одной константной области иммуноглобулина. L351Y_F405A_Y407V/T394W относится к мутациям L351Y, F405A и Y407V в первой константной области Ig и мутации T394W во второй константной области Ig, которые присутствуют в одном мультимерном белке.

КОМПОЗИЦИИ ВЕЩЕСТВ

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33

Настоящее изобретение относится к антигенсвязывающим доменам, которые связывают CD33, моноспецифическим и мультиспецифическим белкам, включающим антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, химерным антигенным рецепторам (CAR), включающим антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, полинуклеотидам, кодирующим приведенные выше, векторам, клеткам-хозяевам и способам получения и применения приведенного выше.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, идентифицированные в данном документе, продемонстрировали улучшенные свойства в отношении улучшенной термостабильности.

Настоящее изобретение относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27.

Способы и методики идентификации CDR (например, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3) известны в уровне техники и могут быть применены для идентификации CDR в любой из вариабельных областей тяжелой цепи и/или любой из вариабельных областей легкой цепи, раскрытых в данном документе. Правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают без ограничения определение по Kabat, определение по Chothia, определение по AbM, определение по IMGT и определение по Contact. Без ограничения конкретной теорией считается, что определение по Kabat основано на вариабельности последовательности, определение по Chothia основано на расположении областей структурных петель, а определение по AbM является компромиссом между подходами Chothia и Kabat.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26 или 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, при этом выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно; SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

Иллюстративные последовательности HCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно; или
j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно;
k) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;
l) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или
m) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В определенных вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258 и 361 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему домену, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

Иллюстративные последовательности HCDR и LCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему домену, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно;

m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет

собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105; b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106; c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107; d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185; e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188; f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192; g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196; h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В

некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO:

95 и VL под SEQ ID NO: 105; VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106; VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107; VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185; VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188; VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192; VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196; VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к выделенному белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает поверхностный антиген миелоидных клеток CD33, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105; VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106; VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107; VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185; VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188; VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192; VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196; VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $(scFv)_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fv. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой $F(ab')_2$. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает

CD33, представляет собой Fd. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой dAb. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен для CD33 представляет собой VHH.

Связывающие CD33 scFv

Любой из идентифицированных в данном документе доменов VH и VL, которые связывают CD33, может быть сконструирован в формате scFv в ориентации либо VH-линкер-VL, либо VL-линкер-VH. Любой из идентифицированных в данном документе доменов VH и VL также может быть использован для создания структур $sc(Fv)_2$, таких как VH-линкер-VL-линкер-VL-линкер-VH, VH-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VL, VH-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VL, VL-линкер-VH-линкер-VH-линкер-VL, VL-линкер-VH-линкер-VL-линкер-VH или VL-линкер-VL-линкер-VH-линкер-VH.

Домены VH и VL, идентифицированные в данном документе, могут быть включены в формат scFv, а связывание и термостабильность полученного scFv с CD33 могут быть оценены с применением известных способов. Связывание может быть оценено с использованием приборов ProteOn XPR36, Biacore 3000 или KinExA, ELISA или конкурентных анализов связывания, известных специалистам в данной области. Связывание может быть оценено с использованием очищенных scFv, или надосадочных жидкостей E. coli, или лизированных клеток, содержащих экспрессированный scFv. Измеренная аффинность тестируемого scFv по отношению к CD33 может варьировать при измерении в различных условиях (например, осмолярность, pH). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания (например, K_D, K_{on}, K_{off}) обычно проводят при стандартных условиях и в стандартных буферах. Термостабильность может быть оценена путем нагревания тестируемого scFv при повышенных температурах, например при 50°C, 55°C или 60°C, в течение определенного периода времени, например 5 минут (мин), 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин или 30 мин, и измерения связывания тестируемого scFv с CD33. ScFv, сохраняющие сравнимое связывание с CD33 по сравнению с ненагретым образцом scFv, называют термостабильными.

В рекомбинантных системах экспрессии линкер представляет собой пептидный линкер и может включать любую встречающуюся в природе аминокислоту. Иллюстративными аминокислотами, которые могут быть включены в линкер, являются Gly, Ser Pro, Thr, Glu, Lys, Arg, Ile, Leu, His и The. Линкер должен иметь

длину, достаточную для соединения VH и VL таким образом, чтобы они образовывали правильную конформацию относительно друг друга, чтобы они сохраняли необходимую активность, как, например, связывание с CD33.

Линкер может иметь длину приблизительно 5-50 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину приблизительно 10-40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину приблизительно 10-35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину приблизительно 10-30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину приблизительно 10-25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину приблизительно 10-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину приблизительно 15-20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 6 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 7 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 8 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 9 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 11 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 12 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 13 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 14 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 16 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 17 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 18 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 19 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 20 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 21 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 22 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 23 аминокислоты В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 24 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 25 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 26 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 27 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 28 аминокислот. В некоторых вариантах

осуществления линкер имеет длину 29 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 30 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 31 аминокислоту. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 32 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 33 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 34 аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 36 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 37 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 38 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 39 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 40 аминокислот. Иллюстративными линкерами, которые могут быть использованы, являются богатые Gly линкеры, содержащие Gly и Ser линкеры, содержащие Gly и Ala линкеры, содержащие Ala и Ser линкеры и другие гибкие линкеры.

Другие линкерные последовательности могут включать части шарнирной области иммуноглобулина, CL или CH1, полученные из любого изотипа тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина. В качестве альтернативы, в качестве линкеров могут найти применение различные небелковые полимеры, включая полиэтиленгликоль (PEG), полипропиленгликоль, полиоксиалкилены или сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Примерные линкеры, которые могут быть использованы, показаны в таблице 1. Дополнительные линкеры описаны, например, в международной патентной публикации № WO2019/060695, которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 109.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 112.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 117.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 119.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 121.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 124.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 126.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 128.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 129.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 140.

Таблица 1.

Название линкера	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Линкер 1	GGSEGKSSGSGSESKSTGGS	108
Линкер 2	GGGSGGGS	109
Линкер 3	GGGSGGGSGGGS	110
Линкер 4	GGGSGGGSGGGSGGGS	111

Название линкера	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Линкер 5	GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS	112
Линкер 6	GGGGSGGGGSGGGGS	113
Линкер 7	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	114
Линкер 8	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	115
Линкер 9	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	116
Линкер 10	IRPRAIGGSKPRVA	117
Линкер 11	GKGGSGKGGSGKGGS	118
Линкер 12	GGKGSGGKGSGGKGS	119
Линкер 13	GGGKSGGGKSGGGKS	120
Линкер 14	GKGKSGKGKSGKGKS	121
Линкер 15	GGGKSGGKGSGKGGS	122
Линкер 16	GKPGSGKPGSGKPGS	123
Линкер 17	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	124
Линкер 18	GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	125
Линкер 19	STAGDTHLGGEDFD	126
Линкер 20	GEGGSGEGGSGEGGS	127
Линкер 21	GGEGSGGEGSGGEGS	128
Линкер 22	GEGESGEGESGEGES	129
Линкер 23	GGGESGGEGSGEGGS	130
Линкер 24	GEGESGEGESGEGESGEGES	131
Линкер 25	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	132
Линкер 26	PRGASKSGSASQTGSAPGS	133
Линкер 27	GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	134
Линкер 28	GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	135
Линкер 29	GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS	136
Линкер 30	GSGS	137
Линкер 31	APAPAPAPAP	138
Линкер 32	APAPAPAPAPAPAPAPAPAP	139
Линкер 33	AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA	140

В определенных вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108 (например, состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно; SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

Иллюстративные последовательности HCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления scFv содержит VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84,

85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или

m) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258, и 261 соответственно. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84; HCDR1, HCDR2 и

HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

Иллюстративные последовательности HCDR и LCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно;

m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно.

В других вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В определенных таких вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность на основе аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH под SEQ ID NO: 53, первый линкер (L1) под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID: 82 (VH-L1-VL). В других вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL под SEQ ID NO: 82, первый линкер под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID NO: 53 (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. В определенных таких вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность на основе аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH под SEQ ID NO: 56, первый линкер (L1) под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID: 85 (VH-L1-VL). В других вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL под SEQ ID NO: 56, первый линкер под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID NO: 85 (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. В определенных таких вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность на основе аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH под SEQ ID NO: 59, первый линкер (L1) под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID: 87 (VH-L1-VL). В других вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL под SEQ ID NO: 59, первый линкер под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID NO: 87 (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. В определенных таких вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность на основе аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH под SEQ ID NO: 262, первый линкер (L1) под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID: 271 (VH-L1-VL). В других вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL под SEQ ID NO: 271, первый линкер под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID NO: 262 (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. В определенных таких вариантах осуществления scFv

содержит линкерную последовательность на основе аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH под SEQ ID NO: 263, первый линкер (L1) под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID: 272 (VH-L1-VL). В других вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL под SEQ ID NO: 272, первый линкер под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID NO: 263 (VL-L1-VH).

В других вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273. В определенных таких вариантах осуществления scFv содержит линкерную последовательность на основе аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH под SEQ ID NO: 264, первый линкер (L1) под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID: 273 (VH-L1-VL). В других вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VL под SEQ ID NO: 273, первый линкер под SEQ ID NO: 108 и VL под SEQ ID NO: 264 (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под

SEQ ID NO: 106; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105; VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106; VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107; VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185; VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188; VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192; VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196; VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 208.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 214.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 218.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В определенных вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В других вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

Другие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33

Любой из идентифицированных в данном документе доменов VH и VL, которые связывают CD33, также могут быть сконструированы в формате Fab, $F(ab')_2$, Fd или Fv, и их связывание с CD33 и термостабильность можно оценивать с использованием анализов, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления домены VH и VL, идентифицированные в данном документе, сконструированы в Fab.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий

домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно; SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

Иллюстративные последовательности HCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264. В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273. В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88, 271, 272 или 273.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно; или
j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно; или
l) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;
m) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно;
n) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и

HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

Иллюстративные последовательности HCDR и LCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В определенных вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или

m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления Fab содержит VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105; VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106; VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107; VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185; VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188; VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192; VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196; VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В других вариантах осуществления домены VH и VL, идентифицированные в данном документе, сконструированы в $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно; SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264. В некоторых вариантах

осуществления $F(ab')_2$ содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273. В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно;

m) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88 HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID

NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или

m) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 196 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202. В некоторых вариантах осуществления $F(ab')_2$ содержит VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105; VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106; VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107; VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185; VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188; VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192; VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196; VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В определенных вариантах осуществления домены VH и VL, идентифицированные в данном документе, сконструированы в Fv.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит определяющую комплементарность область тяжелой цепи (HCDR) 1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно; SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264. В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273. В некоторых вариантах осуществления Fv содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272, 273.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно;

m) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fv содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

В определенных вариантах осуществления домены VH и VL, идентифицированные в данном документе, сконструированы в Fd.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно; SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно; SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

k) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

l) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

m) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно;

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно;

k) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

l) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно;

m) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263

и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52;

b) VH под SEQ ID NO: 53;

c) VH под SEQ ID NO: 54;

d) VH под SEQ ID NO: 55;

e) VH под SEQ ID NO: 56;

f) VH под SEQ ID NO: 57;

g) VH под SEQ ID NO: 58;

h) VH под SEQ ID NO: 59;

i) VH под SEQ ID NO: 60;

j) VH под SEQ ID NO: 61;

k) VH под SEQ ID NO: 262;

l) VH под SEQ ID NO: 263; или

m) VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175; HCDR1, HCDR2

и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления Fd содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно; HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

Гомологичные антигенсвязывающие домены и антигенсвязывающие домены с консервативными заменами

Варианты антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD33, попадают в объем настоящего изобретения. Например, варианты могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 29 аминокислотных замен в антигенсвязывающем домене, связывающем CD33, при условии, что они сохраняют или улучшают функциональные свойства по сравнению с исходными антигенсвязывающими доменами. Например, в некоторых вариантах осуществления вариант антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, характеризуется улучшенной термостабильностью по сравнению с исходным антигенсвязывающим доменом в одном и том же анализе. В некоторых вариантах осуществления вариант антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, характеризуется пониженной вероятностью посттрансляционной модификации по сравнению с исходным связывающим доменом. Снижение вероятности посттрансляционной модификации может возникнуть из-за замены мотива, такого как NG, DG или DP. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности может составлять приблизительно 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к антигенсвязывающим доменам, которые связывают CD33, по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вариация находится в каркасных областях. В некоторых вариантах осуществления варианты образуются за счет консервативных замен.

Например, антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, могут содержать замены в положениях остатков P41, I49, M70 и A88 в VH (нумерация остатков согласно hu11B6_VH под SEQ ID NO: 5) и S80, L82, A88 и Y91 в VL (нумерация остатков согласно hu11B6_VL под SEQ ID NO: 2). Консервативные замены могут быть осуществлены в любых указанных положениях, и полученные варианты антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD33, тестируют в отношении необходимых характеристик в анализах, описанных в данном документе.

Также представлены антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, содержащие VH, которые на по меньшей мере 80% идентичны

VH под SEQ ID NO: 18;
VH под SEQ ID NO: 19;
VH под SEQ ID NO: 20;
VH под SEQ ID NO: 21;
VH под SEQ ID NO: 22;
VH под SEQ ID NO: 23;
VH под SEQ ID NO: 24;
VH под SEQ ID NO: 25;
VH под SEQ ID NO: 26;
VH под SEQ ID NO: 27;
VH под SEQ ID NO: 52;
VH под SEQ ID NO: 53;
VH под SEQ ID NO: 54;
VH под SEQ ID NO: 55;
VH под SEQ ID NO: 56;
VH под SEQ ID NO: 57;
VH под SEQ ID NO: 58;
VH под SEQ ID NO: 59;
VH под SEQ ID NO: 60;
VH под SEQ ID NO: 61;
VH под SEQ ID NO: 95;
VH под SEQ ID NO: 96;
VH под SEQ ID NO: 97;
VH под SEQ ID NO: 170;
VH под SEQ ID NO: 171;

VH под SEQ ID NO: 175;

VH под SEQ ID NO: 179;

VH под SEQ ID NO: 181;

VH под SEQ ID NO: 96;

VH под SEQ ID NO: 262;

VH под SEQ ID NO: 263; или

VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей

мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 85%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 90%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 92%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 93%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 95%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 96%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 97%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 98%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 99%.

Также представлены антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, содержащие VH и VL, которые на по меньшей мере 80% идентичны

VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;
VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200;
VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202;
VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или
VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH и VL, которые на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичны VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VL под SEQ ID NO: 82. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 82 и VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL, которая на по

меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VL под SEQ ID NO: 85. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 85 и VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VL под SEQ ID NO: 87. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 87 и VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VL под SEQ ID NO: 271. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 271 и VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VL под SEQ ID NO: 272. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 272 и VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по

меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VL под SEQ ID NO: 273. Например, антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 273 и VH, которая на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична VH под SEQ ID NO: 264.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что положения в доменах VH и/или VL могут быть подвергнуты мутации для удаления мотивов, которые подвержены посттрансляционной модификации. Посттрансляционная модификация может повышать вероятность, например, дезамидирования, изомеризации и/или фрагментации антигенсвязывающего домена, который связывается с CD33. Эти мутации могут также повышать термостабильность антигенсвязывающего домена, который связывается с CD33.

Примерами мотивов последовательности, которые подвержены посттрансляционной модификации являются, например, NG, DG и DP.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит домен VH и/или VL, содержащий одну или две аминокислотные замены в одном или нескольких мотивах NG. В некоторых вариантах осуществления заменяют остаток N в мотиве NG. В других вариантах осуществления заменяют остаток G в мотиве NG. В некоторых вариантах осуществления заменяют остатки N и G в мотиве NG. В определенных таких вариантах осуществления одна или две аминокислотные замены в одном или нескольких мотивах NG являются единственными заменами в домене VH и/или VL.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит домен VH и/или VL, содержащий одну или две аминокислотные замены в одном или нескольких мотивах DG. В некоторых вариантах осуществления заменяют остаток D в мотиве DG. В других вариантах осуществления заменяют остаток G в мотиве DG. В некоторых вариантах осуществления заменяют остатки D и G в мотиве DG. В определенных таких вариантах осуществления одна или две аминокислотные замены в одном или нескольких мотивах DG являются единственными заменами в домене VH и/или VL.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит домен VH и/или VL, содержащий одну или две аминокислотные замены в одном или нескольких мотивах DP. В некоторых вариантах осуществления заменяют остаток D в мотиве DP. В других вариантах осуществления заменяют остаток P в мотиве DP. В некоторых вариантах осуществления заменяют остатки D и P в мотиве DP. В определенных таких вариантах осуществления одна или две аминокислотные замены в одном или нескольких мотивах DP являются единственными заменами в домене VH и/или VL.

Иллюстративный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, по настоящему изобретению представляет собой белок (например, scFv), содержащий VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что подвергание мутации мотива DG в VH под SEQ ID NO: 262 может снизить вероятность посттрансляционной модификации, сохраняя при этом свойства связывания CD33. Эти мутации также могут повышать термостабильность.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, имеющий VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271, может быть подвергнут мутации с удалением мотива DG. VH под SEQ ID NO: 262 имеет мотив DG в положениях 54-55 (с использованием нумерации остатков согласно индексу EU).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 262, в которой остаток D в положении 54 замещен (например, D54G, D54A, D54Y, D54P, D54N, D54S, D54R, D54L, D54V, D54T, D54F или D54W). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 262, в которой остаток G в положении 55 замещен (например, G55V, G55P, G55R, G55A, G55L, G55Q, G55T или G55H). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 262, в которой остаток D в положении 54 (например, D54G, D54A, D54Y, D54P, D54N, D54S, D54R, D54L, D54V, D54T, D54F или D54W) замещен, и остаток G в положении 55 замещен (например, G55V, G55P, G55R, G55A, G55L, G55Q, G55T или G55H). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309 или 310.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 291 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 292 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 293 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 294 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 295 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 296 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 297 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 298 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 299 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 300 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 301 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 302 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 303 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 304 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 305 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 306 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 307 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 308 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 309 и VL под SEQ ID NO: 271; или

VH под SEQ ID NO: 310 и VL под SEQ ID NO: 271.

Другой иллюстративный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, по настоящему изобретению представляет собой белок (например, scFv), содержащий VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что подвергание мутации одного или нескольких мотивов NG в VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272 может снизить вероятность посттрансляционной модификации, сохраняя при этом свойства связывания CD33. Эти мутации также могут повышать термостабильность.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, имеющий VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272, может быть подвергнут мутации с удалением мотива NG. VH под SEQ ID NO: 263 имеет мотив NG в положениях 99-100 (с использованием нумерации остатков согласно индексу EU), а VL под SEQ ID NO:

272 имеет мотив NG в положениях 97-98 (с использованием нумерации остатков согласно индексу EU).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 263, в которой остаток N в положении 99 замещен (например, N99V, N99S, N99E, N99H, N99A, N99G, N99K, N99T, N99F, N99V, N99R, N99L, N99H или N99I). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 263, в которой остаток G в положении 100 замещен (например, G100S, G100A). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 263, в которой остаток N в положении 99 замещен (например, N99V, N99S, N99E, N99H, N99A, N99G, N99K, N99T, N99F, N99V, N99R, N99L, N99H или N99I) и остаток G в положении 100 замещен (например, G100S, G100A). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351 или 352.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 272, в которой остаток N в положении 97 замещен (например, N97V, N97R, N97P, N97T, N97G, N97Q, N97S, N97A, N97L, N97Y, N97E, N97F, N97D, N97I или N97H). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 272, в которой остаток G в положении 98 замещен (например, G98V, G98P, G98R, G98D, G98E, G98W, G98Y, G98A, G98N, G98K, G98L). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 272, в которой остаток N в положении 97 замещен и остаток G в положении 98 замещен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335 или 336.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 311;

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 312;

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 313;

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 314;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 315;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 316;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 317;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 318;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 319;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 320;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 321;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 322;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 323;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 324;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 325;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 326;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 327;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 328;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 329;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 330;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 331;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 332;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 333;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 334;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 335;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 336;
VH под SEQ ID NO: 337 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 338 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 339 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 340 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 341 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 342 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 343 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 344 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 345 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 346 и VL под SEQ ID NO: 272;
VH под SEQ ID NO: 347 и VL под SEQ ID NO: 272;

VH под SEQ ID NO: 348 и VL под SEQ ID NO: 272;

VH под SEQ ID NO: 349 и VL под SEQ ID NO: 272;

VH под SEQ ID NO: 350 и VL под SEQ ID NO: 272;

VH под SEQ ID NO: 351 и VL под SEQ ID NO: 272; или

VH под SEQ ID NO: 352 и VL под SEQ ID NO: 272.

Другой иллюстративный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, по настоящему изобретению представляет собой белок (например, scFv), содержащий VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что подвергание мутации одного или нескольких мотивов NG в VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85 может снизить вероятность посттрансляционной модификации, сохраняя при этом свойства связывания CD33. Эти мутации также могут повышать термостабильность.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, имеющий VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85, может быть подвергнут мутации с удалением мотива NG. VH под SEQ ID NO: 56 имеет мотив NG в положениях 99-100 (с использованием нумерации остатков согласно индексу EU), а VL под SEQ ID NO: 85 имеет мотив NG в положениях 97-98 (с использованием нумерации остатков согласно индексу EU).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 56, в которой остаток N в положении 99 замещен (например, N99R, N99P, N99G, N99V, N99L, N99D, N99E, N99A, N99Q или N99T). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 56, в которой остаток G в положении 100 замещен (например, G100S, G100A, G100L, G100P, G100T или G100Q). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 56, в которой остаток N в положении 99 замещен (например, N99R, N99P, N99G, N99V, N99L, N99D, N99E, N99A, N99Q или N99T) и остаток G в положении 100 замещен (например, G100S, G100A, G100L, G100P, G100T или G100Q). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VH под SEQ ID NO: 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381 или 382.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 85, в которой

остаток N в положении 97 замещен (например, N97G, N97D, N97P, N97K, N97E, N97A, N97R, N97Q, N97I, N97V, N97H, N97K, N97W или N97S). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 85, в которой остаток G в положении 98 замещен. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 85, в которой остаток N в положении 97 замещен (например, N97G, N97D, N97P, N97K, N97E, N97A, N97R, N97Q, N97I, N97V, N97H, N97K, N97W или N97S) и остаток G в положении 98 замещен. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365 или 366.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит

VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 353;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 354;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 355;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 356;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 357;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 358;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 359;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 360;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 361;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 362;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 363;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 364;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 365;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 366;
VH под SEQ ID NO: 367 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 368 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 369 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 370 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 371 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 372 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 373 и VL под SEQ ID NO: 85;

VH под SEQ ID NO: 374 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 375 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 376 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 377 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 378 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 379 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 380 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 381 и VL под SEQ ID NO: 85; или
VH под SEQ ID NO: 382 и VL под SEQ ID NO: 85.

Другой иллюстративный антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, по настоящему изобретению представляет собой белок (например, scFv), содержащий VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что подвергание мутации мотива NG в VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82 может снизить вероятность посттрансляционной модификации, сохраняя при этом свойства связывания CD33. Эти мутации также могут повышать термостабильность.

Антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33, имеющий VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82, может быть подвергнут мутации до мотива NG. VL под SEQ ID NO: 82 имеет мотив NG в положениях 97-98 (с использованием нумерации остатков согласно индексу EU).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 82, в которой остаток N в положении 97 замещен (например, N97S, N97Q, N97V, N97G, N97W, N97T, N97I, N97E, N97A, N97R или N97L). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 272, в которой остаток G в положении 98 замещен (например, G98V, G98A, G98P, G98L или G98T). В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 82, в которой остаток N в положении 97 замещен (например, N97S, N97Q, N97V, N97G, N97W, N97T, N97I, N97E, N97A, N97R или N97L) и остаток G в положении 98 замещен (например, G98V, G98A, G98P, G98L или G98T). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит VL под SEQ ID NO: 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит

VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 383;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 384;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 385;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 386;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 387;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 388;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 389;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 390;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 391;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 392;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 393;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 394;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 395;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 396;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 397; или
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 398.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит домен VH под SEQ ID NO: 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит домен VL под SEQ ID NO: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывается с CD33 (например, scFv), содержит домен VH под SEQ ID NO: 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382 и домен VL под SEQ ID NO: 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325,

326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 85%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 90%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 91%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 92%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 93%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 94%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 95%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 96%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 97%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 98%. В некоторых вариантах осуществления идентичность составляет 99%.

Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, разделяемых последовательностями (т. е. % идентичности = число идентичных положений/общее число положений ×100), с учетом количества числа гэпов и длины каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1988)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину гэпа 12 и штрафа за гэп 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступном на www_gcg_com), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, веса гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления вариантные антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, содержат одну или две консервативные замены в любой из областей CDR при сохранении необходимых функциональных свойств исходных антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD33.

Термин "консервативные модификации" относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают существенного влияния или не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотные модификации. Консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления и делеции. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислоту заменяют остатком аминокислоты с аналогичной боковой цепью. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, хорошо определены и включают аминокислоты с кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин, триптофан), ароматическими боковыми цепями (например, фенилаланин, триптофан, гистидин, тирозин), алифатическими боковыми цепями (например, глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), амидом (например, аспарагин, глутамин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и серосодержащими боковыми цепями (цистеин, метионин). Кроме того, любой нативный остаток в полипептиде может быть также заменен аланином, как было описано ранее для аланин-сканирующего мутагенеза (MacLennan *et al.*, (1988) *Acta Physiol Scand Suppl* 643:55-67; Sasaki *et al.*, (1988) *Adv Biophys* 35:1-24). Аминокислотные замены в антителах по настоящему изобретению могут быть сделаны известными способами, например путем мутагенеза ПЦР (патент США № 4683195). В качестве альтернативы, библиотеки вариантов могут быть созданы, например, с использованием случайных (NNK) или неслучайных кодонов, например, кодонов DVK, которые кодируют 11 аминокислот (Ala, Cys, Asp, Glu, Gly, Lys, Asn, Arg, Ser, Tyr, Trp). Полученные варианты могут быть тестированы по их характеристикам с использованием анализов, описанных в данном документе.

Способы создания антигенсвязывающего фрагмента, который связывает CD33

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, представленные в настоящем изобретении, могут быть созданы с использованием различных технологий. Например, гибридомный способ Келера и Мильштейна можно применять для идентификации пар VH/VL, которые связывают CD33. В гибридомном способе мышь или другого животного-хозяина, такого как хомяк, крыса или курица, иммунизируют антигенами CD33 человека и/или яванского макака с последующим слиянием клеток

селезенки от иммунизированных животных с клетками миеломы с применением стандартных способов для образования гибридомных клеток. Колонии, образующиеся из одиночных иммортализованных гибридомных клеток, можно подвергать скринингу в отношении продуцирования антител, содержащих антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, с требуемыми свойствами, такими как специфичность связывания, перекрестная реактивность или ее отсутствие, аффинность в отношении антигена и любая требуемая функциональность.

Антигенсвязывающие домены, связывающие CD33, полученные путем иммунизации отличных от человека животных, могут быть гуманизированы. Иллюстративные методики гуманизации, в том числе отбор человеческих акцепторных каркасных последовательностей, включают прививку CDR (патент США № 5225539), прививку SDR (патент США № 6818749), изменение поверхности (Padlan, (1991) *Mol Immunol* 28:489-499), изменение поверхности остатков, определяющих специфичность (публикация заявки на патент США № 2010/0261620), адаптацию человеческой каркасной последовательности (патент США № 8748356) или супергуманизацию (патент США № 7709226). В данных способах CDR или подгруппу остатков CDR исходных антител переносят на человеческие каркасные последовательности, которые могут быть выбраны на основании их общей гомологии по отношению к исходным каркасным последовательностям, на основании схожести длины CDR или идентичности канонической структуры или их комбинации.

Гуманизированные антигенсвязывающие домены могут быть дополнительно оптимизированы для улучшения их селективности или аффинности в отношении требуемого антигена посредством включения измененных поддерживающих каркасную последовательность остатков для сохранения аффинности связывания (возвратных мутаций) посредством методик, как, например, таковые, описанные в публикациях международных заявок на патент №№ WO 1990/007861 и WO 1992/22653, или посредством введения вариации на уровне любой из CDR, например, для улучшения аффинности антигенсвязывающего домена.

Трансгенных животных, таких как мыши, крыса или курица, несущих локусы человеческого иммуноглобулина (Ig) в своем геноме, можно использовать для получения антигенсвязывающих фрагментов, которые связывают CD33, и описаны, например, в патенте США № 6150584, публикации международной заявки на патент № WO 1999/45962, публикациях международных заявок на патент №№ WO 2002/066630, WO 2002/43478, WO 2002/043478 и WO 1990/04036.

Эндогенные локусы иммуноглобулина у таких животных могут быть разрушены или удалены, и по меньшей мере один полный или частичный локус человеческого иммуноглобулина может быть вставлен в геном животного с применением гомологичной или негомологичной рекомбинации с применением трансхромосом или с применением минигенов. Компании, такие как Regeneron (www_regeneron_com), Harbour Antibodies (www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (www_omtinc_net), KyMab (www_kymab_com), Trianni (www.trianni_com) and Ablexis (www_ablexis_com), могут быть задействованы для обеспечения человеческих антител, направленных против выбранного антигена, с применением технологий, описанных выше.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, могут быть выбраны из библиотеки фагового дисплея, где фаг сконструирован для экспрессии человеческих иммуноглобулинов или их частей, таких как Fab, одноцепочечные антитела (scFv) или неспаренные или спаренные вариабельные области антитела. Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, могут быть выделены, например, из библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела в виде белков, слитых с белком оболочки бактериофага pIX, как описано в Shi *et al.,* (2010) *J Mol Biol* 397:385-96 и публикации международной заявки на патент № WO 09/085462). Библиотеки могут быть подвергнуты скринингу в отношении связывания фага с CD33 человека и/или макака-крабоеда, и полученные положительные клоны могут быть дополнительно охарактеризованы, Fab выделены из лизатов клона и преобразованы в scFv или другие конфигурации антигенсвязывающих фрагментов.

Подготовку иммуногенных антигенов, и экспрессию, и получение антигенсвязывающих доменов по настоящему изобретению можно осуществлять с применением любой подходящей методики, такой как получение рекомбинантного белка. Иммуногенные антигены можно вводить животному в форме очищенного белка или белковых смесей, включающих цельные клетки или экстракты клеток или тканей, или антиген может образовываться в организме животного *de novo* из нуклеиновых кислот, кодирующих указанный антиген или его часть.

Конъюгирование с удлиняющими период полужизни фрагментами

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с удлиняющим период полужизни фрагментом. Иллюстративными удлиняющими период полужизни фрагментами

являются альбумин, варианты альбумина, альбуминсвязывающие белки и/или домены, трансферрин и его фрагменты и аналоги, иммуноглобулины (Ig) или их фрагменты, такие как Fc-области. Известны аминокислотные последовательности упомянутых выше удлиняющих период полужизни фрагментов. Ig или его фрагменты включают все изотипы, т. е., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA и IgE.

Дополнительные удлиняющие период полужизни фрагменты, которые могут быть конъюгированы с антигенсвязывающими доменами, которые связывают CD33, по настоящему изобретению, включают молекулы полиэтиленгликоля (PEG), такие как PEG5000 или PEG20000, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, миристат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандикарбоновую кислоту, тетрадекандикарбоновую кислоту, октадекандикарбоновую кислоту, докозандикарбоновую кислоту и т. п., полилизин, октан, углеводы (декстран, целлюлозу, олиго- или полисахариды) для придания необходимых свойств. Эти молекулы могут быть прямым слиянием с антигенсвязывающими доменами, которые связывают CD33, по настоящему изобретению, и могут быть получены с помощью стандартных методик клонирования и экспрессии. В качестве альтернативы, хорошо известные способы химического соединения могут быть использованы для присоединения фрагментов к рекомбинантно полученным антигенсвязывающим доменам, которые связывают CD33, по настоящему изобретению.

Пегильный фрагмент может быть, например, конъюгирован с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, по настоящему изобретению путем включения цистеинового остатка к С-концу антигенсвязывающего домена, который связывает CD33 по настоящему изобретению или встраивания путем генной инженерии цистеинов в положения остатков, которые обращены в сторону от сайта связывания CD33, и присоединения пегильной группы к цистеину с помощью хорошо известных способов.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, конъюгирован с удлиняющим период полужизни фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбуминсвязывающий домен или полиэтиленгликоль. В некоторых вариантах

осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой константную область Ig.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой Ig.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой фрагмент Ig.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой константную область Ig.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой фрагмент константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой альбумин.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой альбуминсвязывающий домен.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой трансферрин.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой полиэтиленгликоль.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, конъюгированные с удлиняющим период полужизни фрагментом, могут быть оценены по их фармакокинетическим свойствам с использованием известных моделей *in vivo*.

Конъюгирование константных областей иммуноглобулина (Ig) или фрагментов константных областей Ig

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig для придания антителоподобных свойств, включая Fc-эффекторные функции связывания C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), связывание Fc рецептора, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора B-клеток; BCR). Константная область Ig или фрагмент константной области Ig также функционирует как удлиняющий период полужизни фрагмент, как описано в настоящем документе. Антигенсвязывающие

домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению могут быть сконструированы в обычные полноразмерные антитела с использованием стандартных способов. Полноразмерные антитела, включающие антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, могут быть далее сконструированы, как описано в данном документе.

Константная область тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из субдоменов CH1, шарнира, CH2 и CH3. Домен CH1 охватывает остатки A118-V215, домен CH2 охватывает остатки A231-K340, а домен CH3 охватывает остатки G341-K447 на тяжелой цепи, нумерация остатков соответствует индексу EC. В некоторых случаях G341 упомянут как остаток домена CH2. Термин "шарнир" обычно определяют как включающий E216 и заканчивающийся на P230 человеческого IgG1. Fc-область Ig содержит по меньшей мере домены CH2 и CH3 константной области Ig и, следовательно, содержит по меньшей мере область от приблизительно A231 до K447 константной области тяжелой цепи Ig.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD33, конъюгированному с константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом константной области Ig. В определенных таких вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig получены из IgG1.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область тяжелой цепи. В определенных таких вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область тяжелой цепи IgG1.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig представляет собой константную область легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит Fc-область. В определенных таких вариантах осуществления константная область Ig содержит Fc-область IgG1. В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2. В определенных таких вариантах осуществления константная область Ig содержит домен CH2 IgG1.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH3. В определенных таких вариантах осуществления константная область Ig содержит домен CH3 IgG1.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3. В определенных таких вариантах осуществления константная область Ig содержит домен CH2 и CH3 IgG1.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3. В определенных таких вариантах осуществления по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3 из IgG1. Часть шарнира относится к одному или нескольким аминокислотным остаткам шарнира Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3. В определенном таком варианте осуществления содержатся шарнир, домен CH2 и домен CH3 из IgG1.

В определенных вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 278.

Остаток цистеина в положении 220 тяжелой цепи может быть подвергнут мутации для предупреждения образования цистеинового мостика между константной областью и легкой цепью. Таким образом, в определенных вариантах осуществления константная область Ig содержит остаток, который не является цистеином в положении 220. В одном варианте осуществления константная область Ig содержит серин в положении 220.

В определенных вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 279.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2).

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению, конъюгированные с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, можно оценивать по их функциональности с использованием нескольких известных анализов. Связывание с CD33 можно оценивать с использованием способов, описанных в данном документе. Измененные свойства, обеспечиваемые константным доменом Ig или фрагментом константной области Ig, такими как Fc-область, могут быть оценены в анализах связывания с Fc-рецептором с использованием растворимых форм рецепторов, таких как рецепторы FcγRI, FcγRII, FcγRIII или FcRn, или с использованием клеточных анализов, измеряющих, например, ADCC, CDC или ADCP.

ADCC может быть оценена с помощью анализа *in vitro* с использованием экспрессирующих CD33 клеток в качестве клеток-мишеней и NK-клеток в качестве эффекторных клеток. Цитолиз может быть выявлен по высвобождению метки (например, радиоактивных субстратов, флуоресцентных красителей или природных внутриклеточных белков) из лизированных клеток. В иллюстративном анализе используют клетки-мишени в соотношении 1 клетка-мишень на 4 эффекторные клетки. Клетки-мишени предварительно метят BATDA и объединяют с эффекторными клетками и тестируемым антителом. Образцы инкубируют в течение 2 часов и измеряют лизис клеток путем измерения высвобожденного BATDA в надосадочной жидкости. Данные нормализовали по максимальной цитотоксичности с 0,67% Triton X-100 (Sigma Aldrich) и минимальному контролю, определяемому по спонтанному высвобождению BATDA из клеток-мишеней в отсутствие любого антитела.

ADCP можно оценить с использованием моноцитарных макрофагов в качестве эффекторных клеток и любых экспрессирующих CD33 клеток в качестве клеток-мишеней, которые сконструированы для экспрессии GFP или другой меченой молекулы. В иллюстративном анализе соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней может составлять, например, 4:1. Эффекторные клетки можно инкубировать с клетками-мишенями в течение 4 часов с антителом по настоящему изобретению или без него. После инкубации клетки могут быть отделены с использованием аккутазы. Макрофаги могут быть идентифицированы с помощью антител к CD11b и к CD14, соединенных с флуоресцентной меткой, и процент фагоцитоза может быть определен на основании % флуоресценции GFP в $CD11^{+}CD14^{+}$ макрофагах с использованием стандартных способов.

CDC клеток можно измерить, например, путем посева клеток Daudi в количестве 1×10^5 клеток/лунка (50 мкл/лунка) в RPMI-B (RPMI, дополненная 1% BSA), добавления в лунки 50 мкл тестируемого белка при конечной концентрации от 0 до 100 мкг/мл, инкубации реакционной смеси в течение 15 мин при комнатной температуре, добавления в лунки 11 мкл объединенной сыворотки крови человека и инкубирования реакционной смеси в течение 45 мин при 37°C. Процентная доля (%) лизированных клеток может быть определена как % окрашенных пропидия йодидом клеток в FACS-анализе с использованием стандартных способов.

Включающие антигенсвязывающие домены белки, которые связывают CD33 по настоящему изобретению

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению могут быть сконструированы в моноспецифические или мультиспецифические белки различных конструкций с использованием стандартных способов.

Настоящее изобретение также относится к моноспецифическому белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления моноспецифический белок представляет собой антитело.

Настоящее изобретение также относится к мультиспецифическому белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является биспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является триспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является тетраспецифическим.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является моновалентным при связывании с CD33.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок является бивалентным при связывании с CD33.

Настоящее изобретение также относится к выделенному мультиспецифическому белку, содержащему первый антигенсвязывающий домен,

который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита.

В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой антиген Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антиген Т-клетки представляет собой антиген $CD8^+$ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой антиген NK-клетки.

В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

В некотором варианте осуществления мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9. TRGV9 также известен как Vγ9 и экспрессируется на γδ Т-клетках. Используемый в данном документе термин "TRGV9" относится к полипептиду, способному образовывать Т-клеточный рецептор при экспрессии на поверхности γδ Т-клеток. Экспрессирующие TRGV9 γδ Т-клетки являются одними из первых Т-клеток, развивающихся у человеческого плода, и преобладающим подмножеством γδ Т-клеток в клетках периферической крови здоровых взрослых людей. Термин "TRGV9" включает любой вариант TRGV9, изоформу и видовой гомолог, который естественным образом экспрессируется клетками (в том числе Т-клетками) или может быть экспрессирован на клетках, трансфицированных генами или cDNA, кодирующими полипептид. Если не указано, то предпочтительно TRGV9 является TRGV9 человека. Аминокислотная последовательность TRGV9 человека представлена под номером доступа GenBank NG_001336.2. Vγ9Vδ2 Т-лимфоциты, основное подмножество γ/δ Т-клеток у людей, могут распознавать фосфоантигены, некоторые опухолевые клетки и клетки, обработанные аминобисфосфонатами. Vγ9Vδ2 Т-лимфоциты могут проявлять цитолитическую активность в отношении различных опухолевых клеток. Рядовым специалистам в данной области понятно, что γ/δ TCR представляет собой гетеродимерный комплекс TCR, состоящий из ковалентно связанных γ и δ цепей, участвующих в распознавании антигена, и нековалентно связанных мономорфных

белков CD3δ, γ, ε и ζ цепей. TCR Vγ9 представляет собой вариант γ-цепи TCR, экспрессируемой на подмножестве γ/δ Т-клеток.

Без ограничения конкретной теорией считается, что биспецифическое антитело, экспрессирующее и антиген TRGV9, и антиген CD33, может рекрутировать γδ Т-клетки к раковым клеткам, экспрессирующим CD33. Мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) может соединять мостиком эффекторную клетку (например, γδ Т-клетку) и клетки-мишени вместе, что приводит к уничтожению раковых клеток. γδ Т-клетки могут обладать врожденным иммунитетом. Без ограничения конкретной теорией считается, что γδ Т-клетки представляют собой лишь незначительную часть периферических $CD3^+$ Т-клеток (приблизительно 1% - 5%), но составляют основное подмножество (приблизительно 20% - 50%) Т-клеток в эпителиальных тканях. Циркулирующие γδ Т-клетки в основном экспрессируют гетеродимеры цепей Vγ9 (TRGV9) и Vδ2 (TRVD2), тогда как тканевые γδ Т-клетки преимущественно экспрессируют цепи Vδ1, связанные с различными цепями Vγ.

У человека γδ Т-клетки обладают мощными противораковыми функциями (высокой цитотоксичностью и секрецией интерферона γ). Более того, γδ Т-клетки способны к фагоцитозу, функции, ранее присущей исключительно врожденным клеткам миелоидной линии дифференцировки, ведут себя как эффективные антигенпрезентирующие клетки для αβ Т-клеток и индуцируют адаптивный иммунный ответ. γδ Т-клетки могут проникать в раковые ткани, опухоли и раковые клетки. Биспецифическое антитело, экспрессирующее как антиген TRGV9, так и антиген CD33, может проявлять меньшую или незначительную перенаправленность Т-клеток, меньшую пан-активацию Т-клеток и повышенную индукцию мощного лизиса раковых клеток посредством селективного рекрутинга γδ Т-клеток. Соответственно, биспецифическое антитело, экспрессирующее как антиген TRGV9, так и антиген CD33, может не приводить к тяжелым побочным эффектам, которые могут возникать при индукции цитокинового шторма.

В некоторых вариантах осуществления антиген лимфоцита представляет собой CD3ε.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат Fab.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат $F(ab')_2$.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат VHH.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат Fv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат Fd.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержат scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит scFv, и второй связывающий домен, который связывает антиген лимфоцита (например, TRGV9), содержит VHH.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит приблизительно 5-50 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит приблизительно 5-40 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит приблизительно 10-30 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит приблизительно 10-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117,

118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 109.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 110.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 111.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 112.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 113.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 114.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 115.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 116.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 117.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 118.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 119.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 120.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 121.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 122.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 123.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 124.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 125.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 126.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 127.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 128.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 129.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 130.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 132.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 133.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 134.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 135.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 136.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 138.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 139.

В некоторых вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 140.

В определенных вариантах осуществления L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 89, 167, 172, 176, 253, 254 или 255, HCDR2 под SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 90, 91, 168, 173, 177, 256, 257 или 258 HCDR3 под SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16, 17, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 92, 93, 94, 169, 174, 178, 180, 259, 260 или 261, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197, 201, 265 или 266, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194, 198, 267 или 268 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79, 80, 104, 184, 191, 195, 199, 269 или 270.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;
SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;
SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;
SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;
SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;
SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;
SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;
SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;
SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;
SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно;
SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;

SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно;

SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий HCDR1, HCDR2,

HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv и содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий VH под SEQ ID NO:

56 и VL под SEQ ID NO: 85, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87, и второй антигенсвязывающий связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273, и второй антигенсвязывающий домен связывается с TRGV9 (например, где второй связывающий домен представляет собой VHH).

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 58.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 60.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 262.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 263.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 264. В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 53. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 56. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 59. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 262. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 263. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID

NO: 264. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 95.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 97.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 170.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 171.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 175.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 179.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 181.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 96.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 271.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 82. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 85. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 87. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 271. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 272. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 273. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен представляет собой scFv.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 185.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 188.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 192.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 196.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 200.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220 221, 274, 275 или 276.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 208.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 214.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 218.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В определенных вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 275, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9 (например, при этом второй связывающий домен представляет собой VHH).

В других вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276, и второй антигенсвязывающий домен, который связывается с TRGV9 (например, гдепри этом второй связывающий домен представляет собой VHH). В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

HCDR1 под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, LCDR1 под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую

комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

В некоторых вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит Fc-область.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH2.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент первой константной области Ig и/или фрагмент второй константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок дополнительно содержит второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления L2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117,

118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG2.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG3.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG4.

Первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig могут быть дополнительно сконструированы, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR. В определенных таких вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F,

L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

В определенных вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат мутации L234A/L235A/D265S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В определенных таких вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1.В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ рецептором (FcγR).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L, M252Y/S254T/T256E и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

В определенных вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат мутации M252Y/S254T/T256E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В определенных таких вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат мутации L234A/L235A/D265S и M252Y/S254T/T256E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В определенных вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или

фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует связывание с белком A. Такие модификации могут быть благоприятны для целей очистки в ходе получения антитела.

В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация, которая модулирует связывание с белком A, представляет собой H435/Y436F, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В определенных таких вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат мутации L234A/L235A/D265S, M252Y/S254T/T256E и H435/Y436F, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU. В определенных вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбраны из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F,

T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

В некоторых вариантах осуществления первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

Создание мультиспецифических белков, содержащих антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD33

Антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD33, по настоящему изобретению могут быть сконструированы в мультиспецифические антитела, которые также попадают в объем настоящего изобретения.

Антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD33, могут быть сконструированы в полноразмерные мультиспецифические антитела, которые создают с использованием обмена Fab-плечами, при котором в два моноспецифических бивалентных антитела вводят замены в домене CH3 константной области Ig, способствующие обмену Fab-плеча *in vitro*. В способах два моноспецифических бивалентных антитела конструируют с определенными заменами в домене CH3, которые способствуют стабильности гетеродимера; антитела инкубируют вместе в восстановительных условиях, достаточных для того, чтобы остатки цистеина в шарнирной области подверглись изомеризации дисульфидной связи; с созданием тем самым биспецифического антитела путем обмена Fab-плечами. Оптимально условия инкубации могут быть восстановлены до невосстановительных. Иллюстративными восстановителями, которые могут быть использованы, являются 2-меркаптоэтиламин (2-MEA), дитиотреитол (DTT), дитиоэритрит (DTE), глутатион, трис(2-карбоксиэтил)фосфин (TCEP), L-цистеин и бета-меркаптоэтанол, предпочтительно восстановитель, выбранный из группы, состоящей из 2-меркаптоэтиламина, дитиотреитола и трис(2-карбоксиэтил)фосфина. Например, можно использовать инкубацию в течение по меньшей мере 90 минут при температуре по меньшей мере

20°C в присутствии по меньшей мере 25 мМ 2-MEA или в присутствии по меньшей мере 0,5 мМ дитиотреитола при pH от 5-8, например при pH 7,0 или при pH 7,4.

Мутации CH3, которые могут быть использованы, включают такие технологии, как мутации "выступы-во-впадины" (Genentech), мутации электростатического совпадения (Chugai, Amgen, NovoNordisk, Oncomed), тело со сконструированным доменом с обменом нитей (SEEDbody) (EMD Serono), мутации Duobody® (Genmab) и другие асимметричные мутации (например, Zymeworks).

Мутации "выступы-во-впадины" раскрыты, например, в WO1996/027011 и включают мутации на границе области CH3, при которых аминокислоту с малой боковой цепью (впадина) вводят в первую область CH3, а аминокислоту с большой боковой цепью (выступ) вводят во вторую область CH3, что приводит к преимущественному взаимодействию между первой областью CH3 и второй областью CH3. Иллюстративными мутациями области CH3, образующими выступ и впадину, являются T366Y/F405A, T366W/F405W, F405W/Y407A, T394W/Y407T, T394S/Y407A, T366W/T394S, F405W/T394S и T366W/T366S_L368A_Y407V.

Образование гетеродимера тяжелой цепи можно обеспечивать с использованием электростатических взаимодействий путем замены положительно заряженных остатков в первой области CH3 и отрицательно заряженных остатков во второй области CH3, как описано в US2010/0015133, US2009/0182127, US2010/028637 или US2011/0123532.

Другими асимметричными мутациями, которые могут быть использованы для обеспечения гетеродимеризации тяжелой цепи, являются L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 или US2013/0195849 (Zymeworks).

Мутации SEEDbody включают замену выбранных остатков IgG на остатки IgA для обеспечения гетеродимеризации тяжелой цепи, как описано в US20070287170.

Другими иллюстративными мутациями, которые могут быть использованы, являются R409D_K370E/D399K_E357K, S354C_T366W/Y349C_T366S_L368A_Y407V, Y349C_T366W/S354C_T366S_L368A_Y407V, T366K/L351D, L351K/Y349E, L351K/Y349D, L351K/L368E, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, K392D/D399K, K392D/E356K,

K253E_D282K_K322D/D239K_E240K_K292D, K392D_K409D/D356K_D399K, как описано в WO2007/147901, WO 2011/143545, WO2013157954, WO2013096291 и US2018/0118849.

Мутации Duobody® (Genmab) раскрыты, например, в US9150663 и US2014/0303356 и включают мутации F405L/K409R, дикий тип/F405L_R409K, T350I_K370T_F405L/K409R, K370W/K409R, D399AFGHILMNRSTVWY/K409R, T366ADEFGHILMQVY/K409R, L368ADEGHNRSTVQ/K409AGRH, D399FHKRQ/K409AGRH, F405IKLSTVW/K409AGRH и Y407LWQ/K409AGRH.

Дополнительные биспецифические или мультиспецифические структуры, в которые могут быть включены антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, включают иммуноглобулины с двойным вариабельным доменом (DVD) (публикация международной патентной заявки № WO2009/134776; DVD представляют собой полноразмерные антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую структуру VH1-линкер-VH2-CH, и легкую цепь, имеющую структуру VL1-линкер-VL2-CL; линкер необязателен), структуры, включающие различные домены димеризации для соединения двух плечей антител с различной специфичностью, таких как лейциновая молния или домены димеризации коллагена (публикация международной патентной заявки № WO2012/022811, патент США № 5932448; патент США № 6833441), два или более доменных антитела (dAb), конъюгированные вместе, диатела, антитела только с тяжелой цепью, такие как верблюжьи антитела и сконструированные верблюжьи антитела, Ig с двойным нацеливанием (DT-Ig) (GSK/Domantis), антитело "два в одном" (Genentech), сшитые Mab (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star) и CovX-тело (CovX/Pfizer), IgG-подобные биспецифические (InnClone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) и BsAb (Zymogenetics), HERCULES (Biogen Idec) и TvAb (Roche), слияния ScFv/Fc (Academic Institution), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), созданное технологией переориентирования с двойной аффинностью (Fc-DART) (MacroGenics) и двойные$(ScFv)_2$-Fab (National Research Center for Antibody Medicine, Китай), двойного действия или бис-Fab (Genentech), полученные по способу "Dock-and-Lock" (DNL) (ImmunoMedics), бивалентное биспецифическое (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech). ScFv-антитела, диатела и доменные антитела включают без ограничения биспецифический рекрутер Т-клеток (BiTE) (Micromet), тандемное диатело (Tandab) (Affimed), созданное технологией переориентирования с двойной аффинностью (DART) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), слияние

человеческого сывороточного альбумина и ScFv (Merrimack) и COMBODY (Epigen Biotech), нанотела с двойным нацеливанием (Ablynx), антитела с двойным нацеливанием только домена тяжелой цепи.

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению также могут быть сконструированы в мультиспецифические белки, которые содержат три полипептидных цепи. В таких конструкциях по меньшей мере один антигенсвязывающий домен находится в форме scFv. Иллюстративные конструкции включают приведенное ниже (при этом "1" указывает на первый антигенсвязывающий домен, "2" указывает на второй антигенсвязывающий домен, и "3" указывает на третий антигенсвязывающий домен).

Конструкция 1: цепь A) scFv1-CH2-CH3; цепь B) VL2-CL; цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3.

Конструкция 2: цепь A) scFv1-шарнир-CH2-CH3; цепь B) VL2-CL; цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3.

Конструкция 3: цепь A) scFv1-CH1-шарнир-CH2-CH3; цепь B) VL2-CL; цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3.

Конструкция 4: цепь A) CH2-CH3-scFv1; цепь B) VL2-CL; цепь C) VH2-CH1-шарнир-CH2-CH3.

Конструирование CH3 может быть включено в конструкции 1-4, например, мутации L351Y_F405A_Y407V/T394W, T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V, T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V, L351Y_Y407A/T366A_K409F, L351Y_Y407A/T366V_K409F, Y407A/T366A_K409F или T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W, как описано в US2012/0149876 или US2013/0195849 (Zymeworks).

Изотипы, аллотипы и конструирование Fc

Константная область Ig или фрагмент константной области Ig, например Fc-область, присутствующие в белках по настоящему изобретению, могут быть любого аллотипа или изотипа.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG2.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG3.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG4.

Константная область Ig или фрагмент константной области Ig могут быть любого аллотипа. Предполагается, что аллотип не влияет на свойства константной области Ig, такие как связывание или Fc-опосредованные эффекторные функции. Иммуногенность терапевтических белков, содержащих константные области Ig или их фрагменты, связана с повышенным риском реакций на инфузию и уменьшением продолжительности терапевтического ответа (Baert *et al.,* (2003) *N Engl J Med* 348:602-08). Степень, в которой терапевтические белки, содержащие константные области Ig или их фрагменты, индуцируют иммунный ответ у хозяина, может частично определяться аллотипом константной области Ig (Stickler *et al.,* (2011) *Genes and Immunity* 12:213-21). Аллотип константной области Ig связан с вариациями аминокислотной последовательности в определенных местах последовательностей константной области антитела. В таблице 2 показаны выбранные аллотипы IgG1, IgG2 и IgG4.

Таблица 2.

Аллотип	Аминокислотный остаток в положении разнообразия (нумерация остатков: индекс EU)							
	IgG2		IgG4		IgG1			
	189	282	309	422	214	356	358	431
G2m(n)	T	M						
G2m(n-)	P	V						
G2m(n)/(n	T	V						
nG4m(a)			L	R				
G1m(17)					K	E	M	A
G1m(17,1					K	D	L	A

C-концевой лизин (CTL) может быть удален из константной области Ig с помощью эндогенных циркулирующих карбоксипептидаз в кровотоке (Cai *et al.*, (2011) *Biotechnol Bioeng* 108:404-412). В ходе изготовления удаление CTL можно контролировать до уровня ниже максимального путем регулирования концентрации внеклеточного Zn^{2+}, EDTA или EDTA – Fe^{3+}, как описано в публикации патентного документа США № US20140273092. Содержание CTL в белках можно измерять с использованием известных способов.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig,

характеризуется содержанием С-концевого лизина от приблизительно 10% до приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от приблизительно 20% до приблизительно 80%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от приблизительно 40% до приблизительно 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет от приблизительно 55% до приблизительно 70%. В некоторых вариантах осуществления содержание С-концевого лизина составляет приблизительно 60%.

Мутации Fc-области могут быть внесены в антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, конъюгированные с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, чтобы модулировать их эффекторные функции, такие как ADCC, ADCP и/или ADCP и/или фармакокинетические свойства. Это может быть достигнуто путем введения мутации(ий) в Fc, которая(ые) модулируют связывание мутированного Fc с активирующими FcγR (FcγRI, FcγRIIa, FcγRIII), ингибирующими FcγRIIb и/или с FcRn.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в константной области Ig или во фрагменте константной области Ig.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна мутация находится в Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать или пятнадцать мутаций в Fc-области.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая модулирует связывание антитела с FcRn.

Положения Fc, которые могут быть подвергнуты мутации для модулирования периода полужизни (например, связывания с FcRn), включают положения 250, 252, 253, 254, 256, 257, 307, 376, 380, 428, 434 и 435. Иллюстративными мутациями, которые могут быть выполнены по отдельности или в комбинации, являются мутации

T250Q, M252Y, I253A, S254T, T256E, P257I, T307A, D376V, E380A, M428L, H433K, N434S, N434A, N434H, N434F, H435A и H435R. Иллюстративными одиночными или комбинированными мутациями, которые могут быть осуществлены для увеличения периода полужизни, являются мутации M428L/N434S, M252Y/S254T/T256E, T250Q/M428L, N434A и T307A/E380A/N434A. Иллюстративными одиночными или комбинированными мутациями, которые могут быть осуществлены для уменьшения периода полужизни, являются мутации H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит мутацию M252Y/S254T/T256E.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая снижает связывание белка с активирующим Fcγ рецептором (FcγR) и/или снижает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, которые могут быть мутированы для снижения связывания белка с активирующим FcγR и последующего снижения эффекторной функции, включают положения 214, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 265, 267, 268, 270, 295, 297, 309, 327, 328, 329, 330, 331 и 365. Иллюстративными мутациями, которые могут быть выполнены по отдельности или в комбинации, являются мутации K214T, E233P, L234V, L234A, делеция G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, A330S и P331S в IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Иллюстративными комбинированными мутациями, которые приводят к белкам с пониженной ADCC, являются мутации L234A/L235A в IgG1, L234A/L235A/D265S в IgG1, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S в IgG2, F234A/L235A в IgG4, S228P/F234A/L235A в IgG4, N297A во всех изотипах Ig, V234A/G237A в IgG2, K214T/E233P/L234V/L235A/делеция G236/A327G/P331A/D365E/L358M в IgG1, H268Q/V309L/A330S/P331S в IgG2, S267E/L328F в IgG1, L234F/L235E/D265A в IgG1, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S в IgG1, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S в IgG4 и S228P/F234A/L235A/делеция

G236/G237A/P238S в IgG4. Также могут быть использованы гибридные домены Fc IgG2/4, например Fc с остатками 117-260 из IgG2 и остатками 261-447 из IgG4.

Иллюстративной мутацией, приводящей к белкам с пониженной CDC, является мутация K322A.

Хорошо известная мутация S228P может быть осуществлена в IgG4 для повышения стабильности IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию, выбранную из группы, состоящей из K214T, E233P, L234V, L234A, делеции G236, V234A, F234A, L235A, G237A, P238A, P238S, D265A, S267E, H268A, H268Q, Q268A, N297A, A327Q, P329A, D270A, Q295A, V309L, A327S, L328F, K322, A330S и P331S.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит мутацию L234A/L235A/D265S.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит мутацию L234A/L235A.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, содержит по меньшей мере одну мутацию в Fc-области, которая усиливает связывание белка с Fcγ рецептором (FcγR) и/или усиливает эффекторные функции Fc, такие как связывание C1q, комплементзависимая цитотоксичность (CDC), антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) или фагоцитоз (ADCP).

Положения Fc, которые могут быть подвергнуты мутации для усиления связывания белка с активирующим FcγR и/или усиления эффекторных функций Fc, включают положения 236, 239, 243, 256, 290, 292, 298, 300, 305, 312, 326, 330, 332, 333, 334, 345, 360, 339, 378, 396 или 430 (нумерация остатков согласно индексу EU). Иллюстративными мутациями, которые могут быть выполнены по отдельности или в комбинации, являются мутации G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305L, K326A, A330K, I332E, E333A, K334A, A339T и P396L. Иллюстративными комбинированными мутациями, приводящими к белкам с усиленной ADCC или ADCP, являются S239D/I332E, S298A/E333A/K334A,

F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E.

Положения Fc, которые могут быть подвергнуты мутации для усиления CDC, включают положения 267, 268, 324, 326, 333, 345 и 430. Иллюстративными мутациями, которые могут быть выполнены по отдельности или в комбинации, являются S267E, F1268F, S324T, K326A, K326W, E333A, E345K, E345Q, E345R, E345Y, E430S, E430F и E430T. Иллюстративными комбинированными мутациями, приводящими к белкам с усиленной CDC являются K326A/E333A, K326W/E333A, H268F/S324T, S267E/H268F, S267E/S324T и S267E/H268F/S324T.

Специфическими мутациями, описанными в данном документе, являются мутации по сравнению с аминокислотными последовательностями IgG1, IgG2 и IgG4 дикого типа под SEQ ID NO: 222, 223 и 224 соответственно.

SEQ ID NO: 222, IgG1 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 223; IgG2 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 224; IgG4 дикого типа

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Связывание антитела с FcγR или FcRn может быть оценено на клетках,

сконструированных для экспрессии каждого рецептора, с использованием проточной цитометрии. В иллюстративном анализе связывания высевают $2x10^5$ клеток на лунку в 96-луночный планшет и блокируют в буфере для окрашивания BSA (BD Biosciences, Сан-Хосе, США) в течение 30 мин при 4°C. Клетки инкубируют с тестируемым антителом на льду в течение 1,5 часа при 4°C. После двукратного промывания буфером для окрашивания BSA клетки инкубируют с R-PE меченым вторичным антителом к человеческому IgG (Jackson Immunoresearch Laboratories) в течение 45 мин при 4°C. Клетки дважды промывают в буфере для окрашивания, а затем повторно суспендируют в 150 мкл буфера для окрашивания, содержащего разбавленный 1:200 краситель для выявления присутствия живых/мертвых клеток DRAQ7 (Cell Signaling Technology, Данверс, США). Сигналы PE и DRAQ7 окрашенных клеток выявляют на проточном цитометре Miltenyi MACSQuant (Miltenyi Biotec, Оберн, США) с использованием каналов B2 и B4,

соответственно. Живые клетки гейтируют по исключению DRAQ7, и среднее геометрическое

сигналов флуоресценции определяют по меньшей мере для 10000 собранных живых событий. Для анализа используют программное обеспечение FlowJo

(Tree Star). Данные наносят на график в виде логарифма концентрации антитела

в зависимости от среднего сигналов флуоресценции. Выполняют нелинейный регрессионный анализ.

Гликоинженерия

Способность антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, конъюгированного с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, опосредовать ADCC может быть усилена путем конструирования олигосахаридного компонента константной области Ig или фрагмента константной области Ig. Человеческие IgG1 или IgG3 N-гликозилируют по Asn297 с большинством гликанов в хорошо известных биантенарных формах G0, G0F, G1, G1F, G2 или G2F. Содержащие константную область Ig белки могут быть получены с помощью неподвергнутых инженерии клеток CHO, которые, как правило, характеризуются содержанием фукозы гликанов по меньшей мере 85%. Удаление коровой фукозы из биантеннарных олигосахаридов комплексного типа, присоединенных к антигенсвязывающему домену, который связывает CD33, конъюгированному с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, повышает ADCC белка за счет улучшения связывания FcγRIIIa без изменения степени связывания антигена или активности CDC.

Такие белки могут быть получены с использованием различных способов, которые, как сообщается, приводят к успешной экспрессии относительно высокодефукозилированных иммуноглобулинов, несущих биантеннарный комплекс типа Fc-олигосахаридов, как, например, контроль осмоляльности культуры (Konno *et al.,* Cytotechnology 64(:249-65, 2012), применение варианта линии Lec13 CHO в качестве линии клеток-хозяев (Shields *et al., J Biol Chem* 277:26733-26740, 2002), применение варианта линии EB66 CHO в качестве линии клеток-хозяев (Olivier *et al., MAbs*;2(4): 405-415, 2010; PMID:20562582), применение линии клеток гибридомы YB2/0 крысы в качестве линии клеток-хозяев (Shinkawa *et al., J Biol Chem* 278:3466-3473, 2003), введение малой интерферирующей РНК, специфически направленной против гена α-1,6-фукозилтрасферазы (*FUT8)* (Mori *et al., Biotechnol Bioeng* 88:901-908, 2004), или коэкспрессия β-1,4-*N*-ацетилглюкозаминилтрансферазы III и α-маннозидазы II Гольджи или эффективного ингибитора альфа-маннозидазы I кифунензина (Ferrara *et al., J Biol Chem* 281:5032-5036, 2006, Ferrara *et al., Biotechnol Bioeng* 93:851-861, 2006; Xhou *et al., Biotechnol Bioeng* 99:652-65, 2008).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig по настоящему изобретению, имеет биантеннарную структуру гликана с содержанием фукозы от приблизительно 1% до приблизительно 15%, например приблизительно 15%, 14%, 13%, 12%, 11% 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, имеет структуру гликана с содержанием фукозы приблизительно 50%, 40%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, или 20%.

Термин "содержание фукозы" означает количество моносахарида фукозы в сахарной цепи по Asn297. Относительное количество фукозы представляет собой процентную долю фукозосодержащих структур по отношению ко всем гликоструктурам. Они могут быть охарактеризованы и количественно определены несколькими способами, например 1) с помощью MALDI-TOF образца, обработанного N-гликозидазой F (например, комплексные, гибридные и олиго- и высокоманнозные структуры), как описано в международной публикации патентной заявки № WO2008/077546 2); 2) путем ферментативного высвобождения гликанов Asn297 с последующей дериватизацией и выявлением/количественным определением с помощью HPLC (UPLC) с выявлением флуоресценции и/или HPLC-MS (UPLC-MS); 3)

анализом интактного белка нативного или восстановленного mAb с обработкой или без обработки гликанов Asn297 с помощью Endo S или другого фермента, который расщепляет между первым и вторым моносахаридом GlcNAc, оставляя фукозу, присоединенную к первому GlcNAc; 4) расщеплением mAb до составных пептидов с помощью ферментативного расщепления (например, трипсином или эндопептидазой Lys-C) и последующим разделением, выявлением и количественным определением с помощью HPLC-MS (UPLC-MS); 5) отделением олигосахаридов mAb от белка mAb путем специфического ферментативного дегликозилирования с помощью PNGase F по Asn 297. Высвобожденные таким образом олигосахариды могут быть мечены флуорофором, разделены и идентифицированы с помощью различных дополнительных методик, которые позволяют тонкую характеристику гликановых структур с помощью масс-спектрометрии с лазерной десорбцией-ионизацией в присутствии матрицы (MALDI) путем сравнения экспериментальных масс с теоретическими массами, определения степени сиалилирования путем ионообменной HPLC (GlycoSep C), разделения и количественного определения форм олигосахаридов в соответствии с критериями гидрофильности с помощью нормально-фазовой HPLC (GlycoSep N), а также разделения и количественного определения олигосахаридов с помощью высокоэффективного капиллярного электрофореза-лазерной индуцированной флуоресценции (HPCE-LIF).

Используемый в данном документе термин "низкая фукоза" или "низкое содержание фукозы" относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, с содержанием фукозы от приблизительно 1% до 15%.

Используемый в данном документе термин "нормальная фукоза" или "нормальное содержание фукозы" относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD33, конъюгированный с константной областью Ig или с фрагментом константной области Ig, с содержанием фукозы более приблизительно 50%, как правило, более приблизительно 80% или более 85%.

Антиидиотипические антитела

Антиидиотипические антитела представляют собой антитела, которые специфически связываются с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к антиидиотипическому антителу, которое специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к антиидиотипическому антителу, которое специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащему

VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;
VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200;
VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202;
VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или
VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления антиидиотипическое антитело специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащим VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления антиидиотипическое антитело специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащим VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления антиидиотипическое антитело специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащим VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления антиидиотипическое антитело специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащим VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления антиидиотипическое антитело специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащим VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления антиидиотипическое антитело специфически связывается с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, содержащим VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

Антиидиотипическое (Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает антигенные детерминанты (например, паратоп или CDR) антитела. Id антитело может быть антигенблокирующим или неблокирующим. Антигенблокирующее Id может быть использовано для выявления свободного антигенсвязывающего домена в образце (например, антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, по настоящему изобретению). Неблокирующее Id может быть использовано для обнаружения общего антитела (свободного, частично связанного с антигеном или полностью связанного с антигеном) в образце. Id антитело может быть получено путем иммунизации животного антителом, к которому получают Id антитело.

Антитело к Id антителу также может быть использовано в качестве иммуногена для индуцирования иммунного ответа у другого животного с получением так называемого антитела к антителу к Id антителу. Антитело к антителу к Id может быть эпитопически идентичным оригинальному антигенсвязывающему домену, который индуцировал антитело к Id. Таким образом, используя антитела к идиотипическим детерминантам антигенсвязывающего домена, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антигенсвязывающие домены с идентичной специфичностью. Антитела к Id можно варьировать (таким образом, получая варианты антител к Id) и/или дериватизировать с помощью любой подходящей методики, как, например, описанная в данном документе.

Иммуноконъюгаты

Антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению, белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, или мультиспецифические белки, которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33 (совместно называемые в данном документе связывающими CD33 белками), могут быть конъюгированы с гетерологичной молекулой. Связывающий CD33 белок также включает химерные антигенные рецепторы (CAR), которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичная молекула представляет собой выявляемую метку или цитотоксическое средство.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD33, конъюгированному с выявляемой меткой.

Настоящее изобретение также относится к белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой.

Настоящее изобретение также относится к мультиспецифическому белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой.

Настоящее изобретение также относится к антигенсвязывающему домену, который связывает CD33, конъюгированному с цитотоксическим средством.

Настоящее изобретение также относится к белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с цитотоксическим средством.

Настоящее изобретение также относится к мультиспецифическому белку, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с цитотоксическим средством.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с цитотоксическим средством.

Связывающие CD33 белки по настоящему изобретению могут быть использованы для направления терапевтических средств на экспрессирующие CD33

клетки, такие как клетки миелоидной линии. В качестве альтернативы, экспрессирующие CD33 клетки могут быть нацелены на связывающий CD33 белок по настоящему изобретению, соединенный с терапевтическим средством, предназначенным для модификации функции клетки после интернализации.

В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка также представляет собой цитотоксическое средство.

Связывающие CD33 белки по настоящему изобретению, конъюгированные с выявляемой меткой, могут быть использованы для оценки экспрессии CD33 в различных образцах.

Выявляемая метка включает композиции, которые при конъюгировании со связывающими CD33 белками по настоящему изобретению делают последние выявляемыми с помощью спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических или химических средств.

Иллюстративные выявляемые метки включают радиоактивные изотопы, магнитные гранулы, металлические гранулы, коллоидные частицы, флуоресцентные красители, электронно-плотные реагенты, ферменты (например, обычно используемые в ELISA), биотин, дигоксигенин, гаптены, люминесцентные молекулы, хемилюминесцентные молекулы, флуорохромы, флуорофоры, гасители флуоресценции, цветные молекулы, радиоактивные изотопы, сцинтилляты, авидин, стрептавидин, белок A, белок G, антитела или их фрагменты, полигистидин, Ni^{2+}, метки Flag, метки myc, тяжелые металлы, ферменты, щелочную фосфатазу, пероксидазу, люциферазу, доноры/акцепторы электронов, сложные эфиры акридиния и колориметрические субстраты.

Можно применять любую из меток, раскрытых в международной патентной публикации № WO2019/125982, включенной в данный документ посредством ссылки.

Выявляемая метка может испускать сигнал спонтанно, как, например, когда выявляемая метка представляет собой радиоактивный изотоп. В других случаях выявляемая метка испускает сигнал в результате стимуляции внешним полем.

Иллюстративные радиоактивные изотопы могут быть γ-излучающими, оже-излучающими, β-излучающими, альфа-излучающими или позитрон-излучающими радиоактивными изотопами. Иллюстративные радиоактивные изотопы включают ^{3}H, ^{11}C, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}F, ^{19}F, ^{55}Co, ^{57}Co, ^{60}Co, ^{61}Cu, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Cu, ^{68}Ga, ^{72}As, ^{75}Br, ^{86}Y, ^{89}Zr, ^{90}Sr, ^{94m}Tc, ^{99m}Tc, ^{115}In, $^{123}1$, $^{124}1$, ^{125}I, $^{131}1$, ^{211}At, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{226}Ra, ^{225}Ac и ^{227}Ac.

В некоторых вариантах осуществления радиоактивный изотоп используют в терапевтических целях, например для усиления гибели клеток. Радиоактивные изотопы, используемые для усиления гибели клеток, включают без ограничения ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{255}Fm и ^{227}Th. Без ограничения конкретной теорией считается, что связывающие CD33 белки, содержащие радиоизотоп, используемый в терапевтических целях, могут быть интернализованы клеткой-мишенью и уничтожены клеткой-мишенью.

Радиоиммунотерапия с использованием связывающего CD33 белка, конъюгированного с радиоактивным изотопом, может быть полезной для лечения локальных или диффузных опухолей. В некоторых вариантах осуществления субъект получает лечение путем введения радиомеченых моноклональных антител, направленных специфически против опухоль-ассоциированных антигенов или против микроокружения опухоли. Радиомеченная (например, Ac225) терапия может быть высокоэффективной, требуя низких доз для уничтожения клеток, как, например, в контексте лечения гематологических злокачественных опухолей с клетками, экспрессирующими CD33.

В некоторых вариантах осуществления радиоактивный изотоп используют для усиления визуализации, как, например, для тестирования, чтобы показать, нацелен ли связывающий CD33 белок на представляющие интерес ткани. Иллюстративные изотопы, используемые для улучшения визуализации включают, без ограничения ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{89}Zr и ^{111}In.

Иллюстративные атомы металлов представляют собой металлы с атомным номером более 20, такие как атомы кальция, атомы скандия, атомы титана, атомы ванадия, атомы хрома, атомы марганца, атомы железа, атомы кобальта, атомы никеля, атомы меди, атомы цинка, атомы галлия, атомы германия, атомы мышьяка, атомы селена, атомы брома, атомы криптона, атомы рубидия, атомы стронция, атомы иттрия, атомы циркония, атомы ниобия, атомы молибдена, атомы технеция, атомы рутения, атомы родия, атомы палладия, атомы серебра, атомы кадмия, атомы индия, атомы олова, атомы сурьмы, атомы теллура, атомы йода, атомы ксенона, атомы цезия, атомы бария, атомы лантана, атомы гафния, атомы тантала, атомы вольфрама, атомы рения, атомы осмия, атомы иридия, атомы платины, атомы золота, атомы ртути, атомы таллия, атомы свинца, атомы висмута, атомы франция, атомы радия, атомы актиния, атомы церия, атомы празеодима, атомы неодима, атомы прометия, атомы самария,

атомы европия, атомы гадолиния, атомы тербия, атомы диспрозия, атомы гольмия, атомы эрбия, атомы тулия, атомы иттербия, атомы лютеция, атомы тория, атомы протактиния, атомы урана, атомы нептуния, атомы плутония, атомы америция, атомы кюрия, атомы беркелия, атомы калифорния, атомы эйнштейния, атомы фермия, атомы менделевия, атомы нобелия или атомы лоуренция.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть щелочноземельными металлами с атомным номером более двадцати.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть лантаноидами.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть актинидами.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть переходными металлами.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть легкими металлами.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть атомами золота, атомами висмута, атомами тантала и атомами гадолиния.

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть металлами с атомным номером от 53 (т. е. йод) до 83 (т. е. висмут).

В некоторых вариантах осуществления атомы металла могут быть атомами, подходящими для магнитно-резонансной визуализации.

Атомы металла могут быть ионами металла в форме +1, +2 или +3 состояния окисления, такими как Ba^{2+}, Bi^{3+}, Cs^{+}, Ca^{2+}, Cr^{2+}, Cr^{3+}, Cr^{6+}, Co^{2+}, Co^{3+}, Cu^{+}, Cu^{2+}, Cu^{3+}, Ga^{3+}, Gd^{3+}, Au^{+}, Au^{3+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}, F^{3+}, Pb^{2+}, Mn^{2+}, Mn^{3+}, Mn^{4+}, Mn^{7+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, Ni^{3+}, Ag^{+}, Sr^{2+}, Sn^{2+}, Sn^{4+} и Zn^{2+}. Атомы металла могут входить в состав оксида металла, такого как оксид железа, оксид марганца или оксид гадолиния.

Подходящие красители включают любые коммерчески доступные красители, такие как, например, 5(6)-карбоксифлуоресцеин, малеимид IRDye 680RD или IRDye 800CW, рутений-полипиридиловые красители и т. п.

Подходящими флуорофорами являются изотиоцианат флуоресцеина (FITC), тиосемикарбазид флуоресцеина, родамин, техасский красный, CyDyes (например, Cy3, Cy5, Cy5.5), Alexa Fluors (например, Alexa488, Alexa555, Alexa594; Alexa647), флуоресцентные красители ближнего инфракрасного диапазона (NIR) (700-900 нм), а также карбоцианиновые и аминостириловые красители.

Антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой, может быть использован в качестве визуализирующего средства.

Белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой, может быть использован в качестве визуализирующего средства.

Мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой, может быть использован в качестве визуализирующего средства.

CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгированный с выявляемой меткой, может быть использован в качестве визуализирующего средства.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой химиотерапевтическое средство, лекарственное средство, ингибирующее рост средство, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т. е. радиоконъюгат).

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой дауномицин, доксорубицин, метотрексат, виндезин, бактериальные токсины, такие как дифтерийный токсин, рицин, гелданамицин, майтансиноиды или калихеамицин. Цитотоксическое средство может вызывать цитотоксические и цитостатические действия посредством механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование топоизомеразы.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой ферментативно активный токсин, такой как дифтерийная цепь А, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трикотецены.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой радионуклид, такой как ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y и ^{186}Re.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой доластатин или пептидные аналоги и производные долостатина, ауристатин или монометил фенилаланин ауристатина. Иллюстративные молекулы раскрыты в

патентах США №№ 5635483 и 5780588. Было показано, что доластатины и ауристатины вмешиваются в динамику микротрубочек, гидролиз GTP и ядерное и клеточное деление (Woyke et al. (2001) Antimicrob Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) и обладают противораковой и противогрибковой активностью. Лекарственный фрагмент доластатин или ауристатин может быть присоединен к антителу по настоящему изобретению через N(амино)-конец или С (карбоксильный) конец пептидного лекарственного фрагмента (WO02/088172) или через любой цистеин, встроенный в антитело.

Связывающие CD33 белки по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с выявляемой меткой с помощью известных способов.

В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка образует комплекс с хелатирующим средством.

В некоторых вариантах осуществления выявляемая метка конъюгирована со связывающими CD33 белками по настоящему изобретению через линкер.

Выявляемая метка или цитотоксический фрагмент могут быть связаны непосредственно или опосредованно со связывающими CD33 белками по настоящему изобретению с помощью известных способов. Подходящие линкеры известны в уровне техники и включают, например, простетические группы, нефенольные линкеры (производные N-сукцимидилбензоатов; додекаборат), хелатирующие фрагменты как макроциклических, так и ациклических хелаторов, такие как производные 1,4,7,10-тетраазациклододекан-1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA), производные диэтилентриаминпентауксусной кислоты (DTPA), производные S-2-(4-изотиоцианатобензил)-1,4,7-триазациклононан-1,4,7-триуксусной кислоты (NOTA) и производные 1,4,8,11-тетраазациклодоцедан-1,4,8,11-тетрауксусной кислоты (TETA), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)-пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имидоэфиров (например, диметиладипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис(п-азидобензоил)гександиамин), бис-диазониевые производные (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат), бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол) и другие хелатирующие фрагменты. Подходящие пептидные линкеры хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления связывающие CD33 белки по настоящему изобретению удаляются из крови через почечный клиренс.

Наборы

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему любой из антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD33, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему белок, содержащий любой из антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD33, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему любой из мультиспецифических белков, описанных в данном документе, которые содержат антигенсвязывающий домен, который связывает CD33.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему CAR, содержащий любой из антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, которые связывают CD33.

Набор может быть использован для терапевтических применений и в качестве диагностических наборов.

Набор может быть использован для обнаружения присутствия CD33 в образце.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит связывающий CD33 белок по настоящему изобретению и реагенты для выявления связывающего CD33 белка. Набор может включать один или несколько других элементов, в том числе инструкции по применению; другие реагенты, например метку, терапевтическое средство или средство, применимое для хелатирования или иного присоединения антитела к метке или терапевтическому средству, или радиозащитную композицию; устройства или другие материалы для получения антитела для введения; фармацевтически приемлемые носители и устройства или другие материалы для введения субъекту.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, в контейнере и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, в контейнере и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, в контейнере и инструкции по применению набора.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, в наборе меченый.

В некоторых вариантах осуществления белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, в наборе меченый.

В некоторых вариантах осуществления мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, в наборе меченый.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен (например, scFv), который связывает CD33, содержащий VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий

a) VH под SEQ ID NO: 18;

b) VH под SEQ ID NO: 19;

c) VH под SEQ ID NO: 20;

d) VH под SEQ ID NO: 21;

e) VH под SEQ ID NO: 22;

f) VH под SEQ ID NO: 23;

g) VH под SEQ ID NO: 24;

h) VH под SEQ ID NO: 25; или

i) VH под SEQ ID NO: 26; или

j) VH под SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26 или 27. В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263 или 264. В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272 или 273. В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96. В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220 221, 274, 275 или 276.

В определенных вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 213.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 216.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 219.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 274.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 275.

В других вариантах осуществления набор содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержащий SEQ ID NO: 276.

Способы выявления CD33

Настоящее изобретение также относится к способу выявления CD33 в образце, включающему получение образца, приведение образца в контакт с антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, по настоящему изобретению и выявление связанного CD33 в образце.

В некоторых вариантах осуществления образец может быть получен из мочи, крови, сыворотки крови, плазмы, слюны, асцитов, циркулирующих клеток, синовиальной жидкости, циркулирующих клеток, клеток, которые не связаны с тканями (т. е. свободных клеток), тканей (например, хирургически резецированной

ткани, биоптатов, включая тонкоигольную аспирацию), гистологических препаратов и т. п.

Антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению может быть обнаружен с помощью известных способов. Иллюстративные способы включают прямое мечение антител с использованием флуоресцентных или хемилюминесцентных меток или радиометок или присоединение к антителам по настоящему изобретению легко выявляемых фрагментов, таких как биотин, ферменты или эпитопные метки. Иллюстративными метками и фрагментами являются рутений, ^{111}In-DOTA, ^{111}In-диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA), пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза и бета-галактозидаза, полигистидин (метка HIS), акридиновые красители, цианиновые красители, флуороновые красители, оксазиновые красители, фенантридиновые красители, родаминовые красители и красители Alexafluor®.

Антитела могут быть непосредственно мечены любыми из радиометок и радиоактивных средств, раскрытых в международной патентной публикации № WO2019/125982, включенной в данный документ посредством ссылки.

Антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению может быть использован в различных анализах для выявления CD33 в образце. Иллюстративными анализами являются вестерн-блот анализ, радиоиммуноанализ, поверхностный плазмонный резонанс, иммунопреципитация, равновесный диализ, иммунодиффузия, иммунохимический анализ с электрохемилюминесценцией (ECL), иммуногистохимия, сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS) или анализ ELISA.

Химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению

Любой из антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD33, идентифицированных в данном документе, могут быть сконструированы в химерный антигенный рецептор (CAR) для получения CAR, которые связывают CD33. Настоящее изобретение относится к CAR, которые нацеливаются на CD33, к клеткам, содержащим такие CAR, и к способам лечения рака с продуцированием CD33, такого как гематологический рак, с использованием CAR, описанных в данном документе.

CAR по настоящему изобретению обладают антигенной специфичностью в отношении CD33. Фразы "обладают антигенной специфичностью" и "вызывают антиген-специфический ответ", используемые в данном документе, означают, что CAR может специфически связываться с антигеном и иммунологически распознавать его, так что связывание CAR с антигеном CD33 вызывает иммунный ответ. Способы тестирования CAR в отношении антигенной специфичности и способности распознавать клетки-мишени известны в уровне техники.

Настоящее изобретение относится к применению Т-клеток, которые были генетически модифицированы для стабильной экспрессии необходимого химерного антигенного рецептора. Химерный антигенный рецептор (CAR) представляет собой искусственно сконструированный гетерологичный белок или полипептид, содержащий антигенсвязывающий домен антитела (например, scFv), соединенный с доменом передачи сигнала Т-клетки. Характеристики CAR включают их способность перенаправлять специфичность и реактивность Т-клеток на выбранную мишень без ограничения по MHC с использованием антигенсвязывающих свойств моноклональных антител. Распознавание антигена без ограничения по MHC дает Т-клеткам, экспрессирующим CAR, способность распознавать антигены независимо от обработки антигена, тем самым обходя основной механизм уклонения опухоли от иммунологического ответа. Более того, когда CAR экспрессируются в Т-клетках, CAR предпочтительно не димеризуются с эндогенными альфа- и бета-цепями Т-клеточных рецепторов (TCR).

CAR, описанные в данном документе, представляют собой рекомбинантные полипептидные конструкции, включающие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала (также упоминаемый в данном документе как цитоплазматический домен передачи сигнала), содержащий функциональный домен передачи сигнала, полученный из стимуляторной молекулы, как описано в данном документе. Т-клетки, экспрессирующие CAR, в данном документе называют Т-клетками с CAR, CAR-Т-клетками или CAR-модифицированными Т-клетками, и эти термины используют в данном документе взаимозаменяемо. Клетка может быть генетически модифицирована для стабильной экспрессии антителосвязывающего домена на своей поверхности, что придает новую антигенную специфичность, не зависящую от MHC.

В некоторых случаях Т-клетка генетически модифицирована для стабильной экспрессии CAR, который объединяет антигенраспознающий домен антитела с

внутриклеточным доменом дзета-цепи CD3 или белка FcγRI в единый химерный белок. В одном варианте осуществления стимуляторная молекула представляет собой дзета-цепь, связанную с комплексом Т-клеточного рецептора.

Термин "**домен внутриклеточной передачи сигнала**" относится к внутриклеточной части молекулы. Это функциональная часть белка, которая действует путем передачи информации внутри клетки для регулирования клеточной активности через определенные пути передачи сигнала путем генерирования вторых мессенджеров или функционирования в качестве эффекторов, отвечая на такие мессенджеры. Домен внутриклеточной передачи сигнала генерирует сигнал, который обеспечивает иммунную эффекторную функцию CAR-содержащей клетки, например CAR-T-клетки. Примеры иммунной эффекторной функции, например, в CAR-T-клетке, включают цитолитическую активность и хелперную активность, включая секрецию цитокинов.

В одном варианте осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит первичный домен внутриклеточной передачи сигнала. Иллюстративные первичные домены внутриклеточной передачи сигнала включают домены, полученные из молекул, ответственных за первичную стимуляцию или антигензависимую стимуляцию. В одном варианте осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный внутриклеточный домен. Иллюстративные костимуляторные домены внутриклеточной передачи сигнала включают домены, полученные от молекул, ответственных за костимуляторные сигналы или антигеннезависимую стимуляцию. Например, в случае CAR-T первичный домен внутриклеточной передачи сигнала содержит цитоплазматическую последовательность рецептора Т-клеток, а костимуляторный домен внутриклеточной передачи сигнала содержит цитоплазматическую последовательность из корецептора или костимуляторной молекулы.

Первичный домен внутриклеточной передачи сигнала содержит мотив передачи сигнала, который известен как активирующий мотив иммунорецептора на основе тирозина или ITAM. Иллюстративные ITAM, содержащие первичные цитоплазматические последовательности передачи сигнала, включают те, которые получены из CD3-дзета, FcRγ, FcR бета, CD3γ, CD3δ, CD3ε, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD66d, DAP10 и DAP12.

Термин "дзета" или альтернативно "дзета-цепь", "CD3-дзета" или "TCR-дзета" определяют как белок, представленный в GenBank под № доступа BAG36664.1, или эквивалентные остатки от отличного от человека вида, например мыши, кролика,

примата, мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., а "стимуляторный домен дзета" или альтернативно "стимуляторный домен CD3-дзета" или "стимуляторный домен TCR-дзета" определяют как аминокислотные остатки из цитоплазматического домена дзета-цепи, которых достаточно для функциональной передачи начального сигнала, необходимого для активации Т-клетки. В одном аспекте цитоплазматический домен дзета включает остатки с 52 по 164 в GenBank под № доступа BAG36664.1 или эквивалентные остатки от отличного от человека вида, например мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., которые являются их функциональными ортологами. В одном аспекте "дзета-стимуляторный домен" или "CD3-дзета-стимуляторный домен" представляет собой последовательность, представленную под SEQ ID NO: 28, или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 164.

SEQ ID NO: 164, CD3-дзета стимуляторный домен

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQ EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP PR

Термин "костимуляторная молекула" относится к когнатному партнеру по связыванию на Т-клетке, который специфически связывается с костимуляторным лигандом, тем самым опосредуя костимуляторный ответ Т-клетки, такой как без ограничения пролиферация. Костимуляторные молекулы представляют собой молекулы клеточной поверхности, отличные от антигенных рецепторов или их лигандов, которые необходимы для эффективного иммунного ответа. Костимуляторные молекулы включают без ограничения молекулу MHC класса 1, BTLA и лигандный Toll рецептор, а также OX40, CD2, CD27, CD28, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18) и 4-1BB (CD137).

Костимуляторный домен внутриклеточной передачи сигнала может быть внутриклеточной частью костимуляторной молекулы. Костимуляторная молекула может быть представлена в следующих семействах белков: белки рецепторов TNF, иммуноглобулиноподобные белки, рецепторы цитокинов, интегрины, сигнальные молекулы активации лимфоцитов (белки SLAM) и активирующие рецепторы NK-

клеток. Иллюстративные такие молекулы включают CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, GITR, CD30, MyD88, CD40, ICOS, BAFFR, HVEM, лимфоцитарный функционально-ассоциированный антиген-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3, лиганд, специфически связывающийся с CD83, и т. п.

Домен внутриклеточной передачи сигнала может включать всю внутриклеточную часть или весь нативный домен внутриклеточной передачи сигнала молекулы, из которой он получен, или его функциональный фрагмент.

Термин "4-1BB" или альтернативно "CD137" относится к представителю суперсемейства TNFR с аминокислотной последовательностью, представленной в GenBank под номером доступа AAA62478.2, или эквивалентные остатки из отличного от человека вида, например мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п.; и "костимуляторный домен 4-1BB" определяют как аминокислотные остатки 214-255 из GenBank под номером доступа AAA62478.2 или эквивалентные остатки из отличного от человека вида, например мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п. В одном аспекте "костимуляторный домен 4-1BB" или "костимуляторный домен CD137" представляет собой последовательность, представленную под **SEQ ID NO: 163** (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL; **SEQ ID NO: 163**), или эквивалентные остатки из отличного от человека вида, например мыши, грызуна, обезьяны, человекообразной обезьяны и т. п., или последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 163.

В одном варианте осуществления используют трансмембранный домен, который естественным образом связан с одним из других доменов в CAR. В другом варианте осуществления трансмембранный домен может быть выбран или модифицирован путем аминокислотной замены, чтобы избежать связывания таких доменов с трансмембранными доменами одного и того же или разных поверхностных мембранных белков для минимизации взаимодействий с другими представителями рецепторного комплекса. В одном варианте осуществления трансмембранный домен содержит шарнирный домен CD8α.

В некоторых вариантах осуществления цитоплазматический домен передачи

сигнала дополнительно содержит один или несколько функциональных доменов передачи сигнала, полученных от по меньшей мере одной костимуляторной молекулы, которая определена в данном документе. В одном варианте осуществления костимуляторная молекула выбрана из 4-1BB (т. е. CD137), CD27, CD3-дзета и/или CD28. CD28 является маркером Т-клеток, важным для костимуляции Т-клеток. CD27 является представителем суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли и действует как костимуляторная молекула иммунной контрольной точки. 4-1BB передает мощный костимуляторный сигнал Т-клеткам, способствуя дифференцировке и повышая долгосрочное выживание Т-лимфоцитов. CD3-дзета связывается с TCR для получения сигнала и содержит активирующие мотивы иммунорецептора на основе тирозина (ITAM). В другом варианте осуществления костимуляторной молекулой является MyD88 или CD40.

В одном варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен, содержащий CD8, и домен внутриклеточной передачи сигнала рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета. В другом варианте осуществления CAR содержит внутриклеточный шарнирный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала рецептора Т-клеток, содержащий CD28, 4-1BB и CD3-дзета, где шарнирный домен содержит всю внеклеточную область CD8, CD4 или CD28 или ее часть; всю константную область антитела или ее часть; весь рецептор FcγRIIIA, шарнир IgG, шарнир IgM, шарнир IgA, шарнир IgD, шарнир IgE или шарнир Ig или их часть. Шарнир IgG может быть из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM1, IgM2, IgA1, IgA2, IgD, IgE или их химеры.

CAR, описанные в данном документе, представляют собой рекомбинантные полипептидные конструкции, содержащие по меньшей мере внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала (также упоминаемый в данном документе как цитоплазматический домен передачи сигнала), содержащий, например, функциональный домен передачи сигнала, полученный из стимуляторной молекулы, которая определена ниже.

В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, включающий функциональный домен передачи сигнала, полученный из стимуляторной молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной

передачи сигнала, содержащий функциональный домен передачи сигнала, полученный из костимуляторной молекулы, и функциональный домен передачи сигнала, полученный из стимуляторной молекулы. В одном варианте осуществления CAR содержит химерный слитый белок, содержащий внеклеточный антигенраспознающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, содержащий по меньшей мере два функциональных домена передачи сигнала, полученных из одной или нескольких костимуляторных молекул, и функциональный домен передачи сигнала, полученный из стимуляторной молекулы.

CAR по настоящему изобретению могут быть сконструированы с содержанием домена передачи сигнала CD28 и/или 4-1BB сами по себе или могут быть объединены с любым другим необходимым(и) цитоплазматическим(и) доменом(ами), применимым(и) в контексте CAR по настоящему изобретению. В одном варианте осуществления цитоплазматический домен CAR может дополнительно включать домен передачи сигнала CD3-дзета. Например, цитоплазматический домен CAR может включать без ограничения модули передачи сигнала CD3-дзета, 4-1BB и CD28 и их комбинации. Соответственно, настоящее изобретение относится к Т-клеткам с CAR и способам их применения для адоптивной терапии.

Далее в настоящем изобретении представлены варианты, например, функциональные варианты CAR. Используемый в данном документе термин "функциональный вариант" относится к CAR, имеющему существенную или значительную идентичность последовательности или сходство с исходным CAR, функциональный вариант которого сохраняет биологическую активность CAR, в отношении которого он является вариантом. Функциональные варианты охватывают, например, те варианты CAR, которые сохраняют способность распознавать клетки-мишени в подобной степени, в такой же степени или в большей степени, чем исходный CAR. По отношению к исходному CAR функциональный вариант может, например, быть на по меньшей мере приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или более идентичным по аминокислотной последовательности исходному CAR.

Функциональный вариант может, например, включать аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной консервативной

аминокислотной заменой. В одном варианте осуществления функциональный вариант включает аминокислотную последовательность исходного CAR с по меньшей мере одной неконсервативной аминокислотной заменой. В этом случае неконсервативная аминокислотная замена может не взаимодействовать или ингибировать биологическую активность функционального варианта. Неконсервативная аминокислотная замена может усиливать биологическую активность функционального варианта таким образом, что биологическая активность функционального варианта повышается по сравнению с исходным CAR.

Консервативные аминокислотные замены известны в уровне техники и описаны в данном документе.

CAR по настоящему изобретению может состоять по сути из указанной аминокислотной последовательности или последовательностей, описанных в данном документе, так что другие компоненты, например другие аминокислоты, существенно не изменяют биологическую активность функционального варианта.

CAR по настоящему изобретению (включая функциональные части и функциональные варианты) могут быть любой длины, т. е. могут включать любое количество аминокислот, при условии, что CAR (или их функциональные части или функциональные варианты) сохраняют свою биологическую активность, например способность специфически связываться с антигеном, обнаруживать больные клетки (например, раковые клетки) у хозяина, лечить или предупреждать заболевание у хозяина и т. д. Например, CAR могут иметь длину от приблизительно 50 до приблизительно 5000 аминокислот, например приблизительно 50, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 100, приблизительно 125, приблизительно 150, приблизительно 175, приблизительно 200, приблизительно 225, приблизительно 250, приблизительно 275, приблизительно 300, приблизительно 325, приблизительно 350, приблизительно 375, приблизительно 400, приблизительно 425, приблизительно 450, приблизительно 475, приблизительно 500, приблизительно 525, приблизительно 550, приблизительно 575, приблизительно 600, приблизительно 625, приблизительно 650, приблизительно 675, приблизительно 700, приблизительно 725, приблизительно 750, приблизительно 775, приблизительно 800, приблизительно 825, приблизительно 850, приблизительно 875, приблизительно 900, приблизительно 925, приблизительно 950, приблизительно 975, приблизительно 1000 или более аминокислот в длину.

CAR по настоящему изобретению (включая функциональные части и функциональные варианты по настоящему изобретению) могут содержать

синтетические аминокислоты вместо одной или нескольких аминокислот природного происхождения. Такие синтетические аминокислоты известны в уровне техники и включают, например, аминоциклогексанкарбоновую кислоту, норлейцин, α-амино-n-декановую кислоту, гомосерин, S-ацетиламинометил-цистеин, транс-3- и транс-4-гидроксипролин, 4-аминофенилаланин, 4-нитрофенилаланин, α-(2-амино-2-норборнан)-карбоновую кислоту, α,γ-диаминомасляную кислоту, α,β-диаминопропионовую кислоту, гомофенилаланин, 4-хлорфенилаланин, 4-карбоксифенилаланин, β-фенилсерин, β-гидроксифенилаланин, фенилглицин, α-нафтилаланин, циклогексилаланин, циклогексилглицин, N′-бензил-N′-метил-лизин, N′,N′-дибензил-лизин, 6-гидроксилизин, орнитин, α-аминоциклопентанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогексанкарбоновую кислоту, α-аминоциклогептанкарбоновую кислоту, индолин-2-карбоновую кислоту, 1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-3-карбоновую кислоту, аминомалоновую кислоту, моноамид аминомалоновой кислоты и α-трет-бутилглицин.

CAR по настоящему изобретению (включая функциональные части и функциональные варианты) могут подвергаться посттрансляционным модификациям. Они могут быть гликозилированы, этерифицированы, N-ацилированы, амидированы, карбоксилированы, фосфорилированы, эстерифицированы, циклизованы, например через дисульфидный мостик, или превращены в соль присоединения кислоты. В некоторых вариантах осуществления они димеризованы, полимеризованы или конъюгированы.

CAR по настоящему изобретению (включая функциональные части и их функциональные варианты) могут быть получены способами, известными в уровне техники. Подходящие способы синтеза полипептидов и белков *de novo* описаны в ссылках, таких как Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc.,2000; и *Epitope Mapping*, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2001. Также CAR могут быть получены рекомбинантно с использованием нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, с использованием стандартных рекомбинантных способов. Кроме того, некоторые CAR (включая функциональные части и их функциональные варианты) могут быть выделены и/или очищены из источника, такого как растение, бактерия, насекомое, млекопитающее и т. д. Способы выделения и очистки известны в уровне техники. В качестве альтернативы, CAR, по настоящему изобретению (включая их

функциональные части и функциональные варианты) могут быть коммерчески синтезированы. В этом отношении CAR, полипептиды и белки могут быть синтетическими, рекомбинантными, выделенными и/или очищенными.

Настоящее изобретение также относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые связываются с эпитопом CAR по настоящему изобретению. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь любой уровень аффинности или авидности по отношению к функциональной части CAR. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связывать CD33 с диапазоном значений аффинности (K_D). В одном варианте осуществления антитело связывается с CD33 с K_D, равным или меньшим, чем приблизительно 10^{-7} М, как, например, без ограничения 1-9,9 (или любой диапазон или значение в нем, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9)$\times 10^{-8}$ М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М, 10^{-13} М, 10^{-14} М, 10^{-15} М или любой диапазон или значение в нем, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса или способа Kinexa, что практикуют специалисты в данной области. Одно иллюстративное значение аффинности равно или меньше 1×10^{-8} М. Другое иллюстративное значение аффинности равно или меньше 1×10^{-9} М.

Способы тестирования антител в отношении их способности связываться с любой функциональной частью CAR по настоящему изобретению известны в уровне техники и включают любой анализ связывания антитело-антиген, такой как, например, радиоиммуноанализ (RIA), вестернблоттинг, ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), иммунопреципитация и анализ конкурентного ингибирования.

Часть CAR, содержащая антитело или его фрагмент, может существовать в различных формах, где антигенсвязывающий домен экспрессируется как часть непрерывной полипептидной цепи, включая, например, однодоменный фрагмент антитела (sdAb), scFv и человеческое химерное или гуманизированное антитело (Harlow et al., 1999, в*: Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.; Harlow et al., 1989, в*: Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, N.Y.; Houston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; Bird et al., 1988, *Science* 242:423-426). В одном аспекте антигенсвязывающий домен CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела. В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению содержит фрагмент антитела, который содержит scFv.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный

антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33;

трансмембранный домен и

домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM) и домен внутриклеточной передачи сигнала, содержащий костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137) и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

В некоторых вариантах осуществления CAR содержит

CD8a-шарнирную область, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 157;

трансмембранный домен, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 162; и/или

домен внутриклеточной передачи сигнала, содержащий костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 164.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и содержит

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 81 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 52;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 105 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 95;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен связывает CD33 и

содержит LCDR1, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273 и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

Иллюстративные последовательности HCDR и LCDR описаны в таблицах 4a, 4b, 4c, 4d, 4e и 4f.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяют согласно Kabat.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяют согласно Chothia.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяют согласно IMGT.

В некоторых вариантах осуществления CDR определяют согласно AbM.

В некотором варианте осуществления CDR определяют согласно Contact.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 253, 254 или 255, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 256, 257 или 258, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 259, 260 или 261, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 265 или 266, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 267 или 268 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79, 80, 269 или 270.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 253, 254 или 255 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий

домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 256, 257 или 258 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 259, 260 или 261 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 265 или 266 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и

домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73, 74, 267 или 268 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR3 под SEQ ID NO: 71 или 146 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79, 80, 269 или 270 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199 или таковыми с консервативными заменами.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный

антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2

и LCDR3 под SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;

k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

Внеклеточный антигенсвязывающий домен также может представлять собой вариант связывающих CD33 доменов, который описан в данном документе (например, вариант домена, который описан в примерах 19-20).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 52, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 81.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 53, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 82.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 54, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 83.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 55, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 84.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 56, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 85.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 57, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 86.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 58, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 59, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 60, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 87.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 61, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 88.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 95, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 105.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 96, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 106.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 97, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 107.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 170, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 185.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 171, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 188.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 175, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 192.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 179, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 196.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 181, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 200.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 96, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 262, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 271.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 263, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 272.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 264, и VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична полипептиду под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит scFv. В некоторых вариантах осуществления scFv содержит линкерный полипептид между VL и VH.

В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с SEQ ID NO: 108.

В некоторых вариантах осуществления линкерный полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108 (например где линкерный полипептид состоит из аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 108).

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 274, 275 и 276.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 208.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 214.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 218.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В некоторых вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В определенных вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В других вариантах осуществления внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, который содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 208.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 210.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 211.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 213.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 214.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по

меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 218.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 219.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 274.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 275.

В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 276.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 274, 275 или 276.

В определенных вариантах осуществления CAR содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий

домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 18.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 19.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 20.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 21.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 22.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей

мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 23.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 25.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по

меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 27.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 203.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 204.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 204.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 205.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 205.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 206.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий

домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 206.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 207.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 208.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 208.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 209.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 209.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 210.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 211.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей

мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 212.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 212.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 213.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 214.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 214.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по

меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 215.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 215.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 216.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 217.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 217.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 218.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 218.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 219.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 220.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий

домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 220.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 221.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 221.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 274.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 275.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

Настоящее изобретение относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 276.

Настоящее изобретение также относится к CAR, содержащему внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, трансмембранный домен и домен внутриклеточной передачи сигнала, где внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки (таких как, например, CD28 или индуцибельный Т-клеточный костимулятор (ICOS)) и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 163. В некоторых вариантах осуществления компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163.

В некоторых вариантах осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164. В некоторых вариантах

осуществления компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 165. В некоторых вариантах осуществления домен внутриклеточной передачи сигнала содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 165.

SEQ ID NO: 165.

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQ GQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAE AYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM). В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность под **SEQ ID NO: 162.** (IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC; **SEQ ID NO: 162**).

В некоторых вариантах осуществления полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98 или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранную(ые) область(и) α-, β- или ζ-цепи рецептора Т-клеток, CD28, CD3 эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD8α, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD40, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. В некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен содержит по меньшей мере трансмембранный домен ζ, η или FcεR1γ и -β, MB1 (Igα.), B29 или CD3-γ, -ζ или -η. В

некоторых вариантах осуществления трансмембранный домен является синтетическим, например содержащим преимущественно гидрофобные остатки, такие как лейцин и валин, триплет фенилаланина или триптофан.

В некоторых вариантах осуществления CAR дополнительно содержит шарнирную область, соединяющую трансмембранный домен с внеклеточным антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область представляет собой CD8a-шарнирную область. В некоторых вариантах осуществления CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO**: 157** (TSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD; SEQ ID NO: 157).

В некоторых вариантах осуществления CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична аминокислотной последовательности под **SEQ ID NO: 157**. В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит аминокислотную последовательность EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 158) или содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью аминокислотной последовательности с EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 158). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 159) или содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ERKCCVECPPCP (SEQ ID NO: 159). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ELKTPLGDTTHTCPRCP$(EPKSCDTPPPCPRCP)_3$, (SEQ ID NO: 160) или содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере

65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$ (SEQ ID NO: 160). В некоторых вариантах осуществления шарнирная область содержит последовательность ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 161) или содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ESKYGPPCPSCP (SEQ ID NO: 161).

Конструкции CAR и иммунореактивные клетки, экспрессирующие CAR

Настоящее изобретение также относится к выделенным полинуклеотидам, кодирующим CAR, описанные в данном документе.

Если не указано иное, то фраза "полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность" включает все полинуклеотидные последовательности, которые являются вырожденными версиями друг друга и которые кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность. Фраза "полинуклеотид, который кодирует белок или РНК" может также включать интроны в той мере, в какой полинуклеотид, кодирующий белок, может в некоторых вариантах содержать интрон(ы), который(ые) встраивается(ются) в экспрессируемый белок.

Настоящее изобретение также относится к вектору экспрессии, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CAR по настоящему изобретению.

Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, включающему рекомбинантный полинуклеотид, содержащий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, подлежащей экспрессии. Вектор экспрессии содержит достаточное количество действующих в цис-положении элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть обеспечены клеткой-хозяином или в системе экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все известные в уровне техники, в том числе космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

Настоящее изобретение также относится к выделенным иммунореактивным клеткам, содержащим CAR по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка трансдуцирована CAR, например CAR конститутивно экспрессируется на поверхности иммунореактивной клетки. В определенных вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка дополнительно трансдуцирована по меньшей мере одним костимуляторным лигандом таким образом, что иммунореактивная клетка экспрессирует по меньшей мере один костимуляторный лиганд. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один костимуляторный лиганд выбран из группы, состоящей из 4-1BBL, CD48, CD70, CD80, CD86, OX40L, TNFRSF14 и их комбинаций. В определенных вариантах осуществления выделенную иммунореактивную клетку дополнительно трансдуцируют по меньшей мере одним цитокином таким образом, что иммунореактивная клетка секретирует по меньшей мере один цитокин. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере цитокин выбран из группы, состоящей из IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, IL-12, IL-15, IL-17, IL-21 и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка выбрана из группы, состоящей из Т-лимфоцита (Т-клетки), естественной киллерной (NK) клетки, цитотоксического Т-лимфоцита (CTL), регуляторной Т-клетки (Treg), эмбриональной стволовой клетки человека, лимфоидной клетки-предшественницы, клетки-предшественницы Т-клетки и плюрипотентной стволовой клетки, из которой могут дифференцироваться лимфоидные клетки.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой Т-клетку.

Для целей данного документа Т-клеткой может быть любая Т-клетка, такая как культивируемая Т-клетка, например первичная Т-клетка или Т-клетка из культивируемой Т-клеточной линии, например Jurkat, SupT1 и т. д., или Т-клетка, полученная от млекопитающего. Если получена от млекопитающего, то Т-клетка может быть получена из многочисленных источников, включая без ограничения костный мозг, кровь, лимфатический узел, тимус или другие ткани или жидкости. Т-клетки также могут быть обогащены или очищены. Т-клетка может быть человеческой Т-клеткой. Т-клетка может быть Т-клеткой, выделенной из человека. Т-клетка может быть любым типом Т-клетки и может быть любой стадии развития, включая без ограничения $CD4^+/CD8^+$ дважды положительные Т-клетки, $CD8^+$ Т-клетки (например, цитотоксические Т-клетки), $CD4^+$ хелперные Т-клетки, например Th1 и Th2 клетки,

мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), лейкоциты периферической крови (PBL), инфильтрирующие опухоль клетки, Т-клетки памяти, наивные Т-клетки и т. п. Т-клетка может быть $CD8^+$ Т-клеткой или $CD4^+$ Т-клеткой.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой NK-клетку.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой CTL.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой Treg.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой эмбриональную стволовую клетку человека.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой лимфоидную клетку-предшественницу.

В некоторых вариантах осуществления выделенная иммунореактивная клетка представляет собой плюрипотентную стволовую клетку.

В одном варианте осуществления Т-клетки с CAR по настоящему изобретению могут быть созданы путем введения в клетки лентивирусного вектора, включающего необходимый CAR, например CAR, включающий внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, CD8α-шарнирный и трансмембранный домен, а также человеческие домены передачи сигнала 4-1BB и CD3-дзета. Т-Клетки с CAR по настоящему изобретению способны реплицироваться *in vivo*, что приводит к длительной персистенции, которая может привести к устойчивому контролю опухоли.

Варианты осуществления настоящего изобретения также представляют клетки-хозяева, содержащие любой из рекомбинантных векторов экспрессии, описанных в данном документе. Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к любому типу клеток, которые могут содержать рекомбинантный вектор экспрессии. Клетка-хозяин может быть эукариотической клеткой, например клеткой растения, животного или водоросли, гриба, или может быть прокариотической клеткой, например бактериальной клеткой или клеткой простейшего. Клетка-хозяин может быть культивированной клеткой или первичной клеткой, т. е. выделенной непосредственно из организма, например человека. Клетка-хозяин может быть адгезивной клеткой или суспензионной клеткой, т. е. клеткой, растущей в суспензии. Подходящие клетки-хозяева известны в уровне техники и включают, например,

клетки DH5α *E.coli*, клетки яичника китайского хомячка, клетки VERO обезьяны, клетки COS, клетки HEK293 и т. п. Для целей амплификации или репликации рекомбинантного вектора экспрессии клетка-хозяин может быть прокариотической клеткой, например клеткой DH5α. Для целей получения рекомбинантного CAR, полипептида или белка клетка-хозяин может быть клеткой млекопитающего. Клетка-хозяин может быть клеткой человека. Хотя клетка-хозяин может принадлежать любому типу клеток, может происходить из любого типа ткани и может находиться на любой стадии развития, клетка-хозяин может быть лимфоцитом периферической крови (PBL). Клетка-хозяин может быть Т-клеткой.

Также представлена популяция клеток, содержащая по меньшей мере одну клетку-хозяина, описанную в данном документе. Популяция клеток может быть гетерогенной популяцией, содержащей клетку-хозяина, содержащую любой из описанных рекомбинантных векторов экспрессии, в дополнение к по меньшей мере одной другой клетке, например клетке-хозяину (например, Т-клетке), которая не включает ни один из рекомбинантных векторов экспрессии, или клетке, отличной от Т-клетки, например В-клетке, макрофагу, эритроциту, нейтрофилу, гепатоциту, эндотелиальной клеткае, эпителиальной клетке, мышечной клетке, клетке мозга и т. д. В качестве альтернативы, популяция клеток может быть по сути однородной популяцией, при этом популяция содержит в основном клетки-хозяева, (например, состоящие по сути из) включающие рекомбинантный вектор экспрессии. Популяция также может быть клональной популяцией клеток, в которой все клетки популяции являются клонами одной клетки-хозяина, содержащей рекомбинантный вектор экспрессии, так что все клетки популяции содержат рекомбинантный вектор экспрессии. В одном варианте осуществления популяция клеток представляет собой клональную популяцию, содержащую клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный вектор экспрессии, который описан в данном документе.

Полинуклеотиды, клетки-хозяева и векторы

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему любой из связывающих CD33 белков по настоящему изобретению. Связывающий CD33 белок включает антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, белки, содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, мультиспецифические белки, которые содержат антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, и химерные антигенные рецепторы (CAR), содержащие антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему любой из связывающих CD33 белков или их фрагментов.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382.

В определенных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 53.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 56.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 59.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 262.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 263.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 264.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87,88, 271, 272, 273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В определенных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VL под SEQ ID NO: 82.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VL под SEQ ID NO: 85.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VL под SEQ ID NO: 87.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VL под SEQ ID NO: 271.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VL под SEQ ID NO: 272.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VL под SEQ ID NO: 273.Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему VH под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382 и a VL of SEQ ID NOs: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272, 273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;
k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или
m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах

осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220 221, 274, 275 или 276. Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 18.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 19.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 20.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 21.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 22.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 23.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 25.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 26.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 27.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 203.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 204.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 205.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 206.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 207.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 208.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 209.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 210.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 211.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 212.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 213.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 214.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 215.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 216.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 217.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 218.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 219.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 220.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 221.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 274.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 275.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид под SEQ ID NO: 276.

В определенных вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид под SEQ ID NO: 213. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид под SEQ ID NO: 216. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид под SEQ ID NO: 219. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид под SEQ ID NO: 274. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид под SEQ ID NO: 275. В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид кодирует полипептид под SEQ ID NO: 276.

Настоящее изобретение также относится к выделенному или очищенному полинуклеотиду, который кодирует любой из CAR по настоящему изобретению или его функциональные части или функциональные варианты.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 274, 275 или 276.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 204.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 205.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 206.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 208.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 209.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 212.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 214.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 215.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 217.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 218.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 220.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 221.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения также предоставлена выделенная или очищенная нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотид, который комплементарен полинуклеотидам, кодирующим связывающие CD33 белки по настоящему изобретению, или полинуклеотидам,

которые гибридизируются в жестких условиях с полинуклеотидами, кодирующими связывающие CD33 белки по настоящему изобретению.

Полинуклеотиды, которые гибридизируются в жестких условиях, могут гибридизироваться в условиях высокой жесткости. Под "условиями высокой жесткости" подразумевается, что полинуклеотид специфически гибридизуется с целевой последовательностью (нуклеотидной последовательностью любой из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе) в количестве, которое выявляется сильнее, чем неспецифическая гибридизация. Условия высокой жесткости включают условия, которые позволяют отличить полинуклеотид с точной комплементарной последовательностью или полинуклеотид, содержащий только несколько разрозненных ошибочных спариваний от случайной последовательности, в которой оказалось несколько небольших областей (например, 3-12 оснований), совпадающих с нуклеотидной последовательностью. Такие небольшие области комплементарности плавятся легче, чем полноразмерная комплементарная последовательность из 14-17 или более оснований, а гибридизация высокой жесткости делает их легко различимыми. Условия относительно высокой жесткости могут включать, например, условия с низким содержанием соли и/или высокой температурой, такие как обеспечиваемые приблизительно 0,02-0,1 M NaCl или эквивалента, при температурах приблизительно 50-70°C. Такие условия высокой жесткости допускают незначительное количество, если вообще имеется, ошибочных спариваний между нуклеотидной последовательностью и матричной или целевой нитью, и особенно подходят для выявления экспрессии любого из CAR, описанных в данном документе. Обычно считается, что условия можно сделать более жесткими путем добавления увеличивающихся количеств формамида.

Полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению могут быть функционально связаны с одним или несколькими регуляторными элементами, такими как промотор или энхансер, которые обеспечивают экспрессию нуклеотидной последовательности в предполагаемой клетке-хозяине. Полинуклеотид может представлять собой cDNA. Промотор может быть сильным, слабым, тканеспецифическим, индуцибельным или специфическим в отношении стадии развития промотором. Иллюстративными промоторами, которые могут быть использованы, являются гипоксантинфосфорибозилтрансфераза (HPRT), аденозиндезаминаза, пируваткиназа, бета-актин, миозин человека, гемоглобин человека, креатин мышц человека и другие. Кроме того, многие вирусные промоторы

функционируют конститутивно в эукариотических клетках и подходят для применения в описанных вариантах осуществления. Такие вирусные промоторы включают немедленный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), ранний и поздний промоторы SV40, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), длинные терминальные повторы (LTR) вируса лейкоза Малони, вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса Эпштейна-Барра (EBV), вируса саркомы Рауса (RSV) и других ретровирусов, а также промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Также могут быть использованы индуцибельные промоторы, такие как промотор металлотионеина, тетрациклин-индуцибельный промотор, доксициклин-индуцибельный промотор, промоторы, содержащие один или несколько элементов интерферон-стимулированного ответа (ISRE), такие как протеинкиназа R, 2',5'-олигоаденилатсинтетазы, гены Mx, ADAR1 и т. п.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему полинуклеотид по настоящему изобретению. Настоящее изобретение также относится к вектору экспрессии, содержащему полинуклеотид по настоящему изобретению. Такие векторы могут быть плазмидными векторами, вирусными векторами, векторами для экспрессии бакуловируса, векторами на основе транспозонов или любыми другими векторами, подходящими для введения синтетического полинуклеотида по настоящему изобретению в данный организм или генетический фон любыми способами. Полинуклеотиды, кодирующие связывающие CD33 белки по настоящему изобретению, могут быть функционально связаны с регуляторными последовательностями в векторе(ах) экспрессии, который(е) обеспечивает(ют) экспрессию связывающих CD33 белков. Такие регуляторные элементы могут включать транскрипционный промотор, последовательности, кодирующие подходящие сайты связывания рибосомы mRNA, и последовательности, которые контролируют терминацию транскрипции и трансляции. Векторы экспрессии могут также включать один или несколько нетранскрибируемых элементов, таких как точка начала репликации, подходящие промотор и энхансер, связанные с геном, подлежащим экспрессии, другие 5'- или 3'-фланкирующие нетранскрибируемые последовательности, 5'- или 3'-нетранслируемые последовательности (как, например, необходимые сайты связывания рибосомы), сайт полиаденилирования, сайты донора и акцептора сплайсинга или последовательности терминации транскрипции. Также может быть включена точка начала репликации, которая придает способность реплицироваться в хозяине.

Векторы экспрессии могут включать межнуклеотидные связи, встречающиеся в природе или не встречающиеся в природе, или оба типа связей. Не встречающиеся в природе или измененные нуклеотиды или межнуклеотидные связи не препятствуют транскрипции или репликации вектора.

После включения вектора в соответствующего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии связывающих CD33 белков по настоящему изобретению, кодируемых включенными полинуклеотидами. Транскрипционные и трансляционные контрольные последовательности в векторах экспрессии, используемых для трансформации клеток позвоночных, могут быть получены из вирусных источников. Иллюстративные векторы могут быть сконструированы, как описано у Okayama and Berg, 3 *Mol. Cell. Biol.* 280 (1983).

Векторы по настоящему изобретению могут также содержать один или несколько сайтов внутренней посадки рибосомы (IRES). Включение последовательности IRES в слитые векторы может быть полезным для усиления экспрессии некоторых белков. В некоторых вариантах осуществления векторная система будет включать один или несколько сайтов полиаденилирования (например, SV40), которые могут находиться выше или ниже любой из вышеупомянутых последовательностей нуклеиновых кислот. Компоненты вектора могут быть смежно связаны или расположены таким образом, чтобы обеспечить оптимальное расстояние для экспрессии генных продуктов (т. е. путем введения "спейсерных" нуклеотидов между ORF), или расположены другим образом. Регуляторные элементы, такие как мотив IRES, также могут быть расположены таким образом, чтобы обеспечить оптимальное расстояние для экспрессии.

Векторы по настоящему изобретению могут быть кольцевыми или линейными. Они могут быть получены таким образом, чтобы содержать систему репликации, функционирующую в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Системы репликации могут быть получены, например, из ColE1, SV40, плазмиды 2μ, λ, вируса папилломы крупного рогатого скота и т. п.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут быть предназначены для временной экспрессии, для стабильной экспрессии или для обеих. Также рекомбинантные векторы экспрессии могут быть созданы для конститутивной экспрессии или для индуцибельной экспрессии.

Кроме того, рекомбинантные векторы экспрессии могут включать ген "самоубийства". Используемый в данном документе термин "ген самоубийства"

относится к гену, который вызывает гибель клетки, экспрессирующей ген "самоубийства". Ген "самоубийства" может быть геном, который придает чувствительность к средству, например лекарственному средству, клетке, в которой экспрессируется ген, и вызывает гибель клетки при контакте клетки со средством или при воздействии средства. Гены "самоубийства" известны в уровне техники и включают, например, ген тимидинкиназы (ТК) вируса простого герпеса (HSV), цитозиндезаминазы, фосфорилазы пуриновых нуклеозидов и нитроредуктазы.

Векторы могут также включать маркеры отбора, которые хорошо известны в уровне техники. Маркеры отбора включают маркеры положительного и отрицательного отбора. Маркерные гены включают устойчивость к биоцидам, например устойчивость к антибиотикам, тяжелым металлам и т. д., комплементацию в ауксотрофном хозяине для обеспечения прототрофии и т. п. Иллюстративные маркерные гены включают гены устойчивости к антибиотикам (например, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к гигромицину, ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к тетрациклину, ген устойчивости к пенициллину, ген устойчивости к гистидинолу, ген устойчивости к гистидинолу x), гены глутаминсинтазы, HSV-TK, производные HSV-TK для отбора по ганцикловиру или ген бактериальной пуриновой нуклеозидфосфорилазы для отбора по 6-метилпурину (Gadi et al., 7 *Gene Ther*. 1738-1743 (2000)). Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая маркер отбора или сайт клонирования, может находиться выше или ниже последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес полипептид или сайт клонирования.

Иллюстративными векторами, которые могут быть использованы, являются бактериальные: pB, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pB KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, Ла-Хойя, штат Калифорния, США); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540 и pRIT5 (Pharmacia, Уппсала, Швеция); эукариотические: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL (Pharmacia), pEE6.4 (Lonza) и pEE12.4 (Lonza). Дополнительные векторы включают серию pUC (Fermentas Life Sciences, Глен Берни, штат Мэриленд, США), серию pBluescript (Stratagene, Ла-Хойя, штат Калифорния, США), серию pET (Novagen, Мэдисон, штат Висконсин, США), серию pGEX (Pharmacia Biotech, Уппсала, Швеция) и серию pEX (Clontech, Пало Альто, штат Калифорния, США). Можно использовать векторы бактериофагов, такие как λGT10, λGT11, λEMBL4 и λNM1149, λZapII (Stratagene). Иллюстративные растительные векторы экспрессии включают pBI01, pBI01.2, pBI121,

pBI101.3 и pBIN19 (Clontech). Иллюстративные векторы экспрессии животных включают pEUK-Cl, pMAM и pMAMneo (Clontech). Вектор экспрессии может быть вирусным вектором, например ретровирусным вектором, например гамма-ретровирусным вектором.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382.

В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 53. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 56. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 59. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 262. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 263. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 264.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272, 273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 85. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 271. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 272. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 271, 272, 273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий выделенный полинуклеотид, кодирующий

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;
k) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
l) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272;
m) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH

под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. В других вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий выделенный полинуклеотид, кодирующий

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 274, 275 или 276.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 208.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 210.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 211.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 213.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 214.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 218.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 219.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 274.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 275.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий полипептид под SEQ ID NO: 276.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий любой из CAR по настоящему изобретению или его функциональные части или функциональные варианты.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 274, 275 или 276.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 19.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 25.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 27.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 203.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 204.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 205.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 206.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 207.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 208.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 209.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 210.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 211.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 212.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 214.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 215.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 216.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 217.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 218.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 219.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 220.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 221.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 274.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 275.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит полинуклеотид, кодирующий CAR, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 276.

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей один или несколько векторов по настоящему изобретению. "Клетка-хозяин" относится к клетке, в которую был введен вектор. Подразумевается, что термин "клетка-хозяин" относится не только к конкретной клетке-субъекту, но и к потомству такой клетки, а также к стабильной клеточной линии, полученной из конкретной клетки-субъекта. Поскольку вследствие мутации либо влияний окружающей среды в последующих поколениях могут происходить определенные модификации, то такое потомство может не быть идентичным исходной клетке, но все еще быть включенным в объем термина "хозяин", используемого в данном документе. Такие клетки-хозяева могут быть эукариотическими клетками, прокариотическими клетками, клетками растений или архей. *Escherichia coli*, бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как Salmonella, Serratia и различные виды Pseudomonas, являются примерами прокариотических клеток-хозяев. Другие микробы, такие как дрожжи, также

применимы для экспрессии. Saccharomyces (например, S. cerevisiae) и Pichia являются примерами подходящих клеток-хозяев дрожжей. Иллюстративные эукариотические клетки могут происходить от млекопитающих, насекомых, птиц или других животных. Эукариотические клетки млекопитающих включают иммортализованные клеточные линии, такие как гибридомы или линии клеток миеломы, такие как линии мышиных клеток SP2/0 (Американская коллекция типовых культур (ATCC), Манассас, штат Вирджиния, США, CRL-1581), NS0 (Европейская коллекция клеточных культур (ECACC), Солсбери, Уилтшир, Великобритания, ECACC № 85110503), FO (ATCC CRL-1646) и Ag653 (ATCC CRL-1580). Иллюстративной клеточной линией миеломы человека является U266 (ATTC CRL-TIB-196). Другие применимые клеточные линии включают линии, полученные из клеток яичника китайского хомячка (CHO), такие как CHO-K1SV (Lonza Biologics, Уолкерсвилл, штат Мэриленд, США), CHO-K1 (ATCC CRL-61) или DG44.

Настоящее изобретение также относится к способу получения связывающего CD33 белка по настоящему изобретению, включающему культивирование клетки-хозяина по настоящему изобретению в условиях экспрессии связывающего K2 белка и извлечения связывающего CD33 белка, продуцируемого клеткой-хозяином. Известны способы получения белков и их очистки. После синтеза (химического или рекомбинантного) связывающие CD33 белки могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами, включая осаждение сульфатом аммония, аффинные колонки, колоночную хроматографию, очистку высокоэффективной жидкостной хроматографией (HPLC), гель-электрофорез и т. п. (см. в целом Scopes, Protein Purification (Springer- Verlag, N.Y., (1982)). Белок-субъект может быть по сути чистым, например на по меньшей мере от приблизительно 80% до 85% чистым, по меньшей мере от приблизительно 85% до 90% чистым, по меньшей мере от приблизительно 90% до 95% чистым или по меньшей мере от приблизительно 98% до 99% или более чистым, например свободным от загрязняющих веществ, таких как остатки клеток, макромолекулы и т. д., отличные от белка-субъекта.

Полинуклеотиды, кодирующие связывающие CD33 белки по настоящему изобретению, могут быть включены в векторы с использованием стандартных способов молекулярной биологии. Трансформацию клеток-хозяев, культивирование, экспрессию и очистку антител проводят с использованием хорошо известных способов.

Соответственно, настоящее изобретение относится к способу получения полипептида, включающему экспрессию нуклеотида по настоящему изобретению, который кодирует полипептид по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82.

В определенных вариантах осуществления данного способа полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 53, и полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 56, и полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 85. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 59, и полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 262, и полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 271. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 263, и полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 272. В других вариантах осуществления полинуклеотид кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 264, и полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 273.

Если полипептид образуется из отдельных цепей, которые кодируются разными нуклеиновыми кислотами, то настоящее изобретение относится к способу получения полипептида, включающему экспрессию нуклеотидов по настоящему изобретению, которые кодируют полипептид по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления первый полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 53, и второй полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления первый полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 56, и второй полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 85. В

других вариантах осуществления первый полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 59, и второй полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления первый полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 262, и второй полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 271. В других вариантах осуществления первый полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 263, и второй полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 272. В других вариантах осуществления первый полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VH под SEQ ID NO: 264, и второй полинуклеотид по настоящему изобретению кодирует полипептид, содержащий VL под SEQ ID NO: 273.

Модифицированные нуклеотиды могут быть использованы для получения полинуклеотидов по настоящему изобретению. Иллюстративными модифицированными нуклеотидами являются 5-фторурацил, 5-бромурацил, 5-хлорурацил, 5-йодурацил, гипоксантин, ксантин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, карбоксиметиламинометил-2-тиоуридин, 5-карбоксиметиламинометилурацил, дигидроурацил, N^6-замещенный аденин, 7-метилгуанин, 5-метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилкеозин, 5″-метоксикарбоксиметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N^6-изопентениладенин, урацил-5-оксиуксусная кислота (v), вибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, бета-D-галактозилкеозин, инозин, N^6-изопентениладенин, 1-метилгуанин, 1-метилинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, 3-(3-амино-3-N-2-карбоксипропил)урацил и 2,6-диаминопурин.

Фармацевтические композиции/введение

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей связывающий CD33 белок по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифический белок, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей CAR, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Для терапевтического применения, связывающий CD33 белок по настоящему изобретению можно получать в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество антитела в качестве активного ингредиента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адъюванту, вспомогательному средству или среде-носителю, с которыми вводят антитело по настоящему изобретению. Такие среды-носители могут представлять собой жидкости, такие как вода и масла, включая масла, полученные из нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т. п. Например, можно использовать 0,4% солевой раствор и 0,3% глицин. Эти растворы являются стерильными и, как правило, не содержат твердых частиц. Они могут быть стерилизованы с помощью обычных, хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, которые необходимы для приблизительного соответствия физиологическим условиям, как, например, для доведения pH и буферные средства, стабилизирующие, загущающие, смазывающие и красящие средства и т. д. Концентрация антител по настоящему изобретению в таком фармацевтическом составе может варьировать от менее чем приблизительно 0,5%, обычно от по меньшей мере приблизительно 1% вплоть до 15 или 20% по весу, и при этом она будет выбрана, в первую очередь, исходя из требуемой дозы, объемов жидкости, вязкостей и т. д., в зависимости от конкретного выбранного способа введения. Подходящие среды-носители и составы, включающие другие человеческие белки, например сывороточный альбумин человека, описаны, например, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D.B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA

2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, особенно см. стр. 958-989.

Способ введения связывающего CD33 белка по настоящему изобретению может быть любым подходящим путем, таким как парентеральное введение, например внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное или подкожное, трансмукозальное (пероральное, интраназальное, интравагинальное, ректальное), или другими способами, известными специалисту и хорошо известными в уровне техники.

Связывающий CD33 белок по настоящему изобретению также может быть введен профилактически для снижения риска развития такого заболевания, как рак.

Таким образом, фармацевтическую композицию по настоящему изобретению для внутримышечной инъекции можно получать с содержанием 1 мл стерильной забуференной воды и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг/кг, например от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг/кг, или более предпочтительно от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг/кг, связывающего CD33 белка по настоящему изобретению.

В вариантах осуществления настоящего изобретения экспрессирующие CAR клетки могут быть обеспечены в композициях, например в подходящей(их) фармацевтической(их) композиции(иях), содержащей(их) экспрессирующие CAR клетки и фармацевтически приемлемый носитель. В одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим эффективное количество лимфоцита, экспрессирующего один или несколько описанных CAR, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут включать экспрессирующую CAR клетку, например множество экспрессирующих CAR клеток, которые описаны в данном документе, в комбинации с одним или несколькими фармацевтически или физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или разбавителями. Фармацевтически приемлемый носитель может быть ингредиентом фармацевтической композиции, отличным от активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта.

Фармацевтически приемлемый носитель может включать буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант. Примерами фармацевтически приемлемых носителей являются растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и задерживающие всасывание средства и т. п., которые являются физиологически совместимыми, такими как соли, буферы, антиоксиданты, сахариды, водные или

неводные носители, консерванты, смачивающие средства, поверхностно-активные вещества или эмульгаторы или их комбинации. Количества фармацевтически приемлемого(ых) носителя(ей) в фармацевтических композициях можно определять экспериментально на основании видов активности носителя(ей) и требуемых характеристик состава, таких как стабильность и/или минимальное окисление.

Фармацевтические композиции могут включать буферы, такие как уксусная кислота, лимонная кислота, муравьиная кислота, янтарная кислота, фосфорная кислота, угольная кислота, яблочная кислота, аспарагиновая кислота, гистидин, борная кислота, Tris-буферы, HEPPSO, HEPES, нейтральный забуференный солевой раствор, забуференный фосфатом солевой раствор и т. п.; углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза или декстраны, маннит; белки; полипептиды или аминокислоты, такие как глицин; антиоксиданты; хелатирующие средства, такие как EDTA или глутатион; адъюванты (например, гидроксид алюминия); антибактериальные и противогрибковые средства и консерванты.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены для различных способов парентерального или непарентерального введения. В одном варианте осуществления композиции могут быть составлены для инфузии или внутривенного введения. Фармацевтические композиции, раскрытые в данном документе, могут быть представлены, например, в виде стерильных жидких препаратов, например изотонических водных растворов, эмульсий, суспензий, дисперсий или вязких композиций, которые могут быть забуферены до необходимого pH. Составы, пригодные для перорального введения, могут включать жидкие растворы, капсулы, саше, таблетки, пастилки и троше, порошки, жидкие суспензии в соответствующей жидкости и эмульсии.

Термин "фармацевтически приемлемый", используемый в настоящем документе в отношении фармацевтических композиций, означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или включенный в Фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею для применения животным и/или людям.

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, по настоящему изобретению

субъекту, нуждающемуся в этом, в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающего введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

В определенных вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка (например, биспецифического белка), содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению и второй антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33. В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, и необязательно второй связывающий домен, который связывает TRGV9, представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка (например, биспецифического белка), содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, и необязательно второй связывающий домен, который связывает TRGV9, представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка (например, биспецифического белка), содержащего первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276. В определенных таких вариантах осуществления второй связывающий домен, который связывает TRGV9, представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающего введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33. В определенных таких вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит мультиспецифический белок (например, биспецифический белок), содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению и второй антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9. В некоторых таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, и необязательно второй связывающий домен, который связывает TRGV9, представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифический белок (например, биспецифический белок), где мультиспецифический белок содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных таких вариантах осуществления первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, и необязательно второй связывающий домен, который связывает TRGV9, представляет собой VHH.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей мультиспецифический белок (например, биспецифический белок), где мультиспецифический белок содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276. В определенных таких вариантах осуществления второй связывающий домен, который связывает TRGV9, представляет собой VHH.

Настоящее изобретение также относится к способу введения генетически модифицированной Т-клетки, экспрессирующей CAR, для лечения субъекта, имеющего рак или подверженного риску заболевания раком, с использованием инфузии лимфоцитов.

По меньшей мере в одном варианте осуществления для лечения применяют инфузию аутологичных лимфоцитов. Аутологичные PBMC собирают у субъекта, нуждающегося в лечении, и Т-клетки активируют и размножают с использованием

способов, описанных в данном документе и известных в уровне техники, а затем вводят обратно субъекту.

В одном аспекте настоящее изобретение в целом относится к лечению субъекта, подверженного риску развития рака. Настоящее изобретение также включает лечение злокачественной опухоли или аутоиммунного заболевания, при котором химиотерапия и/или иммунотерапия приводит к значительной иммуносупрессии у субъекта, тем самым повышая риск развития рака у субъекта.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающему введение антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающему введение белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающему введение мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающему введение иммуноконъюгата по настоящему изобретению субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающему введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения не являющегося раковым состояния у субъекта, подверженного риску развития ракового состояния, включающему введение CAR по настоящему изобретению субъекту для лечения не являющегося раковым состояния.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества любого антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для предупреждения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества белка, содержащего любой антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для предупреждения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающего введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению, субъекту в течение времени, достаточного для предупреждения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для предупреждения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для предупреждения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу предупреждения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей любой антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для предупреждения рака с экспрессией CD33.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, включающему введение любого антигенсвязывающего домена, который связывает CD33, по настоящему

изобретению субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, включающему введение белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, включающему введение мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 раковых клеток у субъекта, включающему введение CAR, который содержит любой антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, включающему введение иммуноконъюгата по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток.

Настоящее изобретение также относится к способу снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, включающему введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению субъекту в течение времени, достаточного для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток.

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак.

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой лимфому.

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой множественную миелому.

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой миелодиспластический синдром (MDS).

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой острый лимфоцитарный лейкоз (ALL).

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL).

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой хронический миелоидный лейкоз (CML).

В некоторых вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой бластное плазмацитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

В определенных вариантах осуществления рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

В некоторых вариантах осуществления рак является рецидивным, рефрактерным, злокачественным или любой их комбинацией.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения гематологического рака (например, лейкоза (в частности, AML), лимфомы или множественной миеломы) у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, субъекту в течение времени, достаточного для лечения гематологического рака, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87;
VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88;
VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272; или

VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения гематологического рака (например, лейкоза (в частности, AML), лимфомы или множественной миеломы) у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, субъекту в течение времени, достаточного для лечения гематологического рака, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения гематологического рака (например, лейкоза (в частности, AML), лимфомы или множественной миеломы) у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который

связывает CD33, субъекту в течение времени, достаточного для лечения гематологического рака, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

VH под SEQ ID NO: 18;
VH под SEQ ID NO: 19;
VH под SEQ ID NO: 20;
VH под SEQ ID NO: 21;
VH под SEQ ID NO: 22;
VH под SEQ ID NO: 23;
VH под SEQ ID NO: 24;
VH под SEQ ID NO: 25;
VH под SEQ ID NO: 26; или
VH под SEQ ID NO: 27.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения гематологического рака (например, лейкоза (в частности, AML), лимфомы или множественной миеломы) у субъекта, включающему введение терапевтически эффективного количества мультиспецифического белка, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, субъекту в течение времени, достаточного для лечения гематологического рака, где антигенсвязывающий домен, которые связывают CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 274, 275 или 276.

В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам предупреждения рака, при этом способы включают введение количества лимфоцита, экспрессирующего один или несколько из описанных CAR, субъекту, нуждающемуся в этом.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения субъекта, имеющего рак, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцита, экспрессирующего один или несколько из описанных CAR, субъекту, нуждающемуся в этом, с индуцированием или модулированием при этом лимфоцитом уничтожения раковых клеток у субъекта.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам снижения опухолевой нагрузки у субъекта, имеющего рак, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцита, экспрессирующего один или несколько из описанных CAR, субъекту, нуждающемуся в этом, с индуцирование при этом лимфоцитом уничтожения гематологических раковых клеток у субъекта. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам повышения выживаемости субъекта, имеющего рак, при этом способы включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцита, экспрессирующего один или несколько из описанных CAR, субъекту, нуждающемуся в этом, с продлением тем самым срока выживаемости субъекта. В целом, лимфоциты, экспрессирующие CAR, индуцируют уничтожение гематологических раковых клеток у субъекта и приводят к уменьшению или уничтожению гематологических опухолей/раковых клеток у субъекта. Неограничивающий перечень гематологических раковых заболеваний, включая метастатические поражения, которые могут быть мишенью, включает лейкоз, лимфому, множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

В одном аспекте представлены способы лечения субъекта, имеющего рак, которые включают введение терапевтически эффективного количества лимфоцита, экспрессирующего CAR, имеющий внеклеточный антигенсвязывающий домен, который связывает антиген CD33, субъекту, нуждающемуся в этом, с индуцированием при этом лимфоцитом уничтожения раковых клеток у субъекта.

В одном аспекте раскрыт способ целевого уничтожения раковой клетки, при этом способ включает приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом, экспрессирующим один или несколько из описанных CAR, с индуцированием при этом лимфоцитом уничтожения раковой клетки. Неограничивающий перечень раковых клеток, включая гематологические раковые клетки, которые могут быть мишенью, включает клетки лейкоза, лимфомы, множественной миеломы. В некоторых вариантах осуществления гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL),

хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

Когда указано терапевтически эффективное количество, тогда точное количество CAR или CAR-T-клеток по настоящему изобретению, подлежащих введению, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния субъекта. В целом можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в данном документе, может быть введена при дозе от приблизительно 10^4 до приблизительно 10^{10} клеток/кг массы тела, в некоторых случаях от приблизительно 10^5 до приблизительно 10^6 клеток/кг массы тела, включая все целые значения в этих диапазонах. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая Т-клетки, описанные в данном документе, может быть введена при дозе, составляющей приблизительно 10^6 клеток/кг массы тела. Композиции Т-клеток также можно вводить многократно в таких дозах. Клетки можно вводить с использованием инфузионных методик, которые обычно известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988).

Системы доставки, пригодные в контексте CAR-T-клеток по настоящему изобретению, могут включать системы доставки высвобождением по времени, с замедленным высвобождением и пролонгированным высвобождением, так что доставка композиций Т-клеток происходит до и в течение времени, достаточного, чтобы вызвать сенсибилизацию участка, подлежащего лечению. Композиция может быть использована в сочетании с другими терапевтическими средствами или способами терапии. Такие системы позволяют избежать повторных введений композиции, тем самым повышая удобство для субъекта и врача, и могут быть особенно подходящими для определенных вариантов осуществления композиции по настоящему изобретению.

Многие типы систем доставки с высвобождением доступны и известны специалистам в данной области. Они включают полимерные базовые системы, такие как поли(лактид-гликолид), сополиоксалаты, сложные полиэфирамиды, сложные полиортоэфиры, поликапролактоны, полигидроксимасляная кислота и полиангидриды. Микрокапсулы из вышеперечисленных полимеров, содержащие лекарственные средства, описаны, например, в патенте США № 5075109. Системы доставки также включают неполимерные системы, которые представляют собой липиды, включая стерины, такие как холестерин, сложные эфиры холестерина и

жирные кислоты, или нейтральные жиры, такие как моно-, ди- и триглицериды; силастиковые системы; системы на основе пептидов; гидрогелевые системы высвобождения; восковые покрытия; прессованные таблетки с использованием традиционных связующих и вспомогательных веществ; частично слитые имплантаты и т. п. Конкретные примеры включают без ограничения: (a) эрозионные системы, в которых активная композиция содержится в форме внутри матрицы, например описанные в патентах США №№ 4452775, 4667014, 4748034 и 5239660, и (b) диффузионные системы, в которых активный компонент проникает с контролируемой скоростью из полимера, например описанные в патентах США №№ 3854480 и 3832253. Кроме того, могут использоваться аппаратные системы доставки на основе насосов, некоторые из которых приспособлены для имплантации.

В определенных аспектах может быть необходимым введение активированных Т-клеток субъекту, а затем последующий забор крови (или проведение афереза), активация Т-клеток по настоящему изобретению и повторное введение субъекту этих активированных и размноженных Т-клеток. Этот процесс может проводиться несколько раз каждые несколько недель. В определенных аспектах Т-клетки могут быть активированы при заборе крови объемом от 10 $см^3$ до 400 $см^3$. В определенных аспектах Т-клетки активируют при заборе крови объемом 20 $см^3$, 30 $см^3$, 40 $см^3$, 50 $см^3$, 60 $см^3$, 70 $см^3$, 80 $см^3$, 90 $см^3$ или 100 $см^3$.

Введение CAR-Т-клеток и композиций можно осуществлять любым способом, например путем парентерального или не парентерального введения, в том числе путем ингаляции аэрозоля, инъекции, инфузий, приема внутрь, переливания, имплантации или трансплантации. Например, CAR-Т-клетки и композиции, описанные в данном документе, могут быть введены пациенту трансартериально, внутрикожно, подкожно, интратуморально, интрамедуллярно, интранодально, внутримышечно, путем внутривенной (i.v.) инъекции или внутрибрюшинно. В одном аспекте композиции по настоящему изобретению вводят путем i.v. инъекции. В одном аспекте композиции по настоящему изобретению вводят субъекту путем внутрикожной или подкожной инъекции. Композиции Т-клеток могут быть инъецированы, например, непосредственно в опухоль, лимфатический узел, ткань, орган или участок инфекции.

Введение может быть аутологичным или неаутологичным. Например, иммунореактивные клетки, экспрессирующие CD33-специфический CAR, могут быть получены от одного субъекта и введены тому же субъекту или другому, совместимому субъекту. Полученные из периферической крови Т-клетки по настоящему

изобретению или размноженные Т-клетки (например, полученные *in vivo, ex vivo* или *in vitro*) можно вводить, например, путем внутривенной инъекции, локализованной инъекции, системной инъекции, катетерного введения или парентерального введения.

В конкретных вариантах осуществления субъектов можно подвергать лейкаферезу, при котором лейкоциты собирают, обогащают или истощают *ex vivo* для отбора и/или выделения представляющих интерес клеток, например Т-клеток. Эти изоляты Т-клеток могут быть размножены способами, известными в уровне техники, и обработаны таким образом, чтобы ввести одну или несколько конструкций CAR по настоящему изобретению с созданием тем самым CAR-Т-клеток. Субъекты, нуждающиеся в этом, могут впоследствии пройти стандартное лечение химиотерапией при высокой дозе с последующей трансплантацией стволовых клеток периферической крови. В определенных аспектах после трансплантации или одновременно с ней субъекты получают инфузию размноженных CAR-Т-клеток. В одном аспекте размноженные клетки вводят до или после хирургического вмешательства.

Доза, вводимая пациенту, имеющему злокачественную опухоль, достаточна для облегчения или по меньшей мере частичной остановки заболевания, подлежащего лечению ("терапевтически эффективное количество"). Доза вышеуказанных средств лечения для введения субъекту будет варьироваться в зависимости от точной природы состояния, подлежащего лечению, и от реципиента лечения. Масштабирование доз для введения человеку может быть выполнено в соответствии с общепринятой в данной области практикой.

Т-Клетки с CAR по настоящему изобретению можно подвергать экспансии Т-клеток *in vivo* и можно образовывать CD33-специфические клетки памяти, которые сохраняются на высоких уровнях в течение длительного времени в крови и костном мозге. В некоторых случаях Т-клетки с CAR по настоящему изобретению, вводимые инфузией субъекту, могут уничтожать раковые клетки, например гематологические раковые клетки, *in vivo* у субъектов с запущенным раком, устойчивым к химиотерапии.

В одном варианте осуществления CAR по настоящему изобретению вводят в Т-клетки, например с применением *in vitro* транскрипции, и субъект (например, человек) получает начальное введение CAR-Т-клеток по настоящему изобретению и одно или несколько последующих введений CAR-Т-клеток, где одно или несколько последующих введений вводят менее чем через 15 дней, например 14, 13, 12, 11, 10, 9,

8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 дня, после предыдущего введения. В одном варианте осуществления субъекту (например, человеку) вводят более одного введения CAR-T-клеток в неделю, например 2, 3 или 4 введения CAR-T-клеток в неделю. В одном варианте осуществления субъект получает более одного введения CAR-T-клеток в неделю (например, 2, 3 или 4 введения в неделю) (также упоминается в данном документе как цикл), после чего следует неделя без введений CAR-T-клеток, а затем субъекту вводят одно или несколько дополнительных введений CAR-T-клеток (например, более одного введения CAR-T-клеток в неделю). В другом варианте осуществления субъект получает более одного цикла CAR-T-клеток, и время между каждым циклом составляет менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 или 3 дней. В одном варианте осуществления CAR-T-клетки вводят через день по 3 введения в неделю. В одном варианте осуществления CAR-T-клетки вводят в течение по меньшей мере двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми или более недель.

В одном варианте осуществления введение можно повторять через один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одну неделю, две недели, три недели, один месяц, пять недель, шесть недель, семь недель, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев и более. Возможны повторные курсы лечения, а также постоянное введение. Повторное введение может осуществляться при той же дозе или при другой дозе.

CAR-T-Клетки можно вводить в способах по настоящему изобретению посредством поддерживающей терапии, такой как, например, один раз в неделю на протяжении периода 6 месяцев или больше.

В одном варианте осуществления CAR-T-клетки создают с использованием лентивирусных вирусных векторов, таких как лентивирус. CAR-T-Клетки, созданные с помощью таких вирусных векторов, обычно характеризуются стабильной экспрессией CAR.

В одном варианте осуществления CAR-T-клетки временно экспрессируют векторы CAR в течение 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 дней после трансдукции. На временную экспрессию CAR может влиять доставка вектора РНК CAR. В одном варианте осуществления РНК CAR трансдуцируют в Т-клетку путем электропорации.

Если пациент подвержен высокому риску развития ответа антител к CAR во время транзиторной терапии с помощью CAR (например, в результате трансдукций РНК), то перерывы в инфузии CAR-T-клеток не должны длиться более десяти-четырнадцати дней.

Виды комбинированной терапии

Связывающие CD33 белки по настоящему изобретению можно вводить в комбинации с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию или облучение или любую их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления доставка одного средства лечения все еще продолжается, когда начинается доставка второго, так что в плане введения происходит перекрывание. В данном документе это иногда называют "одновременной" или "параллельной доставкой". В других вариантах осуществления доставка одного средства лечения заканчивается до начала введения другого средства лечения. В некоторых вариантах осуществления в любом случае лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе средство лечения более эффективно, например эквивалентный эффект наблюдается при меньшем количестве второго средства лечения, или второе средство лечения уменьшает симптомы в большей степени, чем если бы второе средство лечения вводили в отсутствие первого средства лечения, или наблюдается ситуация, аналогичная первому средству лечения. В некоторых вариантах осуществления доставка осуществляется таким образом, что уменьшение симптома или другого параметра, связанного с нарушением, больше, чем наблюдалось бы при применении одного средства лечения в отсутствие другого. Эффект от двух видов лечения может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным. Доставка может быть такой, что эффект от первого средства лечения все еще можно обнаружить при доставке второго.

В одном варианте осуществления другие терапевтические средства, такие как факторы, можно вводить до, после или в одно и то же время (одновременно) со связывающими CD33 белками, например, CAR-T-клетками, включая без ограничения интерлейкины, а также колониестимулирующие факторы, такие как G-, M- и GM-CSF, а также интерфероны.

Связывающие CD33 белки, такие как CAR-экспрессирующие клетки, описанные в данном документе, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство можно вводить одновременно, в одной и той же или в отдельных композициях, или последовательно. При последовательном введении связывающие CD33 белки, такие как CAR-экспрессирующие клетки, описанные в

данном документе, могут быть введены первыми, а дополнительное средство может быть введено вторым, или порядок введения может быть обратным.

В дальнейших вариантах осуществления связывающие CD33 белки, такие как CAR-экспрессирующие клетки, описанные в данном документе, можно применять в схеме лечения в комбинации с хирургическим вмешательством, облучением, химиотерапией, иммуносупрессивными средствами, антителами или другими иммунодеструктивными средствами. В одном варианте осуществления субъекту может быть введено средство, которое усиливает активность CAR-экспрессирующей клетки. Например, в одном варианте осуществления средство может представлять собой средство, которое ингибирует ингибирующую молекулу.

Следующие примеры приведены для дальнейшего описания некоторых вариантов осуществления, раскрытых в данном документе. Примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения раскрытых вариантов осуществления.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение также описано и продемонстрировано с помощью следующих примеров. Однако применение этих и других примеров в любом месте описания является исключительно иллюстративным и никоим образом не ограничивает объем и суть настоящего изобретения или любого приведенного в качестве примера термина. Подобным образом, настоящее изобретение не ограничено какими-либо конкретными предпочтительными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, многие модификации и вариации по настоящему изобретению могут быть очевидны специалистам в данной области после прочтения настоящего описания, и такие вариации могут быть сделаны без отклонения от сути или объема настоящего изобретения. Поэтому настоящее изобретение подлежит ограничению только терминами прилагаемой формулы изобретения, а также полным объемом эквивалентов, применимых к такой формуле изобретения.

Пример 1. Создание антигена

Конструкции экспрессии, кодирующие внеклеточный домен (ECD) CD33 человека или его субдомены, конструировали на основе последовательности поверхностного антигена миелоидных клеток CD33 (Uniprot, № доступа P20138) и аннотации его домена с последовательностью либо 6X His-метка, либо в виде слитого белка с вариантом C34S сывороточного альбумина человека (HSA) с

последовательностью 6X His-метки на С-конце. Аналогичные конструкции экспрессии, кодирующие CD33 (ECD) или его субдомены от яванского макака (*Macaca fascicularis*), конструировали на основе NCBI № доступа XP_005590138.1. Аминокислотные последовательности созданных антигенов представлены в таблице 3.

Конструкции экспрессии полноразмерного ECD или субдомена CD33 человека и яванского макака временно трансфицировали в полученные из клеток HEK293, Expi293 (Gibco/Thermo Fisher Scientific) с использованием Expifectamine согласно протоколу производителя. Перед сбором клетки инкубировали 5 дней при 37 °C с 8% CO_2 на орбитальном шейкере. Экспрессированные клетки удаляли центрифугированием, а растворимые белки CD33 с his-метками очищали от среды с применением аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов на смоле Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare), а затем меняли буфер на 1X фосфатно-солевой буфер Дубелько pH 7,2 без кальция или магния с использованием колонок Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K MWCO, 10 мл; ThermoScientific, номер по каталогу 89893 в соответствии со описаниями производителя.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности антигенов CD33

ID белка AA	Описание	Аминокислотная последовательность
C33W1	HSA N-концевое слияние; CynoCD33ECD-HSA(C34S)-6xHis	DPRVRLEVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPVPYHTRN SPVHGYWFREGAIVSLDSPVATNKLDQEVQEETQG RFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMEKGS TKYSYKSTQLSVHVTDLTHRPQILIPGALDPDHSKN LTCSVPWACEQGTPPIFSWMSAAPTSLGLRTTHSSV LIITPRPQDHGTNLTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVSY ASQNPRTDIFLGDGSGKQGVVQGSGSGSENLYFQG VRSSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYL QQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSL HTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNEC FLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK KYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAA DKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFG

ID белка AA	Описание	Аминокислотная последовательность
		ERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVH TECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKEC CEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKD VCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLR LAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEE PQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQV STPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYL SVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFS ALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKK QTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSHHHH HH (SEQ ID NO: 225)
C33W2	HSA N-концевое слияние; человеческий CD33ECD-Tev-HSA(C34S)-6xHis	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKN SPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGR FRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGST KYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLT CSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVP QNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSGSGSENLYFQ GVRSSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQ YLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERN ECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETF LKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQ AADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQK FGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTK VHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLK ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES

ID белка AA	Описание	Аминокислотная последовательность
		KDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLL LRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLV EEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQ VSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCF SALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKK QTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCC KADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSHHHH HH (SEQ ID NO: 226)
C33W3	HSA N-концевое слияние; hCD33 Ig-подобный домен V-типа (Uniprot P20138, V136-H259), слитый с HSA и 6xHis-меткой на C-конце	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKN SPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGR FRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGST KYSYKSPQLSVHVTDLTHRDAHKSEVAHRFKDLGE ENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKT CVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEM ADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDV MCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFA KRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASS AKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEF AEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAK YICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMP ADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEY ARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHEC YAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQN ALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKH PEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTK CCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHA DICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAV

ID белка AA	Описание	Аминокислотная последовательность
		MDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQA ALGLHHHHHH (SEQ ID NO: 227)
C33W4	HSA N-концевое слияние; Ig-подобный домен C2-типа hCD33 (Uniprot P20138, V136-H259), слитый с HSA и 6xHis-меткой на C-конце	VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQ GTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTN LTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPG DGSGKQETRAGVVHDAHKSEVAHRFKDLGEENFK ALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVA DESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADC CAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCT AFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDEGKASSAKQ RLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEV SKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICE NQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADL PSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARR HPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALL VRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEA KRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCT ESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICT LSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL HHHHHH (SEQ ID NO: 228)
C33W8	hCD33_Ig-подобный домен V-типа	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKN SPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGR FRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGST

ID белка AA	Описание	Аминокислотная последовательность
		KYSYKSPQLSVHVTDLTHRGSHHHHHH (SEQ ID NO: 229)
C33W9	Ig-подобный домен C2-типа hCD33	VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQ GTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHGTN LTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPG DGSGKQETRAGVVHGSHHHHHH (SEQ ID NO: 230)
C33W10	MuIgV_Hu IgC2 химера CD33-6xHis_v1	QDLEFQLVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTL GPVTGSWLRKGVSLHEDSPVATSDPRQLVQKATQG RFQLLGDPQKHDCSLFIRDAQKNDTGMYFFRVVRE PFVRYSYKKSQLSLHVTSLSRTPKILIPGTLEPGHSK NLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSV LIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVT YVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSHHHHHH (SEQ ID NO: 231)
C33W12	MuIgV_cyno IgC2 химера CD33-6xHis_v1	QDLEFQLVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTL GPVTGSWLRKGVSLHEDSPVATSDPRQLVQKATQG RFQLLGDPQKHDCSLFIRDAQKNDTGMYFFRVVRE PFVRYSYKKSQLSLHVTSLSRTPQILIPGALDPDHSK NLTCSVPWACEQGTPPIFSWMSAAPTSLGLRTTHSS VLIITPRPQDHGTNLTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVS YASQNPRTDIFLGDGSGRKARKQGVVQGSHHHHH H (SEQ ID NO: 232)
C33W49	CD33 человека ECD (D18-H259)	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKN SPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGR

ID белка AA	Описание	Аминокислотная последовательность
	из Uniprot P20138 с С-концевой меткой 6xHis	FRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGST KYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLT CSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVP QNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSHHHHHH (SEQ ID NO: 233)
C33W50	Cyno CD33 ECD (D37-Q274) из XP_005590138.1 с С-концевой меткой 6xHis	DPRVRLEVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPVPYHTRN SPVHGYWFREGAIVSLDSPVATNKLDQEVQEETQG RFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMEKGS TKYSYKSTQLSVHVTDLTHRPQILIPGALDPDHSKN LTCSVPWACEQGTPPIFSWMSAAPTSLGLRTTHSSV LIITPRPQDHGTNLTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVSY ASQNPRTDIFLGDGSGKQGVVQGSHHHHHH (SEQ ID NO: 234)
C33W51	CD33 человека ECD (D18-G241) из Uniprot P20138 с меткой 6xHis	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKN SPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGR FRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGST KYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLT CSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVP QNPTTGHHHHHH (SEQ ID NO: 235)

Пример 2. Создание антител к CD33

Антитела создавали с помощью технологии Open Monoclonal Technologies (OMT) или технологий Ablexis с использованием трансгенных мышей следующим

образом. Трансгенных мышей AlivaMab и OMT создавали способами генной инженерии для получения иммуноглобулинов человека/мыши. Трансгенных мышей AlivaMab или OMT иммунизировали рекомбинантным человеческим белком CD33 (выбор антигенов из таблицы 1). Лимфоциты экстрагировали из вторичных лимфоидных органов и либо сливали с клеточной линией миеломы мыши FO для получения гибридомы, либо подвергали сортингу отдельных клеток с помощью FACS. Надосадочные жидкости гибридомы подвергали скриннингу с помощью электрохемилюминесценции MSD в отношении связывания с надэкспрессирующими ECD CD33 человека клетками HEK. Образцы, идентифицированные в результате скрининга, далее анализировали с помощью FACS в отношении связывания с надэкспрессирующими ECD CD33 человека клетками HEK (положительный сигнал) по сравнению с исходными клетками HEK (отрицательный сигнал). Подтвержденные клеточные связывания подвергали изотипированию по легкой цепи с применением ELISA. Надосадочные жидкости для сортинга отдельных клеток подвергали скриннингу с помощью электрохемилюминесценции MSD в отношении связывания с рекомбинантным человеческим белком CD33. Отбирали и секвенировали несколько хитов с необходимым профилем связывания.

Клонирование V области проводили следующим образом. Как РНК, очищенную с помощью набора Qiagen® RNeasy Plus Mini Kit, так и лизат B-клеток использовали для выполнения синтеза cDNA с использованием набора для синтеза cDNA Smarter (Clontech, Маунтин-Вью, штат Калифорния, США). Для облегчения синтеза cDNA использовали oligodT для первичной обратной транскрипции всех мессенджерных РНК с последующим "5'-кэппингом" с олигонуклеотидом Smarter IIA. Последующую амплификацию фрагментов VH и VL проводили с использованием 2-стадийной ПЦР-амплификации с использованием 5'-праймеров, нацеленных на кэп Smarter IIA, и 3'-праймеров, нацеленных на консенсусные области в CH1. Вкратце, каждая реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл состоит из 20 мкМ смесей прямых и обратных праймеров, 25 мкл премикса ДНК-полимеразы PrimeStar Max (Clontech), 2 мкл неочищенной cDNA и 21 мкл дважды дистиллированной H2O. Программу циклирования начинают при 94°C в течение 3 мин, затем 35 циклов (94°C в течение 30 с, 55°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин) и заканчивают при 72°C в течение 7 мин. Второй раунд ПЦР проводили с использованием праймеров второго раунда VL и VH, содержащих 15 п. н. комплементарных удлинений, которые "перекрывают" соответствующие области в соответствующем ему материнском векторе Lonza (VH и

VL). ПЦР второго раунда проводили по следующей программе: 94°C в течение 3 мин; 35 циклов (94°C в течение 30 с, 55°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин) и завершение при 72°C в течение 7 мин. Для направленного клонирования гена VL в вектор Lonza huIgK или Lambda и гена VH в вектор Lonza huIgG1 использовали набор In-Fusion® HD Cloning Kit (Clonetech, США). Для облегчения клонирования In-Fusion® HD продукты ПЦР обрабатывали Cloning Enhancer перед проведением клонирования In-Fusion® HD. Клонирование и трансформацию проводили в соответствии с протоколом производителя (Clonetech, США). ДНК, полученную с помощью набора mini-prep, подвергали секвенированию по Сэнгеру для подтверждения получения полных фрагментов V-гена.

В таблице 4 приведены аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей каждого из антител, полученных вышеуказанными способами.

Таблица 4

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
C33B1474	VH: QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SFGMS**WVRQAPGKG LEWVA**NIKRDGSEKYYVDSVKG**RFTISRDNAKNSLFLQMSSLRA EDTAVYYCVR**DYGYFDF**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52) VL: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**QASQAISNYLN**WYQQKPGKAPK LLIY**DASNLET**GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFSTYFC**QHYD NLPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 81)
C33B1522	VH: QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS**SYYWG**WIRQPPGKGL EWIG**YIYYSGSTNYNPSLKS**RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADT AVYYCAR**MWEILGFDP**WGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 53) VL:

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC**SGSSSNIGSNPVN**WYQQLPGTAPK LLIY**SNNQRPS**GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFC**AA WDDSLNGPV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 82)
C33B1607	VH: EVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFT**DYNIN**WVKQSHGKN LEWIG**TINPNNGVTFYNQRFKG**QATLTVDKSSSTAYMELRSLTS EDSAVYYCSR**DGYDTYYAMDY**WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 54) VL: DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC**KASQDVRTAEA**WYQQKPGQSP KLLIY**SASNRYT**GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC**Q QYYTTPRT**FGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 83)
C33B1601	VH: EVQLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFS**NYAMS**WVRQTPEKR LEWVA**GISNSGYSLYYPDTLKG**RFTISRDNARNTLYLQMISLRSE DTAMYYCAR**DGGSYPYAMDY**WGHGTSVTVSS (SEQ ID NO: 55) VL: DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC**KASQNVGTYVA**WYQQKPGHS PKALIY**SASYRYS**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC**Q QYKSYPLT**FGAGTKLELK (SEQ ID NO: 84)
C33B1517	VH: QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIR**NYYWS**WIRQTAGKGL EWLG**HIYSTGNIHYNPSLKS**RVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAAD TAVYYCAR**DNGAALFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
	VL: QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC**SGSSSNIGSNIVN**WYQQFPGTAPK LLIY**SNNQRPS**GVPDRVSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC**AA WDDSLNGPV**FGPGTKVTVL (SEQ ID NO: 85)
C33B1495	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFS**SYWMS**WVRQAPGKG LDWVA**NIKRDGSEKHYVDSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDSAVYYCTR**DYGYFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57) VL: DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC**RASQGISSYLA**WYQQKPGKAPK VLIY**AASTLQS**GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFC**QQL NSYPVT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 86)
C33B1478	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFS**VSAIH**WVRQASGKG LEWIG**RIRSKGNSYATAYDVSVKG**RFTISRDDSKNTAYLQMDSL KTEDTAVYYCTR**HNDKWNYYGLDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 58) VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**KSSQSLLFSNGYKFLD**WYLQRP GQSPQLLIY**LGSYRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLY YC**MQALQTPPT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 87)
C33B1477	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFS**VSAIH**WVRQASGKG LEWIG**RIRSKGNSYATAYAASVKG**RFTISRDDSKNTAYLQMDSL KTEDTAVYYCTR**HNDKWNYYGLDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
	NO: 59) VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**KSSQSLLFSNGYKFLD**WYLQRP GQSPQLLIY**LGSYRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLY YC**MQALQTPPT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 87)
C33B1476	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFS**VSAIH**WVRQASGKG LEWIG**RIRSKGNSYATAYNVSVKG**RFTISRDDSKNTAYLQMDSL KTEDTAVYYCTR**HNDKWNYYGLDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 60) VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**KSSQSLLFSNGYKFLD**WYLQRP GQSPQLLIY**LGSYRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLY YC**MQALQTPPT**FGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 87)
C33B1484	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFS**VFAIH**WVRQASGKG LEWIG**RIRSKGNSYATAYDVSVKG**RFTISRDDSKNTAYLQMDSL KTEDTAVYYCTR**HNDKWNYYGLDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 61) VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**KSSQSLLFSNGYKFLD**WYLQRP GQSPQLLIY**LGSYRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLY YC**MQALQTPPT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 88)

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
C33B933	VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQSPGK GLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKG**RFTISRDNSKSTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK**DFRSLDWLPPDSTSYDGMDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 95) VL: SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYASWYQQKPGQSPVV VIYKDSKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSTVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 105)
C33B919	VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGK GLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK**DFRSFDWLPPDSTSYYGMDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 96) VL: SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVV VIHQDRKRPSGIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAW DSSTVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 106)
C33B931	VH: EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYWMS**WVRQAPGK GLEWVA**NIKQHGSEKYYVDSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR**DRDLGYFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 97)

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
	VL: SYELTQPPSVSVSPGQTASITC**SGDKLGSKFAS**WYQQKPGQSPVL VIY**QDSKRPS**GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC**QAW DSSTVV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 107)
C33B836	VH: QVQLVQSGSELRKPGASVKVSCKASGYTFT**NYAMN**WVRQAPGQ GLEWMG**WINTNTGNPTYAQGFTG**RFVFSLDTSVSSAYLQISSLK AEDTAMYYCAT**DRDRGTDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 170) VL: QSALTQPASVSGSPGQSITISC**TGTSSDVGDYNYVS**WYQQHPGKV PKLMIY**DVSNRPS**GVSNRFSGSMSGNTASLTISGLQAEDEADYYC **SSYSSSSALEV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 185)
C33B782	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**SYWMS**WVRQAPGK GLEWVA**NIKQHGSEKYYVDSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR**DRDLGYFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 171) VL: SYELTQPPSVSVSPGQTASITC**SGNKLGAKFAS**WYQQKPGQSPVL VIY**QDNKRPS**GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYC**QAW DSSTVV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 188)
C33B806	VH: QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIS**SSSYYWG**WIRQPPGKG

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
	LDWIG**SINYSGSTYYNPSLKS**RVTISVDTSKIQFSLKLRSVTAADT AVYYCAR**LDGYESPFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 175) VL: DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC**RASQGISSWLA**WYQQKPGKAP KLLIY**AASSLQS**GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQ ANSFPFT**FGPGTKVDIK (SEQ ID NO: 192)
C33B904	VH: EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD**DYAMH**WVRQAPGK GLEWVS**GIGWSGGSIVYADSVKG**RFTISRDNAKNSLYLQMNSLR AEDTALYYCAK**DSPYGDFFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 179) VL: DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC**KSSQTVFYSSNNKNYLA**WYQQ KPGQPPKLLIS**WASTRKS**GVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDV AVYYC**QHYYSTPYT**FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 196)
C33B937	VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGK GLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEGTAVYYCAK**DFRSFDWLPPDSASYHGMDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 181) VL: SYELTQPPSVSVSPGQTASITC**SGDKLGDKYAS**WYQQKPGQSPVL VIY**QDGKRPS**GIPERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYC**QA WDRNTVV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 200)

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
C33B125	VH: QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGK GLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKG**RFTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAK**DFRSFDWLPPDSTSYYGMDV**WGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 96) VL: SYELTQPPSVSVSPGQTASITC**SGDKLGDKYVC**WYQQKPGQSPV VVIH**QDRKRPS**GIPERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYC**QA WDSSTVV**FGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 202)
C33B1475	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFS**SYWMT**WVRQAPGK GLEWVA**NIKQDGSERYYVDSVKG**RFTISRDSAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR**EVGYNWNQGGYFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 262) VL: DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC**RSSQSLLHSDGYNYLD**WYLQKS GQSPQLLIY**LGSYRAS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIY YC**MQVLQTPWT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 271)
C33B1516	VH: QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIR**NYYWS**WIRQSAGKEL EWFG**HIFSTGHINYDSSLKS**RVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAAD TAVYYCAR**DNGAALFDF**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 263)

Название антитела	Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей (CDR согласно системе Kabat выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)
	VL: QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC**SGSSSNIGSNIVN**WYQQFPGTAPK LLLY**SDNQRPS**GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC**AA WDDSLNGPV**FGTGTKVTVL (SEQ ID NO: 272)
C33B1481	VH: QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GITFSNYWMS**WVRQAPGK GLEWVA**SIKRDGSDKYYVDSVKG**RFTISRDNAKNSLSLQMHSLR AEDTAVYYCAK**GEFDY**WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 264) VL: DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC**RSSQSLVYSDGNTYLN**WFQQRP GQSPRRLIY**KVSTRDS**GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVAV YYC**LQGTHWPWT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 273)

В таблице 4a показаны аминокислотные последовательности последовательностей CDR антитела C33B1522 (антитела с VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82), определяемые согласно системам AbM, Kabat, Chothia, IMGT и Contact.

Таблица 4a

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
AbM	**GGSISSY YWG** (SEQ ID NO: 399)	**YIYYSGST N** (SEQ ID NO: 405)	**MWEIL GFDP** (SEQ ID NO: 411)	**SGSSSNIGS NPVN** (SEQ ID NO: 417)	**SNNQRP S** (SEQ ID NO: 423)	**AAW DDSL NGPV** (SEQ ID NO: 429)

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
Kabat	**SYYWG** (SEQ ID NO: 29)	**YIYYSGST NYNPSLKS** (SEQ ID NO: 37)	**MWEIL GFDP** (SEQ ID NO: 46)	**SGSSSNIGS NPVN** (SEQ ID NO: 63)	**SNNQRP S** (SEQ ID NO: 70)	**AAW DDSL NGPV** (SEQ ID NO: 76)
Chothia	**GGSISSY** (SEQ ID NO: 435)	**YYSGS** (SEQ ID NO: 441)	**MWEIL GFD** (SEQ ID NO: 447)	**SSSNIGSNP** (SEQ ID NO: 453)	**SNN** (SEQ ID NO: 459)	**WDDS LNGP** (SEQ ID NO: 465)
IMGT	**GGSISSY Y** (SEQ ID NO: 471)	**IYYSGST** (SEQ ID NO: 477)	**ARMWE ILGFDP** (SEQ ID NO: 483)	**SSNIGSNP** (SEQ ID NO: 489)	**SNN** (SEQ ID NO: 495)	**AAW DDSL NGPV** (SEQ ID NO: 501)
Contact	**SSYYWG** (SEQ ID NO: 507)	**WIGYIYYS GSTN** (SEQ ID NO: 513)	**ARMWE ILGFD** (SEQ ID NO: 519)	**IGSNPVNW Y** (SEQ ID NO: 525)	**LLIYSN NQRP** (SEQ ID NO: 531)	**AAW DDSL NGP** (SEQ ID NO: 537)

В таблице 4b показаны аминокислотные последовательности последовательностей CDR антитела C33B1477 (антитела с VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87), определяемые согласно системам AbM, Kabat, Chothia, IMGT и Contact.

Таблица 4b

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
AbM	**GFTFSV SAIH**	**RIRSKGNS YATA** (SEQ	**HNDKWN YYGLDV**	**KSSQSLL FSNGYKF**	**LGSYRAS** (SEQ ID	**MQAL QTPPT**

	(SEQ ID NO: 400)	ID NO: 406)	(SEQ ID NO: 412)	**LD** (SEQ ID NO: 418)	NO: 424)	(SEQ ID NO: 430)
Kabat	**VSAIH** (SEQ ID NO: 34)	**RIRSKGNSYATAYAASVKG** (SEQ ID NO: 43)	**HNDKWNYYGLDV** (SEQ ID NO: 51)	**KSSQSLLFSNGYKFLD** (SEQ ID NO: 68)	**LGSYRAS** (SEQ ID NO: 74)	**MQALQTPPT** (SEQ ID NO: 80)
Chothia	**GFTFSVS** (SEQ ID NO: 436)	**RSKGNSYA** (SEQ ID NO: 442)	**HNDKWNYYGLD** (SEQ ID NO: 448)	**SQSLLFSNGYKF** (SEQ ID NO: 454)	**LGS** (SEQ ID NO: 460)	**ALQTPP** (SEQ ID NO: 466)
IMGT	**GFTFSVSA** (SEQ ID NO: 472)	**IRSKGNSYAT** (SEQ ID NO: 478)	**TRHNDKWNYYGLDV** (SEQ ID NO: 484)	**QSLLFSNGYKF** (SEQ ID NO: 490)	**LGS** (SEQ ID NO: 496)	**MQALQTPPT** (SEQ ID NO: 502)
Contact	**SVSAIH** (SEQ ID NO: 508)	**WIGRIRSKGNSYATA** (SEQ ID NO: 514)	**TRHNDKWNYYGLD** (SEQ ID NO: 520)	**LFSNGYKFLDWY** (SEQ ID NO: 526)	**LLIYLGSYRA** (SEQ ID NO: 532)	**MQALQTPP** (SEQ ID NO: 538)

В таблице 4c показаны аминокислотные последовательности последовательностей CDR антитела C33B1475 (антитела с VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271), определяемые согласно системам AbM, Kabat, Chothia, IMGT и Contact.

Таблица 4c

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
AbM	**GFTFSSYWMT** (SEQ ID NO: 401)	**NIKQDGSERY** (SEQ ID NO: 407)	**EVGYNWNQGGYFDY** (SEQ ID NO: 413)	**RSSQSLLHSDGYNYLD** (SEQ ID NO: 419)	**LGSYRAS** (SEQ ID NO: 425)	**MQVLQTPWT** (SEQ ID NO: 431)
Kabat	**SYWMT** (SEQ ID NO: 253)	**NIKQDGSERYYVDSVKG** (SEQ ID NO: 256)	**EVGYNWNQGGYFDY** (SEQ ID NO: 259)	**RSSQSLLHSDGYNYLD** (SEQ ID NO: 265)	**LGSYRAS** (SEQ ID NO: 74)	**MQVLQTPWT** (SEQ ID NO: 269)
Chothia	**GFTFSSY** (SEQ ID NO: 437)	**KQDGSE** (SEQ ID NO: 443)	**EVGYNWNQGGYFD** (SEQ ID NO: 449)	**SQSLLHSDGYNY** (SEQ ID NO: 455)	**LGS** (SEQ ID NO: 461)	**VLQTPW** (SEQ ID NO: 467)
IMGT	**GFTFSSYW** (SEQ ID NO: 473)	**IKQDGSER** (SEQ ID NO: 479)	**AREVGYNWNQGGYFDY** (SEQ ID NO: 485)	**QSLLHSDGYNY** (SEQ ID NO: 491)	**LGS** (SEQ ID NO: 497)	**MQVLQTPWT** (SEQ ID NO: 503)
Contact	**SSYWMT** (SEQ ID NO: 509)	**WVANIKQDGSERY** (SEQ ID NO: 515)	**AREVGYNWNQGGYFD** (SEQ ID NO: 521)	**LHSDGYNYLDWY** (SEQ ID NO: 527)	**LLIYLGSYRA** (SEQ ID NO: 533)	**MQVLQTPW** (SEQ ID NO: 539)

В таблице 4d показаны аминокислотные последовательности последовательностей CDR антитела C33B1517 (антитела с VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85), определяемые согласно системам AbM, Kabat, Chothia, IMGT и Contact.

Таблица 4d

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
AbM	**GASIR NYYW S** (SEQ ID NO: 402)	**HIYSTGNIH** (SEQ ID NO: 408)	**DNGAAL FDY** (SEQ ID NO: 414)	**SGSSSNIGS NIVN** (SEQ ID NO: 420)	**SNNQRP S** (SEQ ID NO: 426)	**AAWDD SLNGPV** (SEQ ID NO: 432)
Kabat	**NYYW S** (SEQ ID NO: 32)	**HIYSTGNIH YNPSLKS** (SEQ ID NO: 40)	**DNGAAL FDY** (SEQ ID NO: 49)	**SGSSSNIGS NIVN** (SEQ ID NO: 66)	**SNNQRP S** (SEQ ID NO: 70)	**AAWDD SLNGPV** (SEQ ID NO: 76)
Chothia	**GASIR NY** (SEQ ID NO: 438)	**YSTGN** (SEQ ID NO: 444)	**DNGAAL FD** (SEQ ID NO: 450)	**SSSNIGSNI** (SEQ ID NO: 456)	**SNN** (SEQ ID NO: 462)	**WDDSL NGP** (SEQ ID NO: 468)
IMGT	**GASIR NYY** (SEQ ID NO: 474)	**IYSTGNI** (SEQ ID NO: 480)	**ARDNGA ALFDY** (SEQ ID NO: 486)	**SSNIGSNI** (SEQ ID NO: 492)	**SNN** (SEQ ID NO: 498)	**AAWDD SLNGPV** (SEQ ID NO: 504)
Contact	**RNYY WS** (SEQ ID NO: 510)	**WLGHIYST GNIH** (SEQ ID NO: 516)	**ARDNGA ALFD** (SEQ ID NO: 522)	**IGSNIVNW Y** (SEQ ID NO: 528)	**LLIYSN NQRP** (SEQ ID NO: 534)	**AAWDD SLNGP** (SEQ ID NO: 540)

В таблице 4e показаны аминокислотные последовательности последовательностей CDR антитела C33B1516 (антитела с VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272), определяемые согласно системам AbM, Kabat, Chothia, IMGT и Contact.

Таблица 4e

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
AbM	**GGSIR**	**HIFSTGHIN**	**DNGAAL**	**SGSSSNIG**	**SDNQRP**	**AAWDD**

	NYYWS (SEQ ID NO: 403)	(SEQ ID NO: 409)	**FDF** (SEQ ID NO: 415)	**SNIVN** (SEQ ID NO: 421)	**S** (SEQ ID NO: 427)	**SLNGPV**(SEQ ID NO: 433)
Kabat	**NYYWS** (SEQ ID NO: 254)	**HIFSTGHINYDSSLKS** (SEQ ID NO: 257)	**DNGAALFDF** (SEQ ID NO: 260)	**SGSSSNIGSNIVN** (SEQ ID NO: 66)	**SDNQRPS** (SEQ ID NO: 267)	**AAWDDSLNGPV** (SEQ ID NO: 76)
Chothia	**GGSIRNY** (SEQ ID NO: 439)	**FSTGH** (SEQ ID NO: 445)	**DNGAALFD** (SEQ ID NO: 451)	**SSSNIGSNI** (SEQ ID NO: 457)	**SDN** (SEQ ID NO: 463)	**WDDSLNGP** (SEQ ID NO: 469)
IMGT	**GGSIRNYY** (SEQ ID NO: 475)	**IFSTGHI** (SEQ ID NO: 481)	**ARDNGAALFDF** (SEQ ID NO: 487)	**SSNIGSNI** (SEQ ID NO: 493)	**SDN** (SEQ ID NO: 499)	**AAWDDSLNGPV** (SEQ ID NO: 505)
Contact	**RNYYWS** (SEQ ID NO: 511)	**WFGHIFSTGHIN** (SEQ ID NO: 517)	**ARDNGAALFD** (SEQ ID NO: 523)	**IGSNIVNWY** (SEQ ID NO: 529)	**LLLYSDNQRP** (SEQ ID NO: 535)	**AAWDDSLNGP** (SEQ ID NO: 541)

В таблице 4f показаны аминокислотные последовательности последовательностей CDR антитела C33B1481 (антитела с VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273), определяемые согласно системам AbM, Kabat, Chothia, IMGT и Contact.

Таблица 4f

	HC1	HC2	HC3	LC1	LC2	LC3
AbM	**GITFSNYWMS** (SEQ ID NO: 404)	**SIKRDGSDKY** (SEQ ID NO: 410)	**GEFDY** (SEQ ID NO: 416)	**RSSQSLVYSDGNTYLN**(SEQ ID NO: 422)	**KVSTRDS** (SEQ ID NO: 428)	**LQGTHWPWT** (SEQ ID NO: 434)
Kabat	**NYWMS** (SEQ ID NO: 255)	**SIKRDGSDKYYVDSVKG** (SEQ ID NO: 258)	**GEFDY** (SEQ ID NO: 261)	**RSSQSLVYSDGNTYLN** (SEQ ID NO: 266)	**KVSTRDS** (SEQ ID NO: 268)	**LQGTHWPWT** (SEQ ID NO: 270)
Chothia	**GITFSNY** (SEQ ID NO: 440)	**KRDGSD** (SEQ ID NO: 446)	**GEFD** (SEQ ID NO: 452)	**SQSLVYSDGNTY** (SEQ ID NO: 458)	**KVS** (SEQ ID NO: 464)	**GTHWPW** (SEQ ID NO: 470)
IMGT	**GITFSNYW** (SEQ ID NO: 476)	**IKRDGSDK** (SEQ ID NO: 482)	**AKGEFDY** (SEQ ID NO: 488)	**QSLVYSDGNTY** (SEQ ID NO: 494)	**KVS** (SEQ ID NO: 500)	**LQGTHWPWT**(SEQ ID NO: 506)
Contact	**SNYWMS** (SEQ ID NO: 512)	**WVASIKRDGSDKY** (SEQ ID NO: 518)	**AKGEFD** (SEQ ID NO: 524)	**VYSDGNTYLNWF** (SEQ ID NO: 530)	**RLIYKVSTRD** (SEQ ID NO: 536)	**LQGTHWPW** (SEQ ID NO: 542)

Антитела создавали у лам следующим образом. Трем ламам подкожно инъецировали антиген hCD33-IgC2 из таблицы 3 тремя инъекциями (дни 0, 14 и 28), при этом первую инъекцию проводили в полном адъюванте Фрейнда, а последующие проводили в неполном адъюванте Фрейнда). За первой инъекцией следовали три инъекции антигена ECD hCD33-FL из таблицы 3 (дни 61, 76 и 91). PBMC для сортинга

по отдельным В-клеткам получали в дни 14, 35 и 86 и замораживали. Замороженные PBMC размораживали и окрашивали рекомбинантными антигенными приманками, либо биотинилированными, либо конъюгированными с Alexa Fluor 647. Антигенные приманки представляли собой рекомбинантный человеческий CD33-ECD и рекомбинантный человеческий домен CD33-IgC. Биотинилированную приманку выявляли с помощью стрептавидина (SA), меченного PE. Антиген-специфические клетки (положительные для обеих антигенных приманок) сортировали объемом непосредственно в буфер для лизиса RLT (Qiagen) с использованием устройства для сортинга BD FACSAria Fusion. Лизат клеток замораживали при -80°C и отправляли в Genewiz для дальнейшей обработки.

Клонирование V-области vHH ламы и конструирование конструкции моно-Fc слияния проводили следующим образом. В-клетки лизировали в буфере для лизиса RealTime Ready (Roche). Затем РНК очищали с помощью набора RNeasy Plus® Mini Kit (Qiagen 74134). Свежую РНК использовали непосредственно для синтеза cDNA с использованием набора SuperScript® cDNA (Invitrogen 18091-050). Для облегчения синтеза cDNA использовали oligodT для первичной обратной транскрипции всех мессенджерных РНК. Последующую амплификацию фрагментов VHH проводили с применением 2-стадийной ПЦР-амплификации с использованием SP ламы и 3'-праймеров, нацеленных на консенсусные области в CH2. Вкратце, каждая реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл состояла из 20 мкМ смесей прямых и обратных праймеров, 25 мкл премикса ДНК-полимеразы PrimeStar Max (Clontech), 2 мкл неочищенной cDNA и 21 мкл дважды дистиллированной H_2O. Программу циклирования начинали при 94°C в течение 3 мин, затем следовало 35 циклов (94°C в течение 30 с, 55°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин) и заканчивали при 72°C в течение 7 мин.

ДНК VHH из первого раунда ПЦР очищали в геле. Второй раунд ПЦР VHH проводили с праймерами второго раунда, содержащими 15 п. н. комплементарных удлинений, которые "перекрывают" соответствующие области в соответствующем ему материнском векторе Lonza. ПЦР второго раунда проводили по следующей программе: 94°C в течение 3 мин; 35 циклов (94°C в течение 30 с, 55°C в течение 1 мин, 68°C в течение 1 мин) и завершение при 72°C в течение 7 мин. Для направленного клонирования гена VHH в вектор Lonza с моно-Fc использовали набор In-Fusion® HD Cloning Kit (Clonetech, США). Для облегчения клонирования In-Fusion® HD продукты ПЦР обрабатывали Cloning Enhancer перед проведением клонирования In-Fusion HD.

Клонирование и трансформацию проводили в соответствии с протоколом производителя (Clonetech, США). ДНК, полученную с помощью набора mini-prep, подвергали секвенированию по Сэнгеру для подтверждения получения полных фрагментов V-гена.

В таблице 5 приведены аминокислотные последовательности тяжелой цепи антител ламы, полученных вышеописанным способом.

Таблица 5

Название антитела	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (последовательности CDR выделены жирным шрифтом)
C33B1785	VH: QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAVFGFSLS**DYAIG**WFRQAPG KEREKVS**CISESDGRTYLSDSVKS**RFTISRDNGKNTVYLQMN NLKPDDTGVYYCAT**VDQAISESSYHCEKGFGS**WGQGTQVT VSS (SEQ ID NO: 18)
C33B1784	VH: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFS**TYVMG**WFRQAP GQERELVA**AIVSGRNPTYADSVKS**RFTISRDNAKNTIYLHMN SLQPEDTAVYYCHM**YHYSSQY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 19)
C33B1787	VH: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFD**DYAIG**WFRQAP GKEREGVS**CISSSDGSTYYVDSVKG**RFTISSDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCTA**LIIMYGSGSERAAAACRYKYEY**WGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO: 20)

Название антитела	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (последовательности CDR выделены жирным шрифтом)
C33B1786	VH: EVQVVESGGGVVQSGGSLTLSCEASESILS**FSTMD**WFRQAPG KEREGVS**CIRPRYSTTTHADSIKG**RFKMYSDNAKNTIYLHM NSLQPEDTAVYYCHM**YHYSSQY**WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 21)
C33B1781	VH: EVQVVESGGGLVQGGGSLRLSCAASGSIFS**INAMG**WYHQAP GKQRELVA**RITGGGATDYVDSVKG**RFTISLDSAKSTVYLQM NSLKPEDTAVYHCYA**DLVTRVGSDLLYDDY**WGQGTQVTVS S (SEQ ID NO: 22)
C33B1780	VH: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVFGFSLS**DYAIG**WFRQAPG KEREKVS**CISESDGRTYLSDSVKS**RFTISRDNGKNTVYLQMN NLKPDDTGVYYCAT**VDQAISESSYHCEKGFGS**WGQGTQVT VSS (SEQ ID NO: 23)
C33B1783	VH: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFD**DYAVG**WFRQVP GKEREGVS**CISSSDGATYYADSVKG**RFTISSDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCTA**IIVRGSGWERAAAACRYEYSY**WGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO: 24)

Название антитела	Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (последовательности CDR выделены жирным шрифтом)
C33B1782	VH: EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFD**DYAVG**WFRQAP GKEREGIS**CISSSDGATYYADSVKG**RFTISTDNAKNTAFLQM NSLKPEDTAVYYCTA**VIVRGTGWERAAAACRYEYAY**WGQ GTQVTVSS (SEQ ID NO: 25)
C33B1789	VH: QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVFGFSLS**DYAIG**WFRQAP GKEREKVS**CISESDGRTYLSDSVKS**RFTISRDNGKNTVYLQM NNLKPDDTGVYYCAT**VDQAISESSYHCEKGFGS**WGQGTQV TVSS (SEQ ID NO: 26)
C33B1788	VH: QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVFGFSLS**DYAIG**WFRQAPG KEREKVS**CISESDGRTYLSDSVKS**RFTISRDNGKNTVYLQMN NLKPDDTGVYYCAT**VDQAISESSYHCEKGFGS**WGQGTQVT VSS (SEQ ID NO: 27)

Антитела к CD33 и слитые белки vHH-моно-Fc экспрессировались в клетках ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific; Уолтем, штат Массачусетс, США, № по каталогу A29127) путем временной трансфекции очищенной плазмидной ДНК, кодирующей белки, в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, клетки ExpiCHO-S™ поддерживали в суспензии в среде для экспрессии ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, № по каталогу A29100) в инкубаторе с орбитальным встряхиванием, установленном при 37°C, 8% CO_2 и 125 оборотов в минуту. Клетки высевали и разбавляли перед трансфекцией до 6,0 x 10^6 клеток на мл, поддерживая жизнеспособность клеток при 99,0% или выше. Временные трансфекции проводили с

использованием набора для трансфекции ExpiFectamine™ CHO (ThermoFisher Scientific, № по каталогу A29131). На каждый мл разбавленных клеток, подлежащих трансфекции, использовали 0,5 микрограмма кодирующей ДНК слияния scFv-Fc и 0,5 микрограмма ДНК pAdVAntage (Promega, № по каталогу E1711) и разбавляли средой для комплексообразования OptiPRO™ SFM. Использовали реагент ExpiFectamine™ CHO при соотношении 1:4 (об./об., ДНК:реагент) и разбавляли OptiPRO™. Разбавленную ДНК и трансфекционный реагент объединяли в течение одной минуты, что обеспечивало образование комплекса ДНК/липид, а затем добавляли в клетки. После инкубации на протяжении ночи к клеткам добавляли подпитку ExpiCHO™ и энхансеры ExpiFectamine™ CHO в соответствии со стандартным протоколом производителя. Клетки инкубировали с орбитальным встряхиванием (125 об/мин) при 37°C в течение семи дней до сбора культурального бульона. Культуральную надосадочную жидкость из временно трансфицированных клеток ExpiCHO-S™ осветляли центрифугированием (30 мин, 3000 rcf) с последующей фильтрацией (0,2 мкм PES мембрана, Corning; Корнинг, штат Нью-Йорк, США).

Очистку белков проводили следующим образом. Отфильтрованную надосадочную жидкость клеточной культуры загружали на предварительно уравновешенную (1xDPBS, pH 7,2) колонку MabSelect Sure Protein A (GE Healthcare) с использованием хроматографической системы AKTAXpress. После загрузки колонку промывали 10 объемами колонки 1xDPBS, pH7,2. Белок элюировали 10 объемами колонки 0,1 M ацетата натрия (Na), pH 3,5. Белковые фракции немедленно нейтрализовали путем добавления 2,5 M Tris HCl, pH 7,5, до 20% (об./об.) от объема элюирующей фракции. Пиковые фракции объединяли и фильтровали (0,2 мкм). Качество очищенного белка оценивали с помощью аналитической HPLC с исключением размера (система HPLC Agilent).

Пример 3. Характеристика антител к CD33 и vHH ламы с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR; Biacore)

Значения аффинности (K_D) в отношении взаимодействия антител к CD33 человека (полноразмерный ECD и домен IgC2) получали с помощью SPR. Антитела к CD33 захватывали с использованием антитела к Fc человека и в раствор вводили антигены. Данные представлены в таблице 6 ниже.

Таблица 6

№ ID белка	K_D связывания с hu CD33 (FL ECD) **(нМ)**	K_D связывания с hu CD33 (IgC2) **(нМ)**
C33B1474	2,47	3,99
C33B1517	4,44	связывание отсутствует
C33B919	0,5	связывание отсутствует
C33B1522	>10	связывание отсутствует
C33B1607	1,49	связывание отсутствует
C33B933	0,5	Не измеряли
C33B125	0,1	>10
C33B931	0,4	Не измеряли
C33B937	0,3	56
C33B1601	1,1	6,8

Аффинность связывания антител к CD33 и vHH ламы с рекомбинантным человеческим CD33 (FL ECD или домен IgC2) определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием прибора Biacore 8K. Fc-слитые scFv или моно-Fc-слитые vHH захватывали с использованием козьего антитела к Fc, модифицированного GLC-чипом, и титровали 5-кратными серийными разбавлениями антигена CD33 с концентрацией 40 нМ - 1,6 нМ. Ассоциацию и диссоциацию отслеживали в течение 2 и 30 минут, соответственно, при скорости потока 50 мкл/минута. Необработанные данные по связыванию относили путем вычитания сигналов связывания аналита из контрольных образцов и анализировали с использованием модели связывания Ленгмюра 1:1 с использованием программного обеспечения Biacore для получения кинетических показателей, которые использовали для расчета аффинности связывания.

Аффинности (K_D) в отношении взаимодействия vHH ламы к CD33 с CD33 человека (FL ECD или домен IgC2). vHH ламы к CD33 на остове моно-Fc захватывали с использованием антитела к Fc человека и в раствор вводили антигены. Данные представлены в таблице 7 ниже. Репрезентативные сенсограммы Biacore 8K взаимодействий антител vHH к CD33 против антигенов hu CD33 (FL ECD и домен IgC2) также показаны на **фиг. 1**.

Таблица 7

ID белка vHH	**KD (M)** связывания с hu CD33 (FL ECD)	**KD (M)** связывания с hu CD33 (IgC2)

C33B1783	8,59E-11	отсутствие связывания/низкое связывание
C33B1782	2,06E-10	отсутствие связывания/низкое связывание
C33B1786	3,57E-10	отсутствие связывания/низкое связывание
C33B1785	6,61E-10	3,31E-09
C33B1789	6,70E-10	3,03E-09
C33B1788	7,07E-10	4,34E-09
C33B1787	7,92E-10	отсутствие связывания/низкое связывание
C33B1780	8,47E-10	3,38E-09
C33B1781	2,21E-09	5,59E-11
C33B1784	связующее с низким значением, нМ; низкий ответ при этой концентрации	отсутствие связывания/низкое связывание

Термостабильность слитых антител scFv-Fc к CD33 и VHH ламы определяли с помощью nanoDSF на приборе Prometheus® NT.Plex (NanoTemper Technologies). Измерения проводили путем загрузки образцов в стандартные капилляры (NanoTemper Technologies) из 384-луночного планшета для образцов. Выполняли двойные или тройные повторности. Термическое разворачивание отслеживали при скорости изменения температуры 1,0°C/минута от 20^0C до 95^0C. Температуры термического перегиба (средняя точка Tm) и температуру начала агрегации (Tagg) определяли автоматически с помощью PR. ThermControl Software (NanoTemper Technologies) и далее анализировали с использованием программного обеспечения PR.Stability Analysis Software (NanoTemper Technologies). Данные представлены в таблице 8 ниже.

Таблица 8. Данные по термостабильности для антител scFv и vHH к CD33 (vHH ламы на основе моно-Fc), полученные с использованием прибора nanoDSF

ID белка vHH	Tm1 (^{0}C)	Tm2 (^{0}C)	Tm3 (^{0}C)

C33B1780	50,2	72,1	
C33B1781	52,6	53	
C33B1782	50,3	66,5	
C33B1783	51,4	64,7	
C33B1784	48,4	58,5	
C33B1785	49,9	63	
C33B1786	48,0	63,6	
C33B1787	50,4	59,3	
C33B1788	50,2	63,5	75,7
C33B1789	50,2	63,8	81,5

Таблица 8А. Данные по термостабильности для антител scFv и vHH к CD33, полученные с использованием прибора для nanoDSF Использовали остов Fc IgG1 под SEQ ID NO: 277. scFv присоединяли непосредственно к этому остову IgG1 без применения линкерной последовательности

scFv на остове Fc IgG1 человека

ID слитого белка scFv-Fc	ID клона scFv	Обозначение белка	Исходное mAb	Среднее значение Tm1—ScFv ((^{0}C)	Среднее значение Tm2 (^{0}C)	Среднее значение Tm3 (^{0}C)	Среднее значение Tagg (^{0}C)	Среднее значение начала (^{0}C)
C33B1689	C33B1617	C33B1617_LH_Fc	C33B937	58	67,7	80,6	71,8	53,6
C33B1699	C33B1617	C33B1617_HL_Fc	C33B937	56,4	67,8	80,7	77,9	51,7

C33B1690	C33B1618	C33B1618_LH_Fc	C33B933	63,1		80,7	77,7	52,5
C33B1700	C33B1618	C33B1618_HL_Fc	C33B933	63,7		80,5	79,6	52,2
C33B1691	C33B1619	C33B1619_LH_Fc	C33B931	61,2	68,3	80,1	78,5	56,6
C33B1701	C33B1619	C33B1619_HL_Fc	C33B931	61,6	68,4	80,6	78,7	56,5
C33B1698	C33B1620	C33B1620_LH_Fc	C33B919	63,5	68,8	81,3	77,6	59,2
C33B1702	C33B1620	C33B1620_HL_Fc	C33B919	64,9		80,4	79,2	55,5
C33B1693	C33B1646	C33B1646_LH_Fc	C33B1607	66,5		81,2	66,2	60,5
C33B1703	C33B1646	C33B1646_HL_Fc	C33B1607	64,7	81		64,1	58,9
C3	C33	C33B	C33	65,2		81,2	63,4	56,9

C33B1694	B1651	C33B1651_LH_Fc	B1601					
C33B1704	C33B1651	C33B1651_HL_Fc	C33B1601	64,6	81,6		70,7	56,2
C33B1696	C33B1659	C33B1659_LH_Fc	C33B1517	68,1		81,1	76,3	56,1
C33B1706	C33B1659	C33B1659_HL_Fc	C33B1517	68,1		80,9	79,8	60,7
C33B1697	C33B1680	C33B1680_LH_Fc	C33B1474	56,7	67,1	80,6	69	48,2
C33B1707	C33B1680	C33B1680_HL_Fc	C33B1474	54,6	67,2	80,2	78,7	46,2
C33B1692	C33B1682	C33B1682_LH_Fc	C33B125	65		81	77,7	55,4
C33B1708	C33B1682	C33B1682_HL_Fc	C33B125	63,9		80,2	80,5	58,8

Пример 4. Конструирование и экспрессия CAR scFv к CD33

Конструировали конструкции CAR к CD33, включающие следующие последовательности scFv.

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDYNYVSWYQQHPGKVPKLMIYDVSNRP SGVSNRFSGSMSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVLGGS EGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVQSGSELRKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVR QAPGQGLEWMGWINTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSSAYLQISSLKAEDTAM YYCATDRDRGTDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 203)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDNKRPSGI PERFSGSNSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKS SGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRDLGYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 204)
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFTFGPGTKVDIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKG LDWIGSINYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKIQFSLKLRSVTAADTAVYYCARLDGY ESPFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 205)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISW ASTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK GGSEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW VRQAPGKGLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDT ALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 206)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYASWYQQKPGQSPVVVIYKDSKRPSGI

PERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKS SGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGK GLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK DFRSLDWLPPDSTSYDGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 207)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDGKRPSGI PERFSGSNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRNTVVFGGGTKLTVLGGSEGK SSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCA KDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 208)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVVVIHQDRKRPSGI PERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKS SGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KDFRSFDWLPPDSTSYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 209)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVVIHQDRKRPSGI PERFSGSNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKS SGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPG KGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KDFRSFDWLPPDSTSYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 210)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGK GLEWVANIKQHGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRDLGYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 211)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQAISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETG VPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDFSTYFCQHYDNLPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKG LEWVANIKRDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMSSLRAEDTAVYYCVRD YGYFDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 212)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWGWIRQPP GKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR MWEILGFDPWGQGTLVTVS (SEQ ID NO: 213)
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAEAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYT GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQYYTTPRTFGGGTKLEIKGGSEGK SSGSGSESKSTGGSEVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFTDYNINWVKQSHGK NLEWIGTINPNNGVTFYNQRFKGQATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSRD GYDTYYAMDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 214)
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTYVAWYQQKPGHSPKALIYSASYRY SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYKSYPLTFGAGTKLELKGGSEG KSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTP EKRLEWVAGISNSGYSLYYPDTLKGRFTISRDNARNTLYLQMISLRSEDTAMYYCA RDGGSYPYAMDYWGHGTSVTVSS (SEQ ID NO: 215)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSG VPDRVSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGPGTKVTVLGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTA GKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSLKSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAR

DNGAALFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 216)
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKVLIYAASTLQSG VPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQLNSYPVTFGGGTKVEIKGGSEGKSS GSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYWMSWVRQAPGKG LDWVANIKRDGSEKHYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDSAVYYCTRD YGYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 217)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSY RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQA SGKGLEWIGRIRSKGNSYATAYDVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVY YCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 218)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSY RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQA SGKGLEWIGRIRSKGNSYATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVY YCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 219)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSY RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKGGS EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQA SGKGLEWIGRIRSKGNSYATAYNVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVY YCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 220)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSY RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKGGS

EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVFAIHWVRQA SGKGLEWIGRIRSKGNSYATAYDVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVY YCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 221)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSDGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSY RASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQVLQTPWTFGQGTKVEIKGG SEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVR QAPGKGLEWVANIKQDGSERYYVDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 274)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGTGTKVTVLGGSE GKSSGSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSA GKELEWFGHIFSTGHINYDSSLKSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAR DNGAALFDFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 275)
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVS TRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVAVYYCLQGTHWPWTFGQGTKVEIKG GSEGKSSGSGSESKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSNYWMSWV RQAPGKGLEWVASIKRDGSDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMHSLRAEDTA VYYCAKGEFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 276)

Стимулированные Dynabeads Human T-Expander CD3/CD28 Т-клетки подвергали электропорации, затем трижды промывали с помощью OPTI-MEM (Invitrogen) и ресуспендировали в OPTI-MEM при конечной концентрации 50E6/мл. Затем 0,1 мл клеток (5E6) смешивали с 10 мкг РНК, кодирующей CAR IVT, и подвергали электрофорезу в 2-мм кювете Gap (Harvard Apparatus BTX, Холлистон, штат Массачусетс, США) с использованием BTX ECM830 (Harvard Apparatus BTX, Холлистон, штат Массачусетс, США) путем однократного нажатия кнопки "импульс".

(Настройки: 500 вольт, длина импульса 750 мкс и одиночный (1) импульс, интервал 100 мкс). После электропорации Т-клетки переносили в 6-луночный планшет и немедленно помещали обратно в инкубатор при 37°C. Первичные Т-клетки человека подвергали электрофорезу без mRNA (MOCK) или с 10 мкг mRNA, экспрессирующей либо CAR scFv к CD33, либо нерелевантный контрольный CAR. Через 24 часа после электропорации измеряли экспрессию CAR поверхности с помощью проточной цитометрии после окрашивания с помощью 2 мкг/мл биотинилированного белка L и стрептавидин-конъюгированного PE, или биотинилированного CD33 (1 мкг/мл) и стрептавидин-конъюгированного PE.

Через двадцать четыре часа после электропорации подсчитывали Т-клетки. Для каждого подсчета собирали 1E5 Т-клеток. Клетки дважды промывали буфером FACS с использованием 200 мкл/лунка буфера FACS для микротитровальных планшетов, надосадочную жидкость отбрасывали. Все лунки окрашивали с помощью 100 мкл буфера для окрашивания, содержащего белок L (Genscript, № по каталогу M000971:500; 2 мкг/мл), и инкубировали в течение по меньшей мере 30 минут при 4°C в защищенном от света месте. Клетки дважды промывали путем добавления буфера FACS с использованием 150 мкл/лунка буфера FACS для микротитровальных планшетов. Центрифугирование выполняли при 400x g в течение 4 минут при комнатной температуре. Надосадочную жидкость затем отбрасывали. Все лунки окрашивали 100 мкл стрептавидин-R-фикоэритрина (SA-PE; 1:250) и красителем Live/dead Fixable Near-IR Dead Cell Stain (1:1000), инкубировали в течение по меньшей мере 30 минут при 4°C при защите от света. После этого клетки готовы для анализа с помощью итометрии.

Наблюдали окрашивание белка L для CAR к CD33, в то время как в контрольных Т-клетках, представлявших собой Т-клетки без электропорации mRNA, наблюдали только фоновое окрашивание (~5,5%). Экспрессия CAR на первичных человеческих Т-клетках также может быть выявлена с помощью внутреннего биотин-меченого рекомбинантного белка KLK2 компании J&J с последующим SA-PE. Как показано, Т-клетки эффективно экспрессируют CAR к CD33, как измерено проточной цитометрией, тогда как в контрольных Т-клетках, представляющих собой Т-клетки без электропорации mRNA или нераскрытый контрольный CAR (неспецифический по отношению к CD33), наблюдали только фоновое окрашивание.

Пример 5. Уничтожение опухолевых клеток с помощью CAR-Т-клеток к CD33

Совместное культивирование для анализа цитотоксичности на основе CellTrace Violet (CTV, Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу C34557) с использованием проточного цитометра проводили следующим образом.

Т-клетки получали следующим образом. Через двадцать четыре часа после ЕР Т-клетки подсчитывали и ресуспендировали при концентрации, необходимой для получения наиболее концентрированного/необходимого E:T. Т-клетки добавляли при 100 мкл/лунка анализа ($2x10^6$ клеток/мл; высевали 100 мкл в лунку при соотношении 10:1 E:T, т. е. 2E5 Т-клеток на 2E4 клеток-мишеней). Получали исходный раствор с концентрацией 10:1 E:T, с двукратными серийными разбавлениями полной средой для Т-клеток (Optimizer w/CTS, 5% человеческой сыворотки, 1% GlutaMax) до 0,3125:1. Т-клетки высевали (100 мкл/лунка) в трех повторностях с использованием 96-луночного круглодонного планшета для обработки культуры ткани.

Меченные CTV клетки-мишени получали следующим образом. 20 мкл DMSO добавляли во флакон с окрашивающим раствором CTV. Этот исходный раствор разбавляли в 20 мл PBS (подогретого до 37°C) для получения 5 мкМ окрашивающего раствора. 10E6 опухолевых клеток собирали, дважды промывали с помощью PBS и ресуспендировали в 4E6/мл (2,5 мл). Добавляли равный объем (2,5 мл) окрашивающего раствора CTV. Клетки инкубировали в течение 20 минут в инкубаторе при 37°C. К клеткам добавляли 40 мл PRMI + 20% FBS для поглощения несвязавшегося красителя. Клетки инкубировали в течение 5 минут. Клетки повторно центрифугировали в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок ресуспендировали в предварительно прогретой среде RPMI + 10% FBS. Тем временем, Т-клетки высевали при необходимом соотношении E/T, описанном выше. Линии опухолевых CD33+ клеток и линии опухолевых CD33- клеток пересчитывали, а затем клетки ресуспендировали в 2E5/мл и 100 мкл в двух повторностях. Клетки инкубировали совместно с линиями меченых опухолевых клеток в плоскодонном 96-луночном планшете.

Анализ цитотоксичности проводили следующим образом с использованием проточного цитометра. После 20 часов совместного культивирования все клетки переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном и промывали. После 20 часов совместного культивирования все клетки собирали из плоскодонного 96-луночного планшета и переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном, а затем промывали. Во все лунки добавляли 30 мкл 0,25% трипсина и инкубировали в течение 5 минут в инкубаторе при 37°C. Через 5 минут все опухолевые клетки собирали в 96-луночный планшет с U-образным дном. Клетки центрифугировали и промывали в

течение 5 минут при 400 x g дважды. Затем клеточный осадок ресуспендировали в разбавленном (1:1000) красителе LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR (100 мкл). Клетки инкубировали в течение 30 минут при 4°C и дважды промывали буфером FACS с помощью центрифугирования в течение 5 минут при 400 x g. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут с использованием 100 мкл буфера для фиксации BD Cytofix™ (50 мкл буфера FACS + 50 мкл буфера для фиксации). Клетки центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g один раз. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере FACS. После окончания инкубационного периода окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии. Процентную долю цитотоксической активности рассчитывали с использованием следующего уравнения:

% специфической гибели = % Near IR+CTV+ (мертвых) клеток - % спонтанных Near IR+CTV+/(100% - % спонтанных Near IR+CTV+ (мертвых) клеток) x 100%.

Через двадцать четыре часа после временной трансфекции клетки-мишени (CD33-положительные клетки Vcap и CD33-отрицательные клетки DU145) метили флуоресцентным красителем Cell Trace Violet (CTV), а затем совместно культивировали с CAR-T-клетками к CD33. Имитационные Т-клетки служили в качестве отрицательного эффекторного контроля. Клетки совместно культивировали в течение 20 часов при соотношениях эффекторных и клеток-мишеней (E/T) от 0,3125:1 до 10:1. Процентное уничтожение измеряли как соотношение абсолютного числа живых (отрицательных по красителю на жизнеспособность) клеток-мишеней (CTV положительных), оставшихся в совместной культуре, и числа живых клеток-мишеней, культивированных без CAR-T-клеток. Как показано, CAR-T-клетки к CD33 специфически и эффективно лизируют линии раковых CD33(+) клеток человека, но не CD33(-) клетки, при соотношениях E/T от 10:1 до 0,3125:1, тогда как у Т-клеток, которые были имитационными или обработанными CAR к CD33, наблюдали только фоновую цитотоксичность.

CAR-T-Клетки к CD33 также тестировали в отношении цитотоксичности в режиме реального времени с использованием системы анализа клеток в режиме реального времени xCELLigence в качестве анализа эффективности для опосредованного иммунными клетками цитолиза клеток-мишеней.

В каждую лунку 96-луночного планшета E-Plates (ACEA Biosciences) добавляли 50 мкл среды для культивирования раковых клеток-мишеней, измеряли фоновый импеданс и отображали его в виде клеточного индекса. Затем адгезивные

CD33(+) и CD33(-) клетки-мишени диссоциировали, высевали с плотностью 5E4 (VCap), 5E3 клеток/лунка E-Plate в объеме 100 мкл и обеспечивали их пассивное прилипание к поверхности электрода. После посева E-Plate выдерживали при температуре окружающей среды в вытяжном шкафу с ламинарным потоком в течение 30 минут, а затем переносили в прибор RTCA MP в инкубаторе для клеточных культур. Регистрацию данных начинали немедленно с 15-минутными интервалами в течение всего времени (96 часов) эксперимента.

В момент начала обработки (через 24 часа после посева раковых клеток) сбор данных приостанавливали, из каждой лунки удаляли 50 мкл среды и добавляли эффекторные CAR-T-клетки при различных соотношениях эффектора и мишени (E:T) в объеме 50 мкл. CAR-T к CD33(+) и нераскрытые контрольные CAR (неспецифические по отношению к CD33) Т-клетки ресуспендировали. Затем осуществляли двукратные разбавления в двух повторностях в 96-луночном планшете (соотношения E/T от 5:1 до 0,156:1). К клеткам-мишеням также добавляли контрольные мишени плюс эффекторы (Т-клетки без электропорации РНК).

CD33(+) и CD33(-) клетки-мишени инкубировали с имитацией, 10 мкг mRNA электропорировали (через 24 часа после трансфекции) в CD33(+) и CD33(-) CAR-T-клетки при различных соотношениях E/T в течение приблизительно 72 часов. Строили графики нормализованного клеточного индекса (CI) для CD33(+) и CD33(-). При одиночном посеве клетки-мишени прилипали к планшету и пролиферировали, повышая показания CI.

Пример 6. Продуцирование цитокина CAR-T-клетками к CD33

IFN-γ, продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, позволяет осуществлять иммунный надзор за опухолями, который может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных опухолей *in vivo* и *in vitro.* Чтобы определить, способны ли CAR-T-клетки к CD33 распознавать и активироваться опухолевыми CD33 (+) клетками, собирали надосадочную жидкость при анализе уничтожения на основе xCELLigence, как описано в примере 5. Через приблизительно 70 часов совместного культивирования надосадочную жидкость собирали и анализировали с помощью ELISA в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к набору ELISA (Human IFN-γ ELISA MAX™ Deluxe, BioLegend, № по каталогу 430106).

Происходило продуцирование IFN-γ антиген-стимулированными CAR-T-клетками. CAR к CD33 и контрольные CAR-T-клетки секретировали IFN-γ во время совместного культивирования с экспрессирующими CD33 клетками в зависимости от соотношения E:T, но не во время совместного культивирования с отрицательными по CD33 клетками. Нераскрытые контрольные CAR секретировали гораздо большее количество IFN-γ из-за гораздо более высокого уровня экспрессии антигена, чем CD33.

Пример 7. Уничтожение опухолевых клеток с помощью CAR-T-клеток к CD33

CAR-T-Клетки к CD33 оценивали в режиме реального времени в анализе уничтожения опухоли IncuCyte в отношении антиген-зависимой цитотоксичности. CAR-T-Клетки к CD33 инкубировали совместно с клетками-мишенями в течение 88 часов при соотношении эффектор:мишень 1:1 или 0,5:1, что было рассчитано на основании данных по экспрессии CAR. Идентифицировали клетки-мишени, которые стабильно экспрессируют красный ядерный краситель, что измеряли системой визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Выполняли следующий расчет: ингибирование роста опухолевых клеток (%) = (исходное количество жизнеспособных клеток-мишеней - текущее количество жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное количество жизнеспособных клеток*100 (%).

Пример 8. Продуцирование цитокина CAR-T-клетками к CD33

Надосадочную жидкость собирали из ночной (около 20 часов) совместной культуры CAR-T-клеток к CD33 с клетками при соотношении E/T 1:1 и анализировали с использованием 13-плексного набора Milliplex Human High Sensitivity T cell (HSTCMAG28SPMX13). CAR-модифицированные Т-клетки к CD33 секретировали цитокины во время совместного культивирования с экспрессирующими CD33 клетками, но минимально для нетрансдуцированных Т-клеток (UTD).

Надосадочную жидкость собирали из ночной (около 20 часов) совместной культуры CAR-T-клеток к CD33 с клетками при соотношении E/T 1:1. CAR-T-клетки к CD33 секретировали IFN-γ во время совместного культивирования с экспрессирующими CD33 клетками, но не во время совместного культивирования с отрицательными по CD33 клетками. В качестве положительных и отрицательных контролей использовали стимулированные CD3/28 гранулами Т-клетки и только Т-клетки, соответственно. Высвобождение IFN-γ CAR-T-клетками к CD33. Показана средняя концентрация IFN-γ ± SD (пг/мл) из культур в двух повторностях. Различные

термически стабилизированные CAR-T-клетки продуцировали разное количество IFN-γ при совместном культивировании с CD33 (+) клетками.

Пример 9. Пролиферация CAR-T-клеток к CD33

CAR-T-Клетки к CD33 оценивали в анализе пролиферации. Пролиферация Т-клеток является важным *in vitro* параметром иммунной функции *in vivo*. Для дальнейшей оценки функции CAR-T-клеток к CD33 метили CAR-T-клетки к CD33 с помощью CTV для оценки пролиферации Т-клеток.

CAR-T-Клетки к CD33 и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили CellTrace Violet (CTV; 5 мкМ) и совместно культивировали с CD33 (+) и CD33 (-) клетками. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, NearIR Live/dead Dye и CAR к CD33. Анализ проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Лимфоциты идентифицировали по CD3 в живых клетках, определяли частоты CAR-T-клеток с разбавлением красителя CTV и маркера активации CD25. При гейтировании по CAR+ Т-клеткам к CD33, как показано, CD33 (+) клетки, но не CD33 (-) клетки, стимулировали все конструкции CAR. В качестве положительных и отрицательных контролей используют стимулированные CD3/28 гранулами Т-клетки и только Т-клетки, соответственно. Только Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферировали, а Т-клетки, стимулированные CD3/28-гранулами, демонстрировали эквивалентный паттерн пролиферации. CAR-T-Клетки к CD33 пролиферировали более интенсивно, чем обработанный CD3/28-гранулами положительный контроль, после 5 дней совместного культивирования с клетками. Различные Т-клетки, сконструированные с помощью конструкций CAR, обладают различной пролиферативной активностью и демонстрируют различные количества CAR-T-клеток. Количества CAR-T-клеток основаны на среднем абсолютном количестве клеток +/- SEM из трех технических повторностей.

Протокол выполняли следующим образом. Опухолевые клетки собирали, дважды промывали с помощью PBS и ресуспендировали в 10E6/мл в PBS, содержащем 100 мкг/мл митомицина С (MMC), в течение 1,5 часа в инкубаторе при 37°C, чтобы блокировать пролиферацию опухолевых клеток. 20 мкл DMSO добавляли во флакон с окрашивающим раствором CTV. 5 мкл раствора разбавляли с помощью 5 мл (1:1000) PBS (подогретого до 37°C) с получением 5 мкМ окрашивающего раствора. Подсчитывали 2E6 Т-клеток, дважды промывали с помощью PBS и ресуспендировали

в 4E6/мл (0,5 мл). Добавляли равный объем (0,5 мл) окрашивающего раствора CTV. Клетки инкубировали в течение 20 минут при 37°C. Затем к клеткам добавляли 4 мл PRMI + 20% FBS для поглощения какого-либо несвязавшегося красителя. Клетки инкубировали в течение 5 минут и центрифугировали в течение 5 минут при 400 x g. Клеточный осадок ресуспендировали в предварительно прогретой среде RPMI + 10% FBS. Т-клетки подсчитывали и высевали 1E5 клеток (100 мкл) в 96-луночные планшеты с плоским дном.

Тем временем опухолевые клетки, обработанные MMC, собирали и подсчитывали через 1,5 часа, а затем ресуспендировали при 1E6/мл. 1E5 клеток (100 мкл) культивировали совместно с Т-клетками в 96-луночном планшете. Т-клетки отдельно и Т-клетки с добавленными в соотношении 3:1 CD3/28-гранулами использовали в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно.

После 5 дней совместного культивирования все клетки собирали из каждой лунки. Клетки центрифугировали и промывали в течение 5 минут при 400 x g дважды, затем окрашивали с помощью CAR к CD33, CD3, CD8 и CD25, Live/dead (Near-IR) в 96-луночном планшете с U-образным дном. После промывки все клетки фиксировали в течение 10 минут с использованием 100 мкл BD Cytofix™ Fixation Buffer (50 мкл буфера FACS +50 мкл буфера для фиксации). После окончания инкубационного периода окрашенные образцы анализировали с помощью многоцветной проточной цитометрии.

Анализ данных проводили следующим образом. Получали гистограмму CTV. Гейт по неразбавленному CTV устанавливали таким образом, чтобы охватить крайний правый пик (CTV яркий) Т-клеток, культивируемых отдельно, а гейт по разбавленному CTV устанавливали, чтобы охватить остальную популяцию. Это применяли ко всем образцам.

Пример 10. Характеристика CAR-T-клеток, трансдуцированных CAR17, CAR18, CAR19 или CAR20

Созданные CAR-T клетки оценивали в репортерном анализе JNL в отношении антиген-зависимой активности. Вкратце, клетки Jurkat, содержащие ген люциферазы, управляемый сигнально-респонсивным промотором NFAT (называемые клетками JNL), трансдуцируют конструкциями CAR17 (KL2B413_HL), CAR18 (KL2B413_LH), CAR19 (KL2B359_HL) или CAR20 (KL2B359_LH). Экспрессию

каждого CAR определяли с помощью биотинилированного CD33, а затем стрептавидин-конъюгированного PE.

Связывание между конструкцией CAR к CD33 и ее когнатным клеточным антигеном (CD33 на клетках-мишенях) приводило к экспрессии люциферазы в клетках JNL. Для этого клетки JNL, трансдуцированные тестируемыми конструкциями CAR, или нетрансдуцированные клетки JNL (UTD) культивировали совместно с линиями опухолевых клеток-мишеней и измеряли активность люциферазы как интенсивность люминесценции. Конструкции считали активными, если интенсивность люминесценции превышала в 1,5 раза уровень клеток UTD в присутствии клеток, экспрессирующих антиген. Антиген-зависимую активацию для тестированных конструкций CAR не обнаруживали.

CAR-T клетки опосредуют уничтожение опухолевых клеток антиген-зависимым образом

CAR-T-клетки, трансдуцированные CAR17, CAR18, CAR19 и CAR20, инкубировали совместно с CD33-положительными и CD33-отрицательными клетками в течение 96 часов при соотношении эффекторов и мишеней (ET) 1:1 или 0,5:1, что рассчитывали на основании экспрессии CAR на Т-клетках. Клетки-мишени стабильно экспрессировали красный ядерный краситель, что измеряли системой визуализации IncuCyte в режиме реального времени. Ингибирование роста опухолевых клеток (TGI) (%) = (исходное количество жизнеспособных клеток-мишеней - текущее количество жизнеспособных клеток-мишеней)/исходное количество жизнеспособных клеток*100 (%). Тестируемые CAR-T-клетки достигали приблизительно 100% TGI, тогда как нетрансдуцированный контроль не продемонстрировал TGI. У тестируемых CAR-T-клеток в отрицательных по CD33 клетках TGI не наблюдали.

CAR-T-клетки продуцируют цитокины при стимуляции антигеном

IFN-γ, продуцируемый цитотоксическими Т-клетками, важен для осуществления иммунного надзора за опухолями, который может непосредственно ингибировать пролиферацию и индуцировать апоптоз некоторых злокачественных опухолей *in vivo* и *in vitro*. Чтобы определить, способны ли CAR-модифицированные человеческие Т-клетки к CD33 распознавать и активироваться положительными по CD33 опухолевыми клетками, первичные Т-клетки, трансдуцированные указанными клонами CAR, и контрольные нетрансдуцированные Т-клетки (UTD) совместно культивировали с линиями клеток-мишеней и собирали надосадочную жидкость для измерения концентрации IFN-γ. CAR-T-клетки, трансдуцированные CAR-клетками к

CD33, секретировали IFN-γ при совместном культивировании с клетками LNCaP, рекомбинантно экспрессирующими CD33, а также при совместном культивировании с клетками, экспрессирующими CD33 на очень низком уровне, но не с отрицательными по CD33 клетками.

CAR-T-клетки активируются и активируют маркеры дегрануляции антиген-зависимым образом

Опухолевые клетки могут быть распознаны и уничтожены цитотоксическими лимфоцитами, такими как CD8+ Т-лимфоциты и естественные киллерные (NK) клетки, главным образом посредством иммунной секреции литических гранул, которые убивают опухолевые клетки-мишени. Этот процесс включает слияние мембраны гранулы с цитоплазматической мембраной иммунной эффекторной клетки, что приводит к обнажению поверхности лизосомально-ассоциированных белков, которые обычно присутствуют на липидном бислое, окружающем литические гранулы, таких как CD107a. Поэтому мембранная экспрессия CD107a является маркером активации иммунных клеток и цитотоксической дегрануляции.

Анализ дегрануляции проводили, как описано ниже. Клетки-мишени (5×10^4) совместно культивировали с равным количеством эффекторных клеток в 0,1 мл на лунку в 96-луночном планшете. Контрольные лунки содержали только Т-клетки. Антитело к CD107a (5 мкл на лунку) добавляли в дополнение к 1 мкл/образец моненсина (BD Biosciences) и инкубировали в течение 4 часов при 37°C. Клетки промывали два раза с помощью PBS, окрашивали в отношении экспрессии CAR к CD33, CD3 и CD8 и анализировали на проточном цитометре BD Fortessa.

CAR-T-Клетки к CD33 пролиферируют антиген-зависимым образом

CAR-T-клетки оценивали по их пролиферации с использованием протокола анализа пролиферации Т-клеток, описанного в примере 9. CAR-T-Клетки к CD33 и нетрансдуцированные (UTD) Т-клетки метили CellTrace Violet (CTV; 5 мкМ) и совместно культивировали с положительными по CD33 и отрицательными по CD33 клетками. Через пять дней после совместного культивирования клетки собирали и окрашивали с помощью CD3, CD25, NearIR Live/dead Dye и CAR к CD33. Анализ проточной цитометрии проводили на проточном цитометре Fortessa с программным обеспечением Flowjo. Лимфоциты идентифицировали по CD3 в живых клетках, определяли частоты CAR-T-клеток с разбавлением красителя CTV и маркера активации CD25. При гейтировании по CD3+ Т-клеткам положительные по CD33

клетки, но не отрицательные по CD33 клетки, способствовали пролиферации каждой тестируемой линии CAR-T-клеток. Только Т-клетки без какой-либо стимуляции не пролиферировали, а Т-клетки, стимулированные CD3/28-гранулами, демонстрировали эквивалентный паттерн пролиферации. CAR+ Т-клетки к CD33 пролиферировали более интенсивно, чем обработанный CD3/28-гранулами положительный контроль, после 5 дней совместного культивирования с клетками. Различные тестируемые CAR-Т-клетки обладали различной пролиферативной активностью и демонстрировали различные количества CAR-Т-клеток. Процентная доля пролиферирующих Т-клеток и Т-клеток, экспрессирующих CD25, была основана на среднем абсолютном количестве клеток +/- SEM из двух повторностей.

Пример 11. Создание биспецифических антител к CD33xCD3

Области VH/VL антител к CD33, полученных в вышеприведенных примерах, и области VH/VL антител к CD3 CD3B219 и CD3B376 конструировали в биспецифическом формате, и они экспрессировались в виде IgG1. CD3B219 и CD3B376 конструировали как Fab, а области VH/VL CD33 конструировали как scFv в обеих ориентациях в биспецифические антитела, что давало связывающее CD33 плечо в формате scFv-шарнир-CH2-CH3 и связывающее CD3 плечо в формате тяжелой цепи: VH-CH1-линкер-CH2-CH3 и легкая цепь: VL-CL. В качестве альтернативы, области VH/VL антител к CD3 конструировали как scFv, а области VH/VL антител к CD33 конструировали как Fab. Линкер, который использовали в scFv, представлял собой линкер под **SEQ ID NO: 7.** CD3B219 был описан в патенте США № 9850310.

Мутации T350V_L351Y_F405A_Y407V CH3 конструировали в одну тяжелую цепь, а мутации T350V_T366L_K392L_T394W CH3 конструировали в другую тяжелую цепь. Кроме того, оба связывающих плеча CD33 и CD3 сконструированы с содержанием мутаций сайленсинга Fc-эффектора L235A_L235A_D265S.

Сконструированные цепи экспрессировали и полученные биспецифические антитела очищали стандартными способами. Биспецифические антитела характеризуются связыванием с CD33 и CD3, а также цитотоксичностью *in vitro* и *in vivo*, как описано в данном документе. В **таблице 10** показаны аминокислотные последовательности антител к CD3 CD3B219 и CD3B376

Таблица 10

Антитело	Область	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
CD3B219	HCDR1	TYAMN	108
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYAASVKG	109
	HCDR3	HGNFGNSYVSWFAY	110
	LICDR1	RSSTGAVTTSNYAN	111
	LCDR2	GTNKRAP	112
	LCDR3	ALWYSNLWV	113
	VH (CD3B219VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSS	114
	VL (CD3B219VL)	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	115
CD3B376	HCDR1	NNNAAWS	116
	HCDR2	RTYYRSKWLYDYAVSVKS	117
	HCDR3	GYSSSFDY	118
	LICDR1	TGTSSNIGTYKFVS	119
	LCDR2	EVSKRPS	120
	LCDR3	VSYAGSGTLL	121
	VH (CD3H219)	QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLYDYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWGQGTLVTVSS	122
	VL (CD3L150)	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTK	123

		LTVL	

Пример 12. Созданные биспецифические антитела к CD33xCD3 являются цитотоксическими *in vitro*

Анализ Т-клеточно-опосредованной цитотоксичности использовали для оценки потенциала цитотоксичности созданных биспецифических антител *in vitro*, с использованием визуализации в режиме реального времени на платформе Incucyte. Биспецифические антитела тестировали на клетках положительной по CD33 клеточной линии в присутствии выделенных человеческих CD3+ Т-клеток от здоровых доноров при соотношении (эффектор:мишень) эффектор:мишень (соотношение E:T) 3:1. Гибель клеток в результате апоптоза отслеживали путем измерения сигнала флуоресценции от красителя, который стабильно экспрессируется клетками-мишенями. Биспецифические антитела способствуют зависимому от дозы уменьшению количества жизнеспособных клеток с увеличением времени и, следовательно, индуцируют опосредованную Т-клетками гибель опухолевых клеток. Процент ингибирования опухолевых клеток % = (количество первоначально высеянных опухолевых клеток - текущее количество жизнеспособных опухолевых клеток)/(количество первоначально высеянных опухолевых клеток) *100%.

Пример 13. Получение и характеристика ADC

Антитела или антигенсвязывающие домены, которые связывают CD33, метили различными радиометаллами, такими как In-111, Zr-89, Lu-177 или Ac-225, и проводили оценку биораспределения или эффективности в опухоли in vivo в установленных подкожных (SC) моделях предстательной железы человека, включая LNCaP, VCaP или C4-2B у самцов NOD. Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG, The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, штат Мэн, США) или у мышей Balb-c или SHO Nude. Различные дозы антител или антигенсвязывающих доменов, которые связывают CD33, или изотипных контрольных антител метили различными количествами радиоактивности (10-1000 нКи) и измеряли поглощение опухолью или эффективность.

Пример 14. Тестирование антител к CD33, конъюгированных с лекарственными средствами, в отношении интернализации

Следующие тесты проводили для характеристики степени интернализации антител к CD33 и определения терапевтического эффекта антител к CD33, конъюгированных с лекарственными средствами. Без ограничения конкретной теорией

считается, что интернализация антител к CD33 свидетельствует об увеличении терапевтической пользы антител к CD33 при конъюгировании с радиоактивным изотопом, например In-111, Zr-89, Lu-177 или Ac-225.

Материалы и способы

Культивирование клеток проводили следующим образом. Клетки MOLM-13, Kasumi-1, OCI-AML-3 и HDLM2 культивировали в среде RPMI 1640 (Gibco) с 10% FBS (HiMedia). Клетки окрашивали антителом к CD33 (клон WM53, Biolegend) в насыщающей концентрации для определения плотности рецепторов на каждой линии клеток. Плотность рецепторов определяли с помощью PE-гранул BD Quantibrite (BD Biosciences).

Клетки MOLM-13, Kasumi-1, OCI-AML-3 и HDLM-2 окрашивали на жизнеспособность с помощью фиксируемого фиолетового красителя мертвых клеток (L34955, ThermoFisher) в соответствии с протоколом производителя. Клетки собирали, промывали один раз PBS и затем окрашивали фиксируемым красителем в отношении жизнеспособности при комнатной температуре в течение 30 минут. После инкубации клетки дважды промывали буфером FACS (PBS + 2% FBS). Затем клетки использовали для анализа связывания с тестируемыми антителами. 100000 клеток окрашивали тестируемыми антителами в объеме окрашивания 100 мкл. Антитела для окрашивания разбавляли буфером FACS и инкубировали с клетками в течение 40 минут на льду, затем промывали 2X буфером FACS. Затем тестируемые антитела выявляли с использованием конъюгированного с PE козьего F(ab')2 к IgG человека - Fc (ab98596; Abcam) в течение 40 минут на льду. После промывки данные получали на проточном цитометре Novocyte (ACEA). Клетки гейтировали на FSC/SSC, затем проводили гейтирование живых клеток и дискриминацию дублетов. Данные анализировали с использованием Flow Jo (BD).

Медианные значения интенсивности флуоресценции использовали для построения 4-параметрической кривой нелинейного регрессионного анализа после вычитания MFI только вторичного образца.

Для исследований кинетических показателей связывания при 37°C клетки обрабатывали, как указано выше, для окрашивания тестируемыми антителами. Тестируемые антитела конъюгировали с красителем Alexa Fluor 647 (AF647) с использованием набора для мечения AF647 (A20186, ThermoFisher) с использованием протокола производителя. После добавления антител клетки инкубировали при 37°C в термомиксере (Eppendorf) в течение указанных моментов времени. Затем образцы

фиксировали с использованием Cytofix (BD Biosciences) и регистрировали на Novocyte (ACEA Biosciences). Данные анализировали, как указано выше.

Анализы интернализации антител проводили следующим образом.

Анализ белка A-MMAF проводили следующим образом. Белок A-MMAF приобретали у компании Levena Biopharma. Клетки MOLM-13, Kasumi-1, OCI-AML3 и HDLM2 высевали по 4000 клеток в лунку 96-луночного темного планшета с плоским и прозрачным дном (Corning) в объеме 50 мкл. Исходные растворы антител готовили в 4X концентрации (400 нМ) и серийно разбавляли. 25 мкл каждого разбавления антител добавляли в клетки. Исходный раствор белка A-MMAF также готовили в 4X концентрации (400 нМ) и 25 мкл добавляли в каждую лунку. Лунки с клетками и белком A-MMAF, но без антител, рассматривали как 100% жизнеспособные клетки. Клетки инкубировали с антителами и белком A-MMAF в течение 96 часов. В конце инкубационного периода к клеткам добавляли 100 мкл CellTitre-Glo (Promega) и считывали люминесценцию на устройстве для считывания планшетов Tecan. % жизнеспособности рассчитывали как показано ниже и использовали для построения 4-параметрической кривой нелинейной регрессии с использованием Graph Pad Prism.

$$\% \text{ жизнеспособности} = \frac{\text{клетки + MMAF +Ab}}{\text{клетки + MMAF}} X100$$

Анализ интернализации на основе красителя pHAb проводили следующим образом. Амино-реактивные красители pHAb приобретали у компании Promega. 400 мкг каждого тестируемого антитела конъюгировали с красителями pHAb. Вкратце, амино-реактивный краситель pHAb (Promega, № G9845) восстанавливали в 12,5 мкл DMSO + 12,5 мкл воды (общий объем 25 л) для конечной концентрации 10 мг/мл (11,3 мМ). Реакции конъюгации проводили при 10-кратном молярном избытке красителя.

Реакционная смесь содержала антитело (500 мкг в объеме 250 мкл + 3 мкл красителя pHAb + 30 мкл 0,5 М буфера на основе бората натрия + вода, чтобы конечный реакционный объем составлял 300 мкл. Реакционные смеси инкубировали при 37C в течение 2 ч при перемешивании с последующим гашением путем добавления 1 М Трис, pH 7,5 до конечной концентрации 10 мМ. Меченные красителем образцы заменяли на PBS с помощью колонок Zeba - 2 мл, отсечение 40 кДа (Thermo 87768). Концентрацию антител и значения DAR рассчитывали следующим образом. Измерение концентраций с помощью NanoDrop

- Концентрация pHAb (мкМ) = (поглощение/(EC_pHAb * длина пути)) x 106, где

- поглощение = A532,
- EC_pHAb= 75000.

- Концентрация Ab (мкМ) = (поглощение/(EC-Ab * длина пути)) x 106, где
  - поглощение = A280-(0,256*A532),
    - 0,256 представляет собой поправочный коэффициент для остаточного поглощения pHAb при A280,
  - EC_Ab = 210000.
- Краситель:Ab = конц. pHAb (мкМ)/конц. Ab (мкМ).

Для анализа кинетических показателей меченных красителем pHAb антител к CD33 клетки MOLM-13, Kasumi-1, OCI-AML-3 и HDLM2 инкубировали с 100 нМ конъюгированного с pHAb тестируемого антитела в течение 45 минут на льду. Разбавления антител получали в буфере FACS. После мечения клетки промывали охлажденным буфером FACS и инкубировали при 37˚C в течение указанных моментов времени. В конце инкубационного периода клетки получали на проточном цитометре Novocyte. В каждый момент времени включали неокрашенный образец для учета фоновой флуоресценции.

Результаты

Связывание проводили путем инкубирования клеток с серийными разбавлениями антитела к CD33 при 4˚C с последующим выявлением с помощью PE конъюгированного козьего F(ab')2 к IgG человека - Fc антитела. Данные, показывающие связывание антител к CD33 с линиями клеток-мишеней, представлены на **фиг. 2A** и **2B** в виде графиков, на которых видны профили нелинейной регрессии антител к CD33 человека при 4˚C. Строили графики зависимости медианной интенсивности флуоресценции (MFI) от логарифма концентрации антитела. Верхний хит для каждой клеточной линии обозначен красным цветом, а связывание линтузумаба показано на синих кривых.

Проводили оценку связывания антител к CD33 с линиями клеток-мишеней в зависимости от времени и температуры. Связывание проводили путем инкубирования клеток с серийными разбавлениями непосредственно конъюгированных антител при 37˚C и 4˚C. Данные представлены на **фиг. 3A** и **3B**. На графиках и данных фигурах показаны профили нелинейной регрессии связывания антител к CD33 человека при 37˚C и 4˚C. Построены графики зависимости медианной интенсивности флуоресценции (MFI) от логарифмических концентраций антитела.

Анализировали интернализацию антител к CD33 на линиях клеток-мишеней с высокой, средней и низкой экспрессией. Клетки культивировали с серийными разбавлениями антител к CD33 вместе с белком A-MMAF в течение 96 ч. Через 96 часов к клеткам добавляли реагент CellTitre-Glo для измерения жизнеспособности клеток. Лунки только с белком A-MMAF считали на 100% жизнеспособными. Клетки HDLM-2 использовали в качестве клеточной линии без экспрессии. Результаты показаны на **фиг. 4A-4D**. Снижение жизнеспособности клеток указывает на интернализацию антитела. На графиках показан нелинейный регрессионный анализ жизнеспособности клеток в зависимости от логарифмической концентрации антитела.

Оценивали кинетические показатели интернализации антител к CD33. Антитела к CD33 метили красителями pHAb и инкубировали с клетками при концентрации 100 нМ при 37°C в течение указанных моментов времени, после чего клетки промывали и собирали на проточном цитометре. Результаты показаны на **фиг. 5**, где на графиках представлены значения MFI в указанные моменты времени.

Анализировали экспрессию CD33 на линиях клеток-мишеней. Линии клеток с высокой, средней и низкой экспрессией CD33 идентифицировали с применением антитела к человеческому CD33 от Biolegend. Клетки MOLM-13, Kasumi-1, OCI-AML-3 и HDLM2 окрашивали антителом (оранжевые гистограммы) или изотипическим контролем IgG мыши (синие гистограммы) и рассчитывали кратность изменения по сравнению с изотипом для каждой линии клеток. Данные показаны на **фиг. 6**.

Оценивали целостность антител и значения DAR после конъюгирования с красителями pHAb. Антитела метили красителями pHAb и анализировали на SDS-PAGE. Отношения лекарственного средства к антителу (DAR) рассчитывали путем измерения OD при 280 и 530 нм и поправки на поглощение красителя при 280 нм. Данные показаны на **фиг. 7**.

Определяли специфичность кинетических показателей опосредованной pHAb интернализации антител. Антитела к CD33 метили красителями pHAb и инкубировали с клетками Kasumi-1 или OCI-AML-3 при концентрации 100 нМ при 4°C в течение указанных моментов времени, после чего клетки промывали и обрабатывали на проточном цитометре. Данные показаны на **фиг. 8A**. На графиках показаны значения MFI в указанные моменты времени. При 4°C интернализацию не наблюдали. Антитела также инкубировали с клетками HDLM-2 при 37°C. Данные показаны на **фиг. 8B**. Увеличения MFI не наблюдали.

Анализировали значения EC_{50} связывания антител к CD33 для линий клеток с высокой (MOLM-13), средней (Kasumi-1) и низкой (OCI-AML-3) плотностью рецепторов. Связывание осуществляли при 4°C с серийными разбавлениями антитела. Данные показаны на **фиг. 9**.

Анализировали интернализацию антитела к CD33 на различных линиях клеток-мишенях, при этом данные показаны на **фиг. 10**. Для MOLM-13 и OCI-AML-3 указаны значения EC_{50}. Для Kasumi-1 показан % жизнеспособности при концентрации 100 нМ.

Пример 15. Эффект антител к CD33 в отношении уровней CD33 на клеточной поверхности

Проводили анализ для тестирования эффекта антител к CD33 и биспецифических антител к CD33 в отношении уровня CD33 на клеточной поверхности моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов, Т-клеток и/или микроглии. В анализе антитела к CD33 оценивали по их способности снижать уровни CD33 на клеточной поверхности линии гистиоцитарных лимфомных клеток U937, а также экспрессирующих CD33 клеток CHO, первичных моноцитов человека, первичных макрофагов человека, полученных из моноцитов периферической крови, первичных дендритных клеток человека, полученных из моноцитов периферической крови, микроглиальных клеток человека, полученных из моноцитов периферической крови, и первичных Т-клеток человека.

Микроглиальные клетки человека получали из моноцитов периферической крови с помощью клеточной культуры. Моноциты из образцов периферической крови человека выделяют с использованием антител для выделения моноцитов, дифференцируют в дендритные клетки и культивируют в течение пяти дней. Клетки культивировали в среде, содержащей 10% фетального телячьего рубца при 37°C в 5% CO_2 Неприлипшие клетки собирали и использовали для экспериментов по фагоцитозу. Для получения макрофагов человека моноциты из образцов периферической крови человека выделяли, и их дифференцировали в макрофаги или в дендритные клетки.

Образцы клеток помещают в 200000 клеток на мл в 2 мл RPMI, дополненной 10% Hyclone FBS, 2 мМ глутамина, пенициллином, стрептомицином и незаменимыми аминокислотами. Антитела к CD33 или контрольные изотипы добавляли при 1,0 мкг/мл и инкубировали в течение 24 часов при 37°C с 5% CO_2.

Для оценки динамики рецептора обеспечивали связывание антител с клетками в течение часа, а затем промывали. Уровни CD33 на поверхности определяли по

меньшей мере через 24 часа. Экспрессию рецепторов на поверхности клеток определяли с помощью анализа FACS. Клетки инкубировали с антителом к CD33, конъюгированным с FITC, и с контрольным поверхностным маркером. Клетки промывали 2× в буфере FACS (PBS + 2% FBS, 2 мМ EDTA) и проводили проточную цитометрию. Для анализа данные рассчитывали как процент экспрессии рецептора в отсутствие антитела с использованием значений WI для соответствующих флуорофоров.

Пример 16. Анализ антител к CD33 и биспецифических антител к CD33 в отношении индукции или ингибирования фосфорилирования сигнальных молекул

Различные клетки (например, клетки J774, RAW 264.7, BMM, первичные моноциты человека, макрофаги, дендритные клетки, Т-клетки, микроглия или остеокласты) культивировали по отдельности. Клетки удаляли из культуральных чашек и подсчитывали. Затем клетки инкубировали с (i) антителом к CD33, (ii) биспецифическим антителом CD33 или (iii) изотипно совпадающим контрольным антителом. Затем клетки лизировали и центрифугировали для удаления нерастворимых материалов. В каждой надосадочной жидкости проводили реакцию иммунопреципитации с одним или несколькими различными антителами к каждому из DAP12, ERK, AKT, белка A-агарозы и белка G-агарозы. Гранулы интенсивно промывали буфером RIPA. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE), а затем переносили на нитроцеллюлозные мембраны с помощью вестернблоттинга. Затем гранулы инкубировали с антителами, специфически распознающими фосфорилированный тирозин или фосфорилированную форму DAP12, ERK, Syk, LCK, FYN, C-Cbl, VAV или AKT. Гранулы визуализировали с помощью системы усиленной хемилюминесценции (ECL) для количественной оценки степени фосфорилирования DAP12, ERK, Syk, LCK, FYN, C-Cbl, VAV и AKT.

Пример 17. *In vivo* анализ противоракового эффекта антител и/или биспецифических антител к CD33

Группам из 10 мышей в возрасте 8 недель (+/-2 недели), либо обычным мышам, либо мышам, надэкспрессирующим ген CD33 человека, подкожно вводили опухолевые клетки (например, от 1×10^5 до 1×10^6 клеток MC38, Lewis Lung или B16),

суспендированные в 1,00 мкл PBS. Перед имплантацией мышей анестезировали изофлураном. Начиная с дня 2, группам мышей инъецировали i.p. каждые 3 дня всего 4 дозы по 200 мкг каждого из антагонистических антител к CD33. Рост опухоли отслеживали с помощью штангенциркуля раз в две недели для измерения роста опухоли, начиная с дня 4. Конечной точкой эксперимента являлся объем опухоли 2000 $мм^3$ или 60 дней. Рост опухоли и % выживаемости являются показателями результата. Если антитело к CD33 обладало противораковым эффектом, то наблюдали одно или несколько из следующих явлений: уменьшение объема и скорости роста опухоли, уменьшение количества инфильтрирующих опухоль иммунных макрофагов-супрессоров и увеличение притока эффекторных Т-клеток в опухоль.

Пример 18. Антитело к TRGV9 и биспецифические антитела к CD33

Проводили стимуляцию и экспансию γ/δ Т-клеток. Экспансию Vγ9-Vδ2 Т-клеток проводили путем обработки PBMC в полной среде RPMI, содержащей rhIL-2 (1000 МЕ/мл), rhIL-15 (10 нг/мл) и золедроновую кислоту (5 мкМ) в течение 14 дней.

De novo секвенирование моноклональных антител к Vγ9 проводили следующим образом. Мышиный IgG1 к человеческому рецептору Т-клеток клон 7A5 к TRGV9 получали от Abcam (№ по каталогу ab171109). Получение образцов и LC-MS/MS анализ были выполнены компанией Lake Pharma (Сан-Карлос, штат Калифорния, США). Образец восстанавливали и алкилировали, делили на семь аликвот и протеолитически расщепляли с помощью ферментов трипсин/LysC, химотрипсин, LysC, пепсин, AspN, эластаза и протеиназа K. Полученные пептиды обессоливали с использованием ZipTip C18 Pipette Tips и разделяли в режиме on-line с помощью обращенно-фазовой хроматографии. Масс-спектрометрию проводили на спектрометре Thermo Q-Exactive с использованием HCD-фрагментации. Наборы данных MS анализировали с использованием программного обеспечения PEAKS путем сопоставления меток последовательности *de novo* с базой данных последовательностей антител на основе IMGT. Гэпы в последовательности назначали с помощью сборки последовательности Contig из пептидов, идентифицированных *de novo*. Все CDR и гипермутации подтверждали путем проверки спектров MS/MS.

Последовательности четырех моноклональных антител, созданных в соответствии с вышеизложенным, а также их последовательности CDR представлены в таблицах 11-15 ниже.

Таблица 11. Последовательности CDR mAb к TRGV9 (LP7A5_1)

Антитело	**HCDR1**	**SEQ ID NO:**	**HCDR2**	**SEQ ID NO:**	**HCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_1	DHYIN	236	QIYPGDGNTYYNQKFKG	237	NYGDYTIDF	238
Антитело	**LCDR1**	**SEQ ID NO:**	**LCDR2**	**SEQ ID NO:**	**LCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_1	KSSQSLLYSSNQKNYLA	239	WASTRES	240	QQYYRYHT	241

Таблица 12. Последовательности CDR mAb к TRGV9

Антитело	**HCDR1**	**SEQ ID NO:**	**HCDR2**	**SEQ ID NO:**	**HCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_2	DHYIN	236	QIYPGDGNTYYNQKFKG	237	NMGMYTIDF	242
Антитело	**LCDR1**	**SEQ ID NO:**	**LCDR2**	**SEQ ID NO:**	**LCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_2	KSSQSLLYSSNQKNYLA	239	WASTRES	240	QQYYRYHT	241

Таблица 13. Последовательности CDR mAb к TRGV9

Антитело	**HCDR1**	**SEQ ID NO:**	**HCDR2**	**SEQ ID NO:**	**HCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_3	DHYIN	236	QIYPGDGNTYYNQKFKG	237	NMGMYTLDF	243
Антитело	**LCDR1**	**SEQ ID NO:**	**LCDR2**	**SEQ ID NO:**	**LCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_3	KSSQSLLYSSNQKNYLA	239	WASTRES	240	QQYYRYHT	241

Таблица 14. Последовательности CDR mAb к TRGV9

Антитело	**HCDR1**	**SEQ ID NO:**	**HCDR2**	**SEQ ID NO:**	**HCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_4	DHYIN	236	QIYPGDGNTYYNQKFKG	237	NYGDYTLDF	244
Антитело	**LCDR1**	**SEQ ID NO:**	**LCDR2**	**SEQ ID NO:**	**LCDR3**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_	KSSQSLLYSSNQK	239	WASTRES	240	QQYYRY	241

Антитело	**HCDR1**	**SEQ ID NO:**	**HCDR2**	**SEQ ID NO:**	**HCDR3**	**SEQ ID NO:**
4	NYLA				HT	

Таблица 15. Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи mAb к TRGV9

mAb	**Аминокислотная последовательность тяжелой цепи (последовательности CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)**	**SEQ ID NO:**
LP7A5_1	EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFT**DHYIN**WVKQRTG QGLEWIG**QIYPGDGNTYYNQKFKG**KATLTADKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCAP**NYGDYTIDF**WGQGTSVTVSS	245
LP7A5_2	EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFT**DHYIN**WVKQRTG QGLEWIG**QIYPGDGNTYYNQKFKG**KATLTADKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCAP**NMGMYTIDF**WGQGTSVTVSS	246
LP7A5_3	EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFT**DHYIN**WVKQRTG QGLEWIG**QIYPGDGNTYYNQKFKG**KATLTADKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCAP**NMGMYTLDF**WGQGTSVTVSS	247
LP7A5_4	EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFT**DHYIN**WVKQRTG QGLEWIG**QIYPGDGNTYYNQKFKG**KATLTADKSSSTAYMQLS SLTSEDSAVYFCAP**NYGDYTLDF**WGQGTSVTVSS	248
	Аминокислотная последовательность легкой цепи	**SEQ ID**

		NO:
LP7A5_1	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC**KSSQSLLYSSNQKNYLA**WYQQKPGQSPKLLIY**WASTRES**GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC**QQYYRYHT**FGTGTKLEIK	249

Получение биспецифического антитела к Vγ9 x CD33 выполняли следующим образом. Последовательность вариабельной области 7A5 (антитела к TRGV9) и C33B904 (антитела к CD33) использовали для создания биспецифического антитела, подлежащего тестированию в отношении перенаправленного уничтожения Т-клетками клеток острого миелоидного лейкоза (AML). Биспецифические антитела VG4 (антитело к TRGV9 x CD33) и VG3 (антитело к TRGV9 x Null) получали как полноразмерные антитела в формате "выступы-во-впадины" как IgG4 человека. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие вариабельные области, субклонировали в специально созданные векторы экспрессии млекопитающих, содержащие константную область кассет экспрессии IgG4 человека, с использованием стандартных методик клонирования на основе стандартных ферментов рестрикции при ПЦР и подтверждали секвенированием. Биспецифические антитела экспрессировали путем временной трансфекции в линии клеток яичника китайского хомячка (CHO). Последовательности биспецифических антител, экспрессированных в клетках CHO, представлены в таблице 16 ниже.

Таблица 16. Последовательности антител, экспрессированных в клетках CHO

ID mAb	**Аминокислотная последовательность плеча "выступа" и плеча "впадины"**	**SEQ ID NO:**
антитело к TRGV9 (плечо "впадины")	MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC KSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYRYHTFGTGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKSTE GKSSGSGSESKSTGGSEVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGF TFTDHYINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGDGNTYYNQKFKGKAT LTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAPNYGDYTIDFWGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLGK	250
антитело к CD33 (плечо "выступа")	MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVMTQSPDSLAVSLGERATINC KSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWASTRKSGVP DRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSTPYTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKST EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASG FTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGR FTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSPYGDFFDYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP	251

ID mAb	**Аминокислотная последовательность плеча "выступа" и плеча "впадины"**	**SEQ ID NO:**
	EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	
антитело к RSV (плечо "выступа")	MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSTDLDYWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	252

Антитела изначально очищали с помощью колонки Mab Select SuRe Protein A (GE Healthcare). Колонку уравновешивали с помощью PBS, pH 7,2 и загружали ферментационной надосадочной жидкостью со скоростью потока 2 мл/мин. После загрузки колонку промывали 4 объемами колонки PBS с последующим элюированием

в 30 мМ ацетате натрия, pH 3,5. Фракции, содержащие белковые пики, отслеживаемые по поглощению при 280 нм, объединяли и нейтрализовали до pH 5,0 добавлением 1% 3 М ацетата натрия pH 9,0. Биспецифические mAb далее очищали на препаративной колонке Superdex 200 10/300 GL (GE healthcare) для эксклюзионной хроматографии (SEC), уравновешенной буфером PBS. Целостность образца оценивали путем измерения содержания эндотоксина и SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Репрезентативный гель для VG68 показан на фиг. 12. Конечные концентрации белка составляли 1,0 мг/мл для антител к TRGV9/антител к CD33 и 1,0 мг/мл для антител к TRGV9/Null. Конечные уровни EU для антител к TRGV9/антител к CD33 и антител к TRGV9/Null на их основе составляли < 3,0 EU/мг.

Оценивали связывающую активность антитела к CD33 на линиях клеток-мишеней. Связывание клона C33B904 антитела к CD33 с панелью линий CD33+ клеток измеряли с помощью FACS. EC50 и EC90 рассчитывали для MOLM-13 (фиг. 13), Kasumi-1 (фиг. 14) и OCI-AML-3 (фиг. 16).

Характеристику Vγ9+ (γδ) Т-клеток и всех Т-клеток проводили следующим образом. Золедроновую кислоту использовали для селективного размножения $V\gamma9^+$ γδ Т-клеток из цельных PBMC. PBMC выделяли из цельных свежих PBMC с использованием набора для выделения человеческих $T\gamma\delta^-$ Т-клеток EasySep™ (Stem cell Technologies; Ванкувер, Канада) в соответствии с инструкциями производителя. Выделенные PBMC культивировали в среде RPMI-10 (RPMI, дополненной 10% FBS, 1x пенициллином/стрептомицином) с рекомбинантным человеческим IL-2 (rhIL-2) в конечной концентрации 1000 международных ед./мл, рекомбинантным человеческим IL-15 (rhIL-15) в конечной концентрации 10 нг/мл и золедроновой кислотой в конечной концентрации 5 мкМ в течение 14 дней.

Оценку связывания и цитотоксических свойств биспецифического антитела к TRGV9/к CD33 с использованием клеток Kasumi-3 и человеческих γδ Т-клеток проводили следующим образом. Обогащенные γδ Т-клетки (эффекторы), выделенные из PBMC, культивированные с золедроновой кислотой + IL-2 + IL-15 в течение 12 дней, совместно культивировали с меченными CFSE клетками Kasumi-3 (мишени) в соотношениях 1:1 и 5:1 E:T в присутствии различных концентраций биспецифического антитела в течение 24 часов. Кривые зависимости ответа от дозы показывают опосредованную биспецифическими антителами к TRGV9/к CD33 и к TRGV9/к NULL цитотоксичность γδ Т-клеток против экспрессирующих CD33 клеток kasumi-3 зависимым от дозы образом при соотношениях 1:1 (фиг. 6) и 5:1 (фиг. 7) E:T.

Представленные в данном документе значения цитотоксичности вычитали из исходного значения цитотоксичности, наблюдаемого в отсутствие биспецифического антитела. Значения EC_{50} рассчитывали, как описано в способах. Репрезентативные данные одного эксперимента представлены на **фиг. 16-17**, из которых видно, что биспецифическое антитело к TRGV9/к CD33 опосредует цитотоксичность γδ Т-клеток против экспрессирующих CD33 клеток Kasumi-3 *in vitro*.

PBMC здоровых доноров (эффекторы), культивированные с золедроновой кислотой + IL-2 + IL-15 в течение 12 дней, совместно культивировали с меченными CFSE клетками MOLM-13 (мишени) в отношениях 1:1 E:T в присутствии различных концентраций биспецифического антитела в течение 24 часов. На **фиг. 18** показано, что биспецифическое антитело к TRGV9/к CD33 опосредует цитотоксичность γδ Т-клеток (из цельных PBMC) против экспрессирующих CD33 клеток MOLM-13 *in vitro*. Из кривых зависимости ответа от дозы на **фиг. 18** видно, что биспецифические антитела к TRGV9/к CD33 и к TRGV9/к NULL опосредуют цитотоксичность γδ Т-клеток против экспрессирующих CD33 клеток kasumi-3 зависимым от дозы образом. Представленные в данном документе значения цитотоксичности вычитали из исходного значения цитотоксичности, наблюдаемого в отсутствие биспецифического антитела. Значения EC_{50} рассчитывали, как описано в способах. Представленные в данном документе репрезентативные данные получены в одном эксперименте.

Пример 19. *In silico* анализ и конструирование библиотеки NKK

In silico анализ доменов VH и VL, идентифицированных в данном документе, проводили для оценки потенциала этих доменов VH и VL подвергаться посттрансляционным модификациям (PTM). Создавали библиотеку NNK в определенных сайтах PTM и подвергали скринингу для определения эффектов мутации аминокислот в потенциальной PTM.

Потенциальные риски PTM определяли с использованием инструмента анализа внутренней последовательности, сфокусированного на идентификации мотивов, включая NG, DG и DP. Для первого и второго положений каждого мотива конструировали библиотеки насыщающего мутагенеза NNK. В библиотеке NNK использовали кодоны (N=A, G, C, T; K=G, T) таким образом, чтобы все 20 аминокислот были представлены в библиотеке. Библиотеки клонировали в плазмиду экспрессии *E. coli* путем инфузионного клонирования. Библиотеки высевали и

выделяли колонии, представляющие подвергнутые мутации PTM. На **фиг. 19** показан *in silico* анализ PTM, при этом PTM, отобранные для библиотеки NNK, показаны в рамках.

Пример 20. Тестирование термостабильности вариантов scFv, полученных из библиотеки NNK

Оценивали термостабильности исходных и подверженных мутации клонов scFv, полученных в примере 19. Культуры исходных клонов и библиотек мутагенеза инокулировали и выращивали в течение ночи. Экспрессию индуцировали и надосадочные жидкости анализировали с помощью ELISA. CD33 высевали на 96-луночные планшеты и проводили ELISA связывания. Надосадочные жидкости разделяли на 4 отдельных планшета для нагревания. Для оценки термостабильности анализ проводили при отсутствии обработки, комнатная температура, 55°C, 60°C, 65°C. Сигналы люминесценции нормализовали по необработанному находящемуся при комнатной температуре тому же клону.

На **фиг. 20** показана термостабильность scFv, полученных из библиотеки NNK на основе C33B1475 (SEQ ID NO: 277). На **фиг. 21** показана термостабильность scFv, полученного из библиотеки NNK на основе C33B1516 (SEQ ID NO: 278). На **фиг. 22** показана термостабильность scFv, полученных из библиотеки NNK на основе C33B1517SEQ (SEQ ID NO: 216). На **фиг. 23** показана термостабильность scFv, полученного из библиотеки NNK на основе C33B1522 (SEQ ID NO: 213). На **фиг. 24** показана таблица с предпочтительными остатками, идентифицированными в ходе скрининга библиотеки NNK.

Эти данные показывают, что удаление потенциальных сайтов PTM путем мутации не ухудшает связывание с CD33 или не снижает термостабильность. Неожиданные улучшения стабильности наблюдали в нескольких клонах scFv.

Пронумерованные варианты осуществления

Настоящее изобретение также представлено следующими пронумерованными вариантами осуществления.

Перечень пронумерованных вариантов осуществления (A)

1) Выделенный белок, который связывает CD33, при этом выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27,

или его связывающий CD33 фрагмент.

2) Выделенный белок по варианту осуществления 1, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;

b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;

c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;

d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;

e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;

f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или

g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

3) Выделенный белок по вариантам осуществления 1 или 2, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

4) Выделенный белок по варианту осуществления 3, где выделенный белок представляет собой VHH.

5) Выделенный белок по варианту осуществления 3, где выделенный белок представляет собой Fab.

6) Выделенный белок по варианту осуществления 3, где выделенный белок представляет собой scFv.

7) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-6, где выделенный белок содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

8) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит VHH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27, или его связывающий CD33 фрагмент.

9) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит
a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;
b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;
c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;
d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;
e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;
f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;
g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;
h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;
i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60; или
j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61.

10) Выделенный белок по варианту осуществления 9, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под
a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно; или
j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно.

11) Выделенный белок по варианту осуществления 9 или 10, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88.

12) Выделенный белок по варианту осуществления 11, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

13) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 9-12, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

14) Выделенный белок по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой Fab.

15) Выделенный белок по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой VHH.

16) Выделенный белок по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой scFv.

17) Выделенный белок по варианту осуществления 16, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

18) Выделенный белок по варианту осуществления 17, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

19) Выделенный белок по варианту осуществления 18, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

20) Выделенный белок по варианту осуществления 19, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

21) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 9-20, где выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

22) Выделенный белок по варианту осуществления 21, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

23) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

24) Выделенный белок по варианту осуществления 23, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

25) Выделенный белок по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой Fab.

26) Выделенный белок по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой VHH.

27) Выделенный белок по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой scFv.

28) Выделенный белок по варианту осуществления 27, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

29) Выделенный белок по варианту осуществления 28, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

30) Выделенный белок по варианту осуществления 29, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

31) Выделенный белок по варианту осуществления 30, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

32) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

33) Выделенный белок по варианту осуществления 32, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно;

e) SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно;

f) SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно;

g) SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или

h) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

34) Выделенный белок по варианту осуществления 32 или 33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

35) Выделенный белок по варианту осуществления 34, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;
b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;
c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;
d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;
e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;
f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;
g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;
h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;
i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

36) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 32-35, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

37) Выделенный белок по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой Fab.

38) Выделенный белок по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой VHH.

39) Выделенный белок по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой scFv.

40) Выделенный белок по варианту осуществления 39, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

41) Выделенный белок по варианту осуществления 40, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

42) Выделенный белок по варианту осуществления 41, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

43) Выделенный белок по варианту осуществления 42, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

44) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 32-43, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

45) Выделенный белок по варианту осуществления 44, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

46) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

47) Выделенный белок по варианту осуществления 46, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

48) Выделенный белок по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой Fab.

49) Выделенный белок по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой VHH.

50) Выделенный белок по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой scFv.

51) Выделенный белок по варианту осуществления 50, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

52) Выделенный белок по варианту осуществления 51, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

53) Выделенный белок по варианту осуществления 52, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

54) Выделенный белок по варианту осуществления 53, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

55) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-54, где белок конъюгирован с удлиняющим период полужизни фрагментом.

56) Выделенный белок по варианту осуществления 55, где удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбуминсвязывающий домен или полиэтиленгликоль.

57) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-56, где выделенный белок представляет собой моноспецифический белок.

58) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-57, где выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

59) Выделенный белок по варианту осуществления 58, где мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

60) Выделенный белок по варианту осуществления 59, где мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

61) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-60, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig.

62) Выделенный белок по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

63) Выделенный белок по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

64) Выделенный белок по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

65) Выделенный белок по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

66) Выделенный белок по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3.

67) Выделенный белок по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

68) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-67, содержащий связывающий CD33 антигенсвязывающий домен, который конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

69) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-67, содержащий связывающий CD33 антигенсвязывающий домен, который конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

70) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-69, содержащий связывающий CD33 антигенсвязывающий домен, который конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2).

71) Выделенный белок по варианту осуществления 70, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

72) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 58-71, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците.

73) Выделенный белок по варианту осуществления 72, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

74) Выделенный белок по варианту осуществления 72, где Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

75) Выделенный белок по варианту осуществления 72, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

76) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 58-75, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

77) Выделенный белок по варианту осуществления 76, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

78) Выделенный белок по варианту осуществления 77, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

79) Выделенный белок по варианту осуществления 76, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9.

80) Выделенный белок по варианту осуществления 79, где антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

81) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-80, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

82) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-81, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания белка с Fcγ рецептором (FcγR).

83) Выделенный белок по варианту осуществления 82, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

84) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-81, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

85) Выделенный белок по варианту осуществления 84, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбрана из

группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

86) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 82-85, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

87) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-86, где константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

88) Выделенный белок по варианту осуществления 87, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

89) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 61-88, где белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

90) Выделенный белок по варианту осуществления 89, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

91) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-54, где белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

92) Выделенный белок по варианту осуществления 91, где CAR содержит

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по любому из вариантов осуществления 1-54;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

93) Выделенный белок по варианту осуществления 91 или 92, где CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

94) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 91-93, где

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

95) Выделенный белок по любому из вариантов осуществления 91-93, где

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

96) Выделенный белок по варианту осуществления 95, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки или любых их комбинаций.

97) Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-96 и фармацевтически приемлемый носитель.

98) Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-96.

99) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 98.

100) Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 99.

101) Способ получения выделенного белка по любому из вариантов осуществления 1-96, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления

100 в условиях, при которых экспрессируется белок, и извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

102) Антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком по любому из вариантов осуществления 1-96.

103) Набор, содержащий выделенный белок по любому из вариантов осуществления 1-96.

104) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта.

105) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

106) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

107) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33.

Перечень пронумерованных вариантов осуществления (B)

1) Выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита.
2) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 1, где антиген лимфоцита представляет собой антиген Т-клетки.
3) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 1, где антиген Т-клетки представляет собой антиген $CD8^+$ Т-клетки.
4) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 1, где антиген лимфоцита представляет собой антиген NK-клетки.
5) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-4, где антиген лимфоцита представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.
6) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 5, где антиген лимфоцита представляет собой CD3ε.

7) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-6, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

8) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 7, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат Fab.

9) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 7, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат VHH.

10) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 7, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv.

11) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 10, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

12) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 11, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

13) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 12, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

14) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 13, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

15) Выделенный мультиспецифический по любому из вариантов осуществления 1-14, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 под любым из SEQ ID

NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11 и HCDR3 под любым из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

16) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-15, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;
b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;
c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;
d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;
e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;
f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или
g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно,

или его связывающий CD33 фрагмент.

17) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-16, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

18) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 или 74 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79 или 80.

19) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14 и 18, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

20) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14, 18 и 19, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

21) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14 и 18-20, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

22) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199.

23) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14 и 22, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;
b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;
c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;
d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;
e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;
f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно; или

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

24) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14, 22 и 23, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

25) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-14 и 22-24, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

26) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-25, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) HCDR1 под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, LCDR1 под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

27) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-25, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

28) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-27, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

29) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 28, дополнительно содержащий второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

30) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 29, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

31) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 27-29, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

32) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 28-31, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR.

33) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 32, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

34) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 28-31, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ рецептором (FcγR).

35) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 34, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

36) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 32-35, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

37) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 28-36, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

38) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 37, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

39) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 28-38, содержащий по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

40) Выделенный мультиспецифический белок по варианту осуществления 39, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A,Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

41) Выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 28-40, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

a) L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig или

b) L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

41) Набор, содержащий выделенный мультиспецифический белок по любому из вариантов осуществления 1-41.

42) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта.

43) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

44) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

45) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33.

Перечень пронумерованных вариантов осуществления (C)

1) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, конъюгированный со средством, где выделенный белок связывает CD33, при этом выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27,

или его связывающий CD33 фрагмент.

2) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под
   a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;
   b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;
   c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;
   d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;
   e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;
   f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или
   g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.
3) Иммуноконъюгат по вариантам осуществления 1 или 2, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.
4) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 3, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой VHH.
5) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 3, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой Fab.
6) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 3, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv.
7) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-6, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.
8) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, конъюгированный со средством, где выделенный белок связывает CD33, при этом выделенный белок содержит VHH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.
9) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, конъюгированный со средством, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит
   a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;
   b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;
   c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;
   d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;
   e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;
   f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61.

10) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 9, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно.

11) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 9 или 10, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88.

12) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 11, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или
j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

13) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 9-12, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

14) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой Fab.

15) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой VHH.

16) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой scFv.

17) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 16, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

18) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 17, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

19) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 18, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

20) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 19, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

21) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 9-20, где выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

22) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 21, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

23) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, конъюгированный со средством, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

24) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 23, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

25) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой Fab.

26) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой VHH.

27) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой scFv.

28) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 27, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

29) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 28, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

30) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 29, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

31) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 30, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

32) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, конъюгированный со средством, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

33) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 32, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно;

e) SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно;

f) SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно;

g) SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или

h) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

34) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 32 или 33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

35) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 34, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

36) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 32-35, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

37) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой Fab.

38) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой VHH.

39) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой scFv.

40) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 39, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

41) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 40, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

42) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 41, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

43) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 42, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

44) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 32-43, где выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

45) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 44, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

46) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок, конъюгированный со средством, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит
a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;
b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;
c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;
d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;
e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;
f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;
g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;
h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или
i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

47) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 46, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

48) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой Fab.

49) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой VHH.

50) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой scFv.

51) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 50, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

52) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 51, где L1 содержит
a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

53) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 52, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

54) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 53, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

55) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-54, где выделенный белок конъюгирован с удлиняющим период полужизни фрагментом.

56) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 55, где удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбуминсвязывающий домен или полиэтиленгликоль.

57) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-56, где выделенный белок представляет собой моноспецифический белок.

58) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-57, где выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

59) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 58, где мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

60) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 59, где мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

61) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-60, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig.

62) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

63) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

64) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

65) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

66) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3.

67) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

68) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-67, где выделенный белок конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

69) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-67, где выделенный белок конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

70) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-69, где выделенный белок конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2).

71) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 70, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

72) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 58-71, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците.

73) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 72, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

74) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 72, где Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

75) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 72, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

76) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 58-75, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

77) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 76, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

78) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 77, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143,

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

79) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 76, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9.

80) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 77, где антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9 содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

81) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-80, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

82) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-81, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания белка с Fcγ рецептором (FcγR).

83) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 82, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

84) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-81, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

85) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 84, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

86) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 80-85, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

87) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-86, где константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

88) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 87, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

89) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 61-88, где выделенный белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

90) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 89, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

91) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-54, где выделенный белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

92) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 91, где CAR содержит

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, определяемый в любом из вариантов осуществления 1-54;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

93) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 91 или 92, где CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

94) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 91-93, где

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

95) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 91-93, где

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

96) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 95, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки или любых их комбинаций.

97) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-96, где средство представляет собой терапевтическое средство или визуализирующее средство.

98) Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-96 и фармацевтически приемлемый носитель.

99) Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-96.

100) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 99.

101) Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 100.

102) Способ получения иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 1-96, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 101 в условиях, при которых экспрессируется белок, извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином, и конъюгирование белка, продуцируемого клеткой-хозяином, со средством.

103) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный мультиспецифический белок, конъюгированный с средством, где выделенный мультиспецифический белок содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита.

104) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 103, где антиген лимфоцита представляет собой антиген Т-клетки.

105) Иммуноконъюгированный белок по варианту осуществления 103, где антиген Т-клетки представляет собой антиген $CD8^+$ Т-клетки.

106) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 103, где антиген лимфоцита представляет собой антиген NK-клетки.

107) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-106, где антиген лимфоцита представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

108) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 107, где антиген лимфоцита представляет собой CD3ε.

109) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-108, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

110) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 109, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат Fab.

111) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 109, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат VHH.

112) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 110, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv.

113) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 112, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

114) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 113, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

115) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 114, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

116) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 115, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

117) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 под любым из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11 и HCDR3 под любым из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

118) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-117, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;
b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;
c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;
d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;
e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;
f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или
g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

119) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-118, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

120) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 или 74 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79 или 80.

121) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116 и 120, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

122) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116, 120 и 121, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

123) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116 и 120-122, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

124) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199.

125) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116 и 124, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно; или

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

126) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116, 124 и 125, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175 или 179 и VL под SEQ ID NO 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

127) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-116 и 124-126, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

128) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-127, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) HCDR1 под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, LCDR1 под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

129) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 101-128, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238,

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

130) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-129, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

131) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 130, дополнительно содержащий второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

132) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 131, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

133) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 130-132, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

134) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 130-133, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR.

135) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 134, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

136) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 130-133, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ рецептором (FcγR).

137) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 136, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

138) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 134-137, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

139) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 130-138, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по

меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

140) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 139, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

141) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 130-140, где белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

142) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 141, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A,Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

143) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 130-142, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

a) L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig или
b) L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

144) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-143, где средство представляет собой терапевтическое средство или визуализирующее средство.

145) Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 103-143 и фармацевтически приемлемый носитель.

146) Полинуклеотид, кодирующий выделенный мультиспецифический белок иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 103-143.

147) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 146.

148) Клетка-хозяин, содержащая вектор по варианту осуществления 147.

149) Способ получения иммуноконъюгата по любому из вариантов осуществления 103-143, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 148 в условиях, при которых экспрессируется мультиспецифический белок, извлечение мультиспецифического белка, продуцируемого клеткой-хозяином, и конъюгирование мультиспецифического белка со средством.

150) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-96 и 103-143, где средство представляет собой радиоактивное средство.

151) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 150, где радиоактивное средство содержит ион радиометалла.

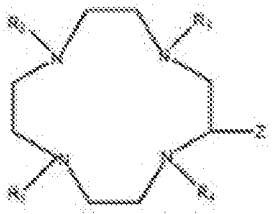
152) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 151, где ион радиометалла представляет собой ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{255}Fm, ^{227}Th, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{89}Zr или ^{111}In.

153) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 151, где ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac, ^{111}In или ^{89}Zr.

154) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 151, где ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac.

155) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 151-154, где ион радиометалла конъюгирован с хелатирующим фрагментом.

156) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 155, где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил; и

Z представляет собой $(CH2)_nY$, при этом

n равняется 1-10, и

Y представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, Z представляет собой водород; и

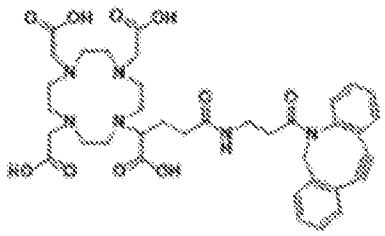
каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

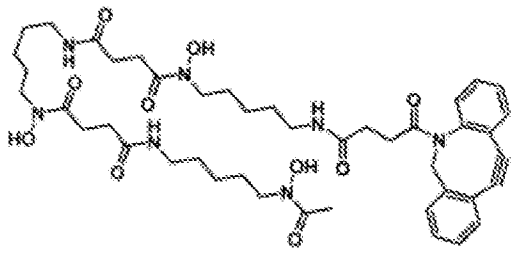
X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, хелант содержит открытоцепочечный лиганд.

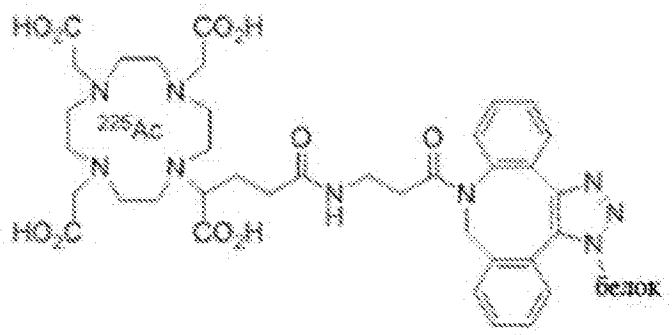
157) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 155, где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (II):



или структуру формулы (III):



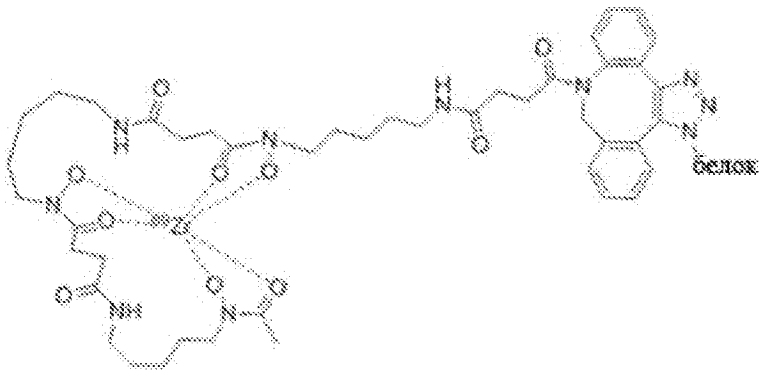
158) Иммуноконъюгат формулы (IV),



формула (IV),

где белок представляет собой выделенный белок, определяемый в любом из вариантов осуществления 1-96.

159) Иммуноконъюгат формулы (V),


O
NH
O
N
O
O
O

времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 18;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 19;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 20;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 21;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 22;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 23;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 24;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 25;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 26; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 27,

или его связывающий CD33 фрагмент.

2) Способ по варианту осуществления 1, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;

b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;

c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;

d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;

e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;

f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или

g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

3) Способ по вариантам осуществления 1 или 2, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

4) Способ по варианту осуществления 3, где выделенный белок представляет собой VHH.

5) Способ по варианту осуществления 3, где выделенный белок представляет собой Fab.

6) Способ по варианту осуществления 3, где выделенный белок представляет собой scFv.

7) Способ по любому из вариантов осуществления 1-6, где выделенный белок содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

8) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит VHH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

9) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный белок связывает CD33, при этом антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61,

или его связывающий CD33 фрагмент.

10) Способ по варианту осуществления 9, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36 и 45 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38 и 47 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39 и 48 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41 и 50 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42 и 51 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44 и 51, соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42 и 51 соответственно.

11) Способ по варианту осуществления 9 или 10, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 52 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 81;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 54 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 83;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 55 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 84;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 57 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 86;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 58 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 60 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87; или

j) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 61 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 88.

12) Способ по варианту осуществления 11, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;

b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;

c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;

d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;

e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;

f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

13) Способ по любому из вариантов осуществления 9-12, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

14) Способ по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой Fab.

15) Способ по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой VHH.

16) Способ по варианту осуществления 13, где выделенный белок представляет собой scFv.

17) Способ по варианту осуществления 16, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

18) Способ по варианту осуществления 17, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

19) Способ по варианту осуществления 18, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

20) Способ по варианту осуществления 19, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

21) Способ по любому из вариантов осуществления 9-20, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, или 88.

22) Способ по варианту осуществления 21, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

23) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

24) Способ по варианту осуществления 23, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

25) Способ по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой Fab.

26) Способ по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой VHH.

27) Способ по варианту осуществления 24, где выделенный белок представляет собой scFv.

28) Способ по варианту осуществления 27, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

29) Способ по варианту осуществления 28, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;
b) приблизительно 5-40 аминокислот;
c) приблизительно 10-30 аминокислот или
d) приблизительно 10-20 аминокислот.

30) Способ по варианту осуществления 29, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

31) Способ по варианту осуществления 30, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

32) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный белок связывает CD33, и при этом выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181;

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96.

33) Способ по варианту осуществления 32, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90 и 92 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91 и 94 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168 и 169 соответственно;

e) SEQ ID NO: 172, 173 и 174 соответственно;

f) SEQ ID NO: 176, 177 и 178 соответственно;

g) SEQ ID NO: 89, 90 и 180 соответственно; или

h) SEQ ID NO: 89, 90 и 93 соответственно.

34) Способ по варианту осуществления 32 или 33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 95 и определяющую комплементарность область легкой цепи (LCDR) 1, LCDR2 и LCDR3 вариабельной области легкой цепи (VL) под SEQ ID NO: 105;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 106;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 97 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 107;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 170 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 185;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 171 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 188;

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 175 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 192;

g) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 179 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 196;

h) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 181 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 200; или

i) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 96 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 202.

35) Способ по варианту осуществления 34, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно;

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

36) Способ по любому из вариантов осуществления 32-35, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

37) Способ по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой Fab.

38) Способ по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой VHH.

39) Способ по варианту осуществления 36, где выделенный белок представляет собой scFv.

40) Способ по варианту осуществления 39, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

41) Способ по варианту осуществления 40, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

42) Способ по варианту осуществления 41, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

43) Способ по варианту осуществления 42, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

44) Способ по любому из вариантов осуществления 32-43, где выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO: 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

45) Способ по варианту осуществления 44, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

46) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный белок связывает CD33, при этом выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

47) Способ по варианту осуществления 46, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

48) Способ по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой Fab.

49) Способ по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой VHH.

50) Способ по варианту осуществления 47, где выделенный белок представляет собой scFv.

51) Способ по варианту осуществления 50, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

52) Способ по варианту осуществления 51, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

53) Способ по варианту осуществления 52, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

54) Способ по варианту осуществления 53, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

55) Способ по любому из вариантов осуществления 1-54, где выделенный белок конъюгирован с удлиняющим период полужизни фрагментом.

56) Способ по варианту осуществления 55, где удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбуминсвязывающий домен или полиэтиленгликоль.

57) Способ по любому из вариантов осуществления 1-56, где выделенный белок представляет собой моноспецифический белок.

58) Способ по любому из вариантов осуществления 1-57, где выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

59) Способ по варианту осуществления 58, где мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

60) Способ по варианту осуществления 59, где мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

61) Способ по любому из вариантов осуществления 1-60, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig.

62) Способ по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

63) Способ по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

64) Способ по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

65) Способ по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

66) Способ по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3.

67) Способ по варианту осуществления 61, где фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

68) Способ по любому из вариантов осуществления 61-67, где выделенный белок конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

69) Способ по любому из вариантов осуществления 61-67, где выделенный белок конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

70) Способ по любому из вариантов осуществления 61-69, где выделенный белок конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2).

71) Способ по варианту осуществления 70, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

72) Способ по любому из вариантов осуществления 58-71, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците.

73) Способ по варианту осуществления 72, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

74) Способ по варианту осуществления 72, где Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

75) Способ по варианту осуществления 72, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

76) Способ по любому из вариантов осуществления 58-75, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

77) Способ по варианту осуществления 76, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

78) Способ по варианту осуществления 77, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

79) Выделенный белок по варианту осуществления 76, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9.

80) Выделенный белок по варианту осуществления 79, где антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

81) Способ по любому из вариантов осуществления 61-80, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

82) Способ по любому из вариантов осуществления 61-81, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания белка с Fcγ рецептором (FcγR).

83) Способ по варианту осуществления 82, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

84) Способ по любому из вариантов осуществления 61-81, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

85) Способ по варианту осуществления 84, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

86) Способ по любому из вариантов осуществления 82-85, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

87) Способ по любому из вариантов осуществления 61-86, где константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

88) Способ по варианту осуществления 87, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

89) Способ по любому из вариантов осуществления 61-88, где выделенный белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

90) Способ по варианту осуществления 89, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

91) Способ по любому из вариантов осуществления 1-54, где выделенный белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

92) Способ по варианту осуществления 91, где CAR содержит

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, определяемый в любом из вариантов осуществления 1-54;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

93) Способ по варианту осуществления 91 или 92, где CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

94) Способ по любому из вариантов осуществления 91-93, где

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

95) Способ по любому из вариантов осуществления 91-93, где

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

96) Способ по варианту осуществления 95, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки или любых их комбинаций.

97) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного мультиспецифического белка субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где выделенный мультиспецифический белок содержит первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита.

98) Способ по варианту осуществления 97, где антиген лимфоцита представляет собой антиген Т-клетки.

99) Способ по варианту осуществления 97, где антиген Т-клетки представляет собой антиген $CD8^+$ Т-клетки.

100) Способ по варианту осуществления 97, где антиген лимфоцита представляет собой антиген NK-клетки.

101) Способ по любому из вариантов осуществления 97-100, где антиген лимфоцита представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

102) Способ по варианту осуществления 101, где антиген лимфоцита представляет собой CD3ε.

103) Способ по любому из вариантов осуществления 97-102, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

104) Способ по варианту осуществления 103, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат Fab.

105) Способ по варианту осуществления 103, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат VHH.

106) Способ по варианту осуществления 103, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv.

107) Способ по варианту осуществления 106, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

108) Способ по варианту осуществления 107, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

109) Способ по варианту осуществления 108, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

110) Способ по варианту осуществления 109, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

111) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 под любым из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11 и HCDR3 под любым из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

112) Способ по любому из вариантов осуществления 97-111, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;
b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;
c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;
d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;
e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;
f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или
g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

113) Способ по любому из вариантов осуществления 97-112, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

114) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 или 74 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79 или 80.

115) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110 и 114, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;

g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;

i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или

j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

116) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110, 114 и 115, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

117) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110 и 114-116, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;

b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;

d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;

e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;

g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;

h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или

j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

118) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197 или 201, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199.

119) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110 и 118, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно; или

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

120) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110, 118 и 119, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179, 181 или 96 и VL под SEQ ID NO 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

121) Способ по любому из вариантов осуществления 97-110 и 118-120, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

122) Способ по любому из вариантов осуществления 97-121, где второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит

a) HCDR1 под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, LCDR1 под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

123) Способ по любому из вариантов осуществления 95-119, где антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238,

определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

124) Способ по любому из вариантов осуществления 97-123, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

125) Способ по варианту осуществления 124, дополнительно включающий второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

126) Способ по варианту осуществления 125, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

127) Способ по любому из вариантов осуществления 124-136, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

128) Способ по любому из вариантов осуществления 124-127, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR.

129) Способ по варианту осуществления 128, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

130) Способ по любому из вариантов осуществления 124-127, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ рецептором (FcγR).

131) Способ по варианту осуществления 130, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

132) Способ по любому из вариантов осуществления 128-131, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

133) Способ по любому из вариантов осуществления 124-132, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по

меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

134) Способ по варианту осуществления 133, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

135) Способ по любому из вариантов осуществления 124-134, включающий по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

136) Способ по варианту осуществления 135, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбраны из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A,Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

137) Способ по любому из вариантов осуществления 124-136, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

a) L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig или

b) L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

138) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата субъекту в течение

времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33, где иммуноконъюгат содержит выделенный белок, определяемый в любом из вариантов осуществления 1-137, конъюгированный со средством.

139) Способ по варианту осуществления 138, где средство представляет собой радиоактивное средство.

140) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 139, где радиоактивное средство содержит ион радиометалла.

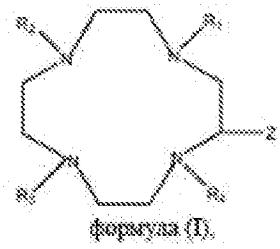
141) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 140, где ион радиометалла представляет собой ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{255}Fm, ^{227}Th, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{89}Zr или ^{111}In.

142) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 140, где ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac, ^{111}In или ^{89}Zr.

143) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 140, где ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac.

144) Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 140-143, где ион радиометалла конъюгирован с хелатирующим фрагментом.

145) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 144, где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил; и

Z представляет собой $(CH2)_nY$, при этом

n равняется 1-10, и

Y представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, Z представляет собой водород; и

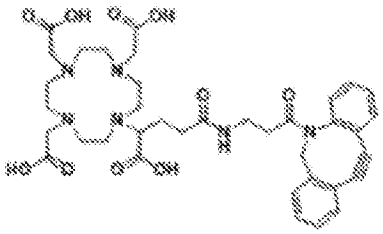
каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

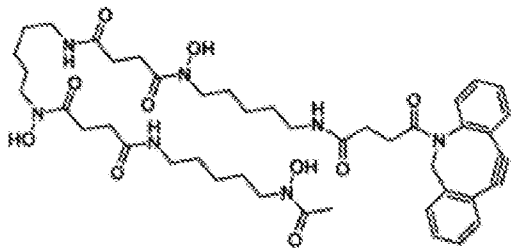
X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, хелант содержит открытоцепочечный лиганд.

146) Иммуноконъюгат по варианту осуществления 144, где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (II):

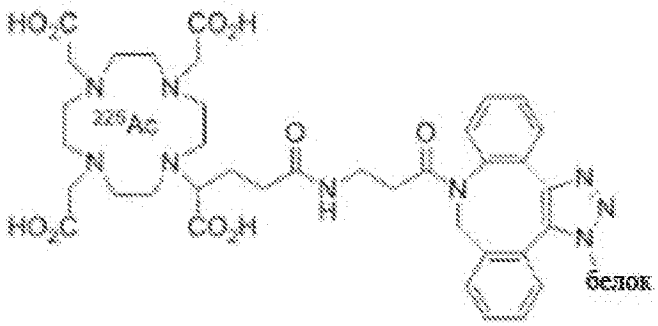


или структуру формулы (III):



.

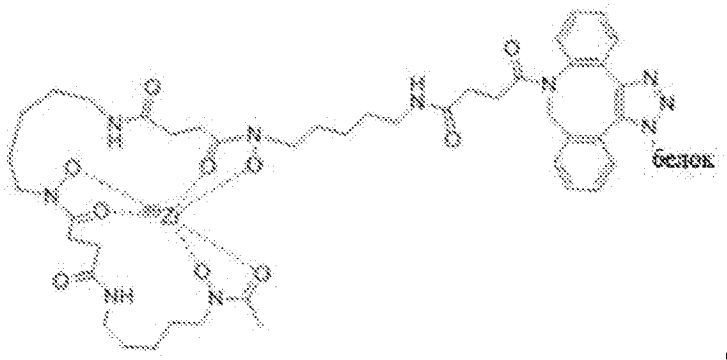
147) Иммуноконъюгат формулы (IV),



формула (IV),

где белок представляет собой выделенный белок, определяемый в любом из вариантов осуществления 1-96.

148) Иммуноконъюгат формулы (V),



формула (V),

где белок представляет собой выделенный белок, определяемый в любом из вариантов осуществления 1-96.

149) Способ по любому из вариантов осуществления 1-148, где способ является эффективным для снижения количества экспрессирующих CD33 клеток у субъекта, при этом экспрессирующие CD33 клетки являются раковыми клетками, или при этом экспрессирующие CD33 клетки являются нераковыми клетками.

150) Способ по любому из вариантов осуществления 1-149, где способ является эффективным для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

151) Способ по любому из вариантов осуществления 148-150, где рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак.

152) Способ по варианту осуществления 151, где гематологический рак представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

153) Способ по варианту осуществления 151, где гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

154) Способ по любому из вариантов осуществления 148-153, где выделенный белок или выделенный мультиспецифический белок вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

155) Способ по варианту осуществления 154, где второе терапевтическое средство представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, андрогендепривационную терапию или облучение или любую их комбинацию.

156) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 раковую клетку у субъекта.

157) Способ снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на одну или несколько из экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

158) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 клетку у субъекта.

159) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 клетку у субъекта.

Перечень пронумерованных вариантов осуществления (E)

1) Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий
   a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33;
   b) трансмембранный домен и
   c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере одни костимуляторный домен.

2) CAR по варианту осуществления 1, дополнительно содержащий CD8a-шарнирную область.

3) CAR по варианту осуществления 1 или 2, где
   a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и
   b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

4) CAR по варианту осуществления 2 или 3, где
   a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

5) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под любым из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 или 5, HCDR2 под любым из SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10 или 11 и HCDR3 под любым из SEQ ID NO: 12, 13, 14, 15, 16 или 17.

6) CAR по любому из вариантов осуществления 1-5, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR1, HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 1, 6 и 12 соответственно;

b) SEQ ID NO: 2, 7 и 13 соответственно;

c) SEQ ID NO: 1, 8 и 14 соответственно;

d) SEQ ID NO: 3, 9 и 13 соответственно;

e) SEQ ID NO: 4, 10 и 15 соответственно;

f) SEQ ID NO: 5, 11 и 16 соответственно; или

g) SEQ ID NO: 5, 11 и 17 соответственно.

7) CAR по любому из вариантов осуществления 1-6, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под любым из SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

8) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35, HCDR2 под SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 или 44, HCDR3 под SEQ ID NO: 45, 46, 47, 48, 49, 50 или 51, LCDR1 под SEQ ID NO: 62, 63, 64, 65, 66, 67 или 68, LCDR2 под SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 или 74 и LCDR3 под SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79 или 80.

9) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4 и 8, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 28, 36, 45, 62, 69 и 75 соответственно;
b) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 30, 38, 47, 64, 71 и 77 соответственно;
d) SEQ ID NO: 31, 39, 48, 65, 72 и 78 соответственно;
e) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
f) SEQ ID NO: 33, 41, 50, 67, 73 и 79 соответственно;
g) SEQ ID NO: 34, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
h) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
i) SEQ ID NO: 34, 44, 51, 68, 74 и 80 соответственно; или
j) SEQ ID NO: 35, 42, 51, 68, 74 и 80 соответственно.

10) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4, 8 и 9, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 или 61 и VL под SEQ ID NO: 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87 или 88.

11) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4 и 8-10, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 52 и VL под SEQ ID NO: 81;
b) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
c) VH под SEQ ID NO: 54 и VL под SEQ ID NO: 83;
d) VH под SEQ ID NO: 55 и VL под SEQ ID NO: 84;
e) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
f) VH под SEQ ID NO: 57 и VL под SEQ ID NO: 86;
g) VH под SEQ ID NO: 58 и VL под SEQ ID NO: 87;
h) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
i) VH под SEQ ID NO: 60 и VL под SEQ ID NO: 87; или
j) VH под SEQ ID NO: 61 и VL под SEQ ID NO: 88.

12) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1 под SEQ ID NO: 33, 89, 167, 172 или 176, HCDR2 под SEQ ID NO: 90, 91, 168, 173 или 177, HCDR3 под SEQ ID NO: 92, 93, 94, 169, 174, 178 или 180, LCDR1 под SEQ ID NO: 98, 99, 100, 182, 186, 189, 193, 197, LCDR2 под SEQ ID NO: 101, 102, 103, 183, 187, 190, 194 или 198 и LCDR3 под SEQ ID NO: 104, 184, 191, 195 или 199.

13) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4 и 12, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 89, 90, 92, 98, 101 и 104 соответственно;

b) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 99, 102 и 104 соответственно;

c) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 100, 103 и 104 соответственно;

d) SEQ ID NO: 167, 168, 169, 182, 183 и 184 соответственно;

e) SEQ ID NO: 33, 91, 94, 186, 187 и 104 соответственно;

f) SEQ ID NO: 172, 173, 174, 189, 190 и 191 соответственно;

g) SEQ ID NO: 176, 177, 178, 193, 194 и 195 соответственно;

h) SEQ ID NO: 89, 90, 180, 197, 198 и 199 соответственно; или

i) SEQ ID NO: 89, 90, 93, 201, 102 и 104 соответственно.

14) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4, 12 и 13, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит VH под SEQ ID NO: 95, 96, 97, 170, 171, 175, 179 или 181 и VL под SEQ ID NO 105, 106, 107, 185, 188, 192, 196, 200 или 202.

15) CAR по любому из вариантов осуществления 1-4 и 12-14, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит

a) VH под SEQ ID NO: 95 и VL под SEQ ID NO: 105;

b) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 106;

c) VH под SEQ ID NO: 97 и VL под SEQ ID NO: 107;

d) VH под SEQ ID NO: 170 и VL под SEQ ID NO: 185;

e) VH под SEQ ID NO: 171 и VL под SEQ ID NO: 188;

f) VH под SEQ ID NO: 175 и VL под SEQ ID NO: 192;

g) VH под SEQ ID NO: 179 и VL под SEQ ID NO: 196;

h) VH под SEQ ID NO: 181 и VL под SEQ ID NO: 200; или

i) VH под SEQ ID NO: 96 и VL под SEQ ID NO: 202.

16) CAR по любому из вариантов осуществления 1-15, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой VHH.

17) CAR по любому из вариантов осуществления 1-16, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, представляет собой scFv.

18) CAR по варианту осуществления 17, где scFv содержит первый линкер (L1) между VL и VH.

19) CAR по варианту осуществления 18, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139 или 140.

20) CAR по варианту осуществления 19, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

21) CAR по любому из вариантов осуществления 1-20, где внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, дополнительно содержит сигнальный полипептид.

22) CAR по варианту осуществления 21, где сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 166.

23) CAR по любому из вариантов осуществления 1-22, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки и их комбинации.

24) CAR по любому из вариантов осуществления 3-23, где компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 163.

25) CAR по любому из вариантов осуществления 3-24, где компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164.

26) CAR по любому из вариантов осуществления 3-25, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 165.

27) CAR по любому из вариантов осуществления 3-26, где полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 162.

28) CAR по любому из вариантов осуществления 3-27, где CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

29) CAR по любому из вариантов осуществления 1-28, где CAR представляет собой мультиспецифический белок.

30) CAR по варианту осуществления 29, где мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

31) CAR по варианту осуществления 30, где мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

32) CAR по любому из вариантов осуществления 29-31, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците.

33) CAR по варианту осуществления 32, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

34) CAR по варианту осуществления 32, где Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

35) CAR по варианту осуществления 32, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

36) CAR по любому из вариантов осуществления 29-35, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

37) CAR по варианту осуществления 36, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

38) CAR по варианту осуществления 37, где антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 141, HCDR2 под SEQ ID NO: 142, HCDR3 под SEQ ID NO: 143, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 144, LCDR2 под SEQ ID NO: 145 и LCDR3 под SEQ ID NO: 146;

b) VH под SEQ ID NO: 147 и VL под SEQ ID NO: 148;

c) HCDR1 под SEQ ID NO: 149, HCDR2 под SEQ ID NO: 150, HCDR3 под SEQ ID NO: 151, LCDR1 под SEQ ID NO: 152, LCDR2 под SEQ ID NO: 153 и LCDR3 под SEQ ID NO: 154; или

d) VH под SEQ ID NO: 155 и VL под SEQ ID NO: 156.

39) CAR по варианту осуществления 36, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9.

40) CAR по варианту осуществления 39, где антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, содержит

a) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 238, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

b) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 242, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

c) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 243, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

d) определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 236, HCDR2 под SEQ ID NO: 237, HCDR3 под SEQ ID NO: 244, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 239, LCDR2 под SEQ ID NO: 240 и LCDR3 под SEQ ID NO: 241;

e) VH под SEQ ID NO: 245 и VL под SEQ ID NO: 249;

f) VH под SEQ ID NO: 246 и VL под SEQ ID NO: 249;

g) VH под SEQ ID NO: 247 и VL под SEQ ID NO: 249; или

h) VH под SEQ ID NO: 248 и VL под SEQ ID NO: 249.

41) Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из вариантов осуществления 1-40.

42) Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 41, где лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

43) Выделенный лимфоцит по варианту осуществления 41, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

44) Выделенный полинуклеотид, кодирующий CAR по любому из вариантов осуществления 1-40.

45) Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 44.

46) Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по варианту осуществления 44 или вектор по варианту осуществления 45.

47) Фармацевтическая композиция, содержащий лимфоцит по любому из вариантов осуществления 41-43 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

48) Способ лечения субъекта, имеющего рак с экспрессией CD33, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из вариантов осуществления 41-43 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом лимфоцит опосредует уничтожение рака с экспрессией CD33 у субъекта.

49) Способ по варианту осуществления 48, где рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак.

50) Способ по варианту осуществления 49, где рак с экспрессией CD33 представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

51) Способ по варианту осуществления 50, где рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

52) Способ целевого уничтожения раковой клетки, при этом способ включает приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом по любому из вариантов осуществления 41-43, при этом лимфоцит индуцирует целевое уничтожение раковой клетки.

53) Способ по варианту осуществления 52, где раковая клетка представляет собой гематологический рак.

54) Способ по варианту осуществления 53, где рак с экспрессией CD33 представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

55) Способ по варианту осуществления 54, где рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

56) Способ выявления присутствия рака у субъекта, включающий

a) приведение клеточного образца, полученного от субъекта, в контакт с CAR по любому из вариантов осуществления 1-40, с образованием тем самым комплекса CAR-клетка, и

b) выявление комплекса CAR-клетка, где выявление комплекса CAR-клетка указывает на присутствие рака у субъекта.

57) Способ по варианту осуществления 56, где раковая клетка представляет собой гематологический рак.

58) Способ по варианту осуществления 57, где рак с экспрессией CD33 представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

59) Способ по варианту осуществления 58, где рак с экспрессией CD33 представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

60) Набор, содержащий CAR по любому из вариантов осуществления 1-40.

61) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта.

62) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

63) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

64) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33.

65) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 раковую клетку у субъекта.

66) Способ снижения количества экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на одну или несколько из экспрессирующих CD33 опухолевых клеток у субъекта.

67) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 клетку у субъекта.

68) Фармацевтическая композиция, содержащая средство для лечения не являющегося раковым состояния у субъекта с риском развития рака с экспрессией CD33, при этом способ включает введение субъекту средства для нацеливания терапевтического средства на экспрессирующую CD33 клетку у субъекта.

Перечень пронумерованных вариантов осуществления (F)

1) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит
   a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 53;
   b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;
   c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;
   d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;
   e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или
   f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

2) Выделенный белок по пункту 1, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под
   a) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;
   b) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;
   c) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;
   d) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;
   e) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или
   f) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

3) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под
   a) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;
   b) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;
   c) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;
   d) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;
   e) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или
   f) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

4) Выделенный белок по пункту 1 или 2, где выделенный белок содержит
   a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82;
   b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85;
   c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;
   d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271;
   e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или
   f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

5) Выделенный белок по пункту 3 или 4, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под
   a) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
   b) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
   c) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
   d) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно

e) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или

f) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

6) Выделенный белок по любому из пунктов 1-5, где выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 53, 56, 59, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382, и VL под SEQ ID NO: 82, 85, 87, 271, 272, 273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

7) Выделенный белок по пункту 6, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;

b) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;

c) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;

d) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;

e) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272;

f) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273;

g) VH под SEQ ID NO: 291 и VL под SEQ ID NO: 271;

h) VH под SEQ ID NO: 292 и VL под SEQ ID NO: 271;

i) VH под SEQ ID NO: 293 и VL под SEQ ID NO: 271;

j) VH под SEQ ID NO: 294 и VL под SEQ ID NO: 271;

k) VH под SEQ ID NO: 295 и VL под SEQ ID NO: 271;

l) VH под SEQ ID NO: 296 и VL под SEQ ID NO: 271;

m) VH под SEQ ID NO: 297 и VL под SEQ ID NO: 271;

n) VH под SEQ ID NO: 298 и VL под SEQ ID NO: 271;

o) VH под SEQ ID NO: 299 и VL под SEQ ID NO: 271;

p) VH под SEQ ID NO: 300 и VL под SEQ ID NO: 271;

q) VH под SEQ ID NO: 301 и VL под SEQ ID NO: 271;

r) VH под SEQ ID NO: 302 и VL под SEQ ID NO: 271;

s) VH под SEQ ID NO: 303 и VL под SEQ ID NO: 271;

t) VH под SEQ ID NO: 304 и VL под SEQ ID NO: 271;

u) VH под SEQ ID NO: 305 и VL под SEQ ID NO: 271;

v) VH под SEQ ID NO: 306 и VL под SEQ ID NO: 271;

w) VH под SEQ ID NO: 307 и VL под SEQ ID NO: 271;
x) VH под SEQ ID NO: 308 и VL под SEQ ID NO: 271;
y) VH под SEQ ID NO: 309 и VL под SEQ ID NO: 271;
z) VH под SEQ ID NO: 310 и VL под SEQ ID NO: 271;
aa) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 311;
ab) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 312;
ac) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 313;
ad) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 314;
ae) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 315;
af) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 316;
ag) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 317;
ah) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 318;
ai) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 319;
aj) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 320;
ak) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 321;
al) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 322;
am) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 323;
an) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 324;
ao) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 325;
ap) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 326;
aq) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 327;
ar) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 328;
as) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 329;
at) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 330;
au) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 331;
av) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 332;
aw) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 333;
ax) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 334;
ay) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 335;
az) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 336;
ba) VH под SEQ ID NO: 337 и VL под SEQ ID NO: 272;
bb) VH под SEQ ID NO: 338 и VL под SEQ ID NO: 272;
bc) VH под SEQ ID NO: 339 и VL под SEQ ID NO: 272;
bd) VH под SEQ ID NO: 340 и VL под SEQ ID NO: 272;

be) VH под SEQ ID NO: 341 и VL под SEQ ID NO: 272;

bf) VH под SEQ ID NO: 342 и VL под SEQ ID NO: 272;

bg) VH под SEQ ID NO: 343 и VL под SEQ ID NO: 272;

bh) VH под SEQ ID NO: 344 и VL под SEQ ID NO: 272;

bi) VH под SEQ ID NO: 345 и VL под SEQ ID NO: 272;

bj) VH под SEQ ID NO: 346 и VL под SEQ ID NO: 272;

bk) VH под SEQ ID NO: 347 и VL под SEQ ID NO: 272;

bl) VH под SEQ ID NO: 348 и VL под SEQ ID NO: 272;

bm) VH под SEQ ID NO: 349 и VL под SEQ ID NO: 272;

bn) VH под SEQ ID NO: 350 и VL под SEQ ID NO: 272;

bo) VH под SEQ ID NO: 351 и VL под SEQ ID NO: 272;

bp) VH под SEQ ID NO: 352 и VL под SEQ ID NO: 272;

bq) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 353;

br) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 354;

bs) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 355;

bt) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 356;

bu) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 357;

bv) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 358;

bw) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 359;

bx) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 360;

by) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 361;

bz) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 362;

ca) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 363;

cb) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 364;

cc) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 365;

cd) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 366;

ce) VH под SEQ ID NO: 367 и VL под SEQ ID NO: 85;

cf) VH под SEQ ID NO: 368 и VL под SEQ ID NO: 85;

cg) VH под SEQ ID NO: 369 и VL под SEQ ID NO: 85;

ch) VH под SEQ ID NO: 370 и VL под SEQ ID NO: 85;

ci) VH под SEQ ID NO: 371 и VL под SEQ ID NO: 85;

cj) VH под SEQ ID NO: 372 и VL под SEQ ID NO: 85;

ck) VH под SEQ ID NO: 373 и VL под SEQ ID NO: 85;

cl) VH под SEQ ID NO: 374 и VL под SEQ ID NO: 85;

cm) VH под SEQ ID NO: 375 и VL под SEQ ID NO: 85;
cn) VH под SEQ ID NO: 376 и VL под SEQ ID NO: 85;
co) VH под SEQ ID NO: 377 и VL под SEQ ID NO: 85;
cp) VH под SEQ ID NO: 378 и VL под SEQ ID NO: 85;
cq) VH под SEQ ID NO: 379 и VL под SEQ ID NO: 85;
cr) VH под SEQ ID NO: 380 и VL под SEQ ID NO: 85;
cs) VH под SEQ ID NO: 381 и VL под SEQ ID NO: 85;
ct) VH под SEQ ID NO: 382 и VL под SEQ ID NO: 85;
cu) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 383;
cv) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 384;
cw)VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 385;
cx) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 386;
cy) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 387;
cz) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 388;
da) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 389;
db) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 390;
dc) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 391;
dd) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 392;
de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 393;
df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 394;
dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 395;
dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 396;
di) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 397; или
dj) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 398.

8) Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит
a) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
b) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
c) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
d) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
e) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272;
f) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273;
g) VH под SEQ ID NO: 291 и VL под SEQ ID NO: 271;
h) VH под SEQ ID NO: 292 и VL под SEQ ID NO: 271;
i) VH под SEQ ID NO: 293 и VL под SEQ ID NO: 271;

j) VH под SEQ ID NO: 294 и VL под SEQ ID NO: 271;
k) VH под SEQ ID NO: 295 и VL под SEQ ID NO: 271;
l) VH под SEQ ID NO: 296 и VL под SEQ ID NO: 271;
m) VH под SEQ ID NO: 297 и VL под SEQ ID NO: 271;
n) VH под SEQ ID NO: 298 и VL под SEQ ID NO: 271;
o) VH под SEQ ID NO: 299 и VL под SEQ ID NO: 271;
p) VH под SEQ ID NO: 300 и VL под SEQ ID NO: 271;
q) VH под SEQ ID NO: 301 и VL под SEQ ID NO: 271;
r) VH под SEQ ID NO: 302 и VL под SEQ ID NO: 271;
s) VH под SEQ ID NO: 303 и VL под SEQ ID NO: 271;
t) VH под SEQ ID NO: 304 и VL под SEQ ID NO: 271;
u) VH под SEQ ID NO: 305 и VL под SEQ ID NO: 271;
v) VH под SEQ ID NO: 306 и VL под SEQ ID NO: 271;
w) VH под SEQ ID NO: 307 и VL под SEQ ID NO: 271;
x) VH под SEQ ID NO: 308 и VL под SEQ ID NO: 271;
y) VH под SEQ ID NO: 309 и VL под SEQ ID NO: 271;
z) VH под SEQ ID NO: 310 и VL под SEQ ID NO: 271;
aa) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 311;
ab) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 312;
ac) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 313;
ad) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 314;
ae) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 315;
af) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 316;
ag) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 317;
ah) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 318;
ai) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 319;
aj) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 320;
ak) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 321;
al) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 322;
am) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 323;
an) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 324;
ao) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 325;
ap) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 326;
aq) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 327;

ar) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 328;
as) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 329;
at) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 330;
au) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 331;
av) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 332;
aw)VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 333;
ax) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 334;
ay) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 335;
az) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 336;
ba) VH под SEQ ID NO: 337 и VL под SEQ ID NO: 272;
bb) VH под SEQ ID NO: 338 и VL под SEQ ID NO: 272;
bc) VH под SEQ ID NO: 339 и VL под SEQ ID NO: 272;
bd) VH под SEQ ID NO: 340 и VL под SEQ ID NO: 272;
be) VH под SEQ ID NO: 341 и VL под SEQ ID NO: 272;
bf) VH под SEQ ID NO: 342 и VL под SEQ ID NO: 272;
bg) VH под SEQ ID NO: 343 и VL под SEQ ID NO: 272;
bh) VH под SEQ ID NO: 344 и VL под SEQ ID NO: 272;
bi) VH под SEQ ID NO: 345 и VL под SEQ ID NO: 272;
bj) VH под SEQ ID NO: 346 и VL под SEQ ID NO: 272;
bk) VH под SEQ ID NO: 347 и VL под SEQ ID NO: 272;
bl) VH под SEQ ID NO: 348 и VL под SEQ ID NO: 272;
bm) VH под SEQ ID NO: 349 и VL под SEQ ID NO: 272;
bn) VH под SEQ ID NO: 350 и VL под SEQ ID NO: 272;
bo) VH под SEQ ID NO: 351 и VL под SEQ ID NO: 272;
bp) VH под SEQ ID NO: 352 и VL под SEQ ID NO: 272;
bq) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 353;
br) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 354;
bs) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 355;
bt) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 356;
bu) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 357;
bv) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 358;
bw) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 359;
bx) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 360;
by) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 361;

bz) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 362;
ca) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 363;
cb) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 364;
cc) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 365;
cd) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 366;
ce) VH под SEQ ID NO: 367 и VL под SEQ ID NO: 85;
cf) VH под SEQ ID NO: 368 и VL под SEQ ID NO: 85;
cg) VH под SEQ ID NO: 369 и VL под SEQ ID NO: 85;
ch) VH под SEQ ID NO: 370 и VL под SEQ ID NO: 85;
ci) VH под SEQ ID NO: 371 и VL под SEQ ID NO: 85;
cj) VH под SEQ ID NO: 372 и VL под SEQ ID NO: 85;
ck) VH под SEQ ID NO: 373 и VL под SEQ ID NO: 85;
cl) VH под SEQ ID NO: 374 и VL под SEQ ID NO: 85;
cm) VH под SEQ ID NO: 375 и VL под SEQ ID NO: 85;
cn) VH под SEQ ID NO: 376 и VL под SEQ ID NO: 85;
co) VH под SEQ ID NO: 377 и VL под SEQ ID NO: 85;
cp) VH под SEQ ID NO: 378 и VL под SEQ ID NO: 85;
cq) VH под SEQ ID NO: 379 и VL под SEQ ID NO: 85;
cr) VH под SEQ ID NO: 380 и VL под SEQ ID NO: 85;
cs) VH под SEQ ID NO: 381 и VL под SEQ ID NO: 85;
ct) VH под SEQ ID NO: 382 и VL под SEQ ID NO: 85;
cu) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 383;
cv) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 384;
cw) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 385;
cx) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 386;
cy) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 387;
cz) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 388;
da) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 389;
db) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 390;
dc) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 391;
dd) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 392;
de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 393;
df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 394;
dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 395;

dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 396;

di) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 397; или

dj) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 398.

9) Выделенный белок по любому из пунктов 1-8, где выделенный белок представляет собой scFv, $(scFv)_2$, Fv, Fab, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

10) Выделенный белок по пункту 9, где выделенный белок представляет собой Fab.

11) Выделенный белок по пункту 9, где выделенный белок представляет собой scFv.

12) Выделенный белок по пункту 11, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

13) Выделенный белок по пункту 12, где L1 содержит

a) приблизительно 5-50 аминокислот;

b) приблизительно 5-40 аминокислот;

c) приблизительно 10-30 аминокислот или

d) приблизительно 10-20 аминокислот.

14) Выделенный белок по пункту 13, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

15) Выделенный белок по пункту 14, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

16) Выделенный белок по пункту 15, где выделенный белок содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276.

17) Выделенный белок по любому из пунктов 1-16, где белок конъюгирован с удлиняющим период полужизни фрагментом.

18) Выделенный белок по пункту 17, где удлиняющий период полужизни фрагмент представляет собой иммуноглобулин (Ig), фрагмент Ig, константную область Ig, фрагмент константной области Ig, Fc-область, трансферрин, альбумин, альбуминсвязывающий домен или полиэтиленгликоль.

19) Выделенный белок по любому из пунктов 1-18, где выделенный белок представляет собой моноспецифический белок.

20) Выделенный белок по любому из пунктов 1-19, где выделенный белок представляет собой мультиспецифический белок.

21) Выделенный белок по пункту 20, где мультиспецифический белок представляет собой биспецифический белок.

22) Выделенный белок по пункту 20, где мультиспецифический белок представляет собой триспецифический белок.

23) Выделенный белок по любому из пунктов 1-22, дополнительно содержащий константную область иммуноглобулина (Ig) или фрагмент его константной области Ig.

24) Выделенный белок по пункту 23, где фрагмент константной области Ig содержит Fc-область.

25) Выделенный белок по пункту 23, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2.

26) Выделенный белок по пункту 23, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH3.

27) Выделенный белок по пункту 23, где фрагмент константной области Ig содержит домен CH2 и домен CH3.

28) Выделенный белок по пункту 23, где фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере часть шарнира, домен CH2 и домен CH3.

29) Выделенный белок по пункту 23, где фрагмент константной области Ig содержит шарнир, домен CH2 и домен CH3.

30) Выделенный белок по любому из пунктов 23-29, содержащий связывающий CD33 антигенсвязывающий домен, который конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

31) Выделенный белок по любому из пунктов 23-29, содержащий связывающий CD33 антигенсвязывающий домен, который конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig.

32) Выделенный белок по любому из пунктов 23-31, содержащий связывающий CD33 антигенсвязывающий домен, который конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2).

33) Выделенный белок по пункту 32, где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO:108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

34) Выделенный белок по любому из пунктов 20-33, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците.

35) Выделенный белок по пункту 34, где лимфоцит представляет собой Т-клетку.

36) Выделенный белок по пункту 35, где Т-клетка представляет собой $CD8^+$ Т-клетку.

37) Выделенный белок по пункту 34, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

38) Выделенный белок по любому из пунктов 20-37, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3, CD3эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

39) Выделенный белок по пункту 38, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает CD3ε.

40) Выделенный белок по пункту 38, где мультиспецифический белок содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9.

41) Выделенный белок по любому из пунктов 34-40, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv, (scFv)2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

42) Выделенный белок по пункту 41, где

a) первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат Fab;

b) первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат VHH;

c) первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv; или

d) первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит scFv, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит VHH.

43) Выделенный белок по любому из пунктов 23-42, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, где необязательно константная область Ig или фрагмент константной области Ig представляет собой IgG1.

44) Выделенный белок по пункту 43, где фрагмент константной области Ig имеет последовательность под SEQ ID NO: 277 или 278.

45) Выделенный белок по любому из пунктов 23-43, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания белка с Fcγ рецептором (FcγR).

46) Выделенный белок по пункту 45, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

47) Выделенный белок по любому из пунктов 23-43, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR.

48) Выделенный белок по пункту 47, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

49) Выделенный белок по любому из пунктов 45-48, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

50) Выделенный белок по любому из пунктов 23-49, где константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка.

51) Выделенный белок по пункту 50, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

52) Выделенный белок по любому из пунктов 23-51, где белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig.

53) Выделенный белок по пункту 52, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A,

T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

54) Выделенный мультиспецифический белок, содержащий первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит связывающий домен, определяемый в любом из пунктов 1-16.

55) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 54, где антиген лимфоцита представляет собой антиген Т-клетки.

56) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 55, где антиген Т-клетки представляет собой антиген CD8+ Т-клетки.

57) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 54, где антиген лимфоцита представляет собой антиген NK-клетки.

58) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пп. 54-57, где антиген лимфоцита представляет собой CD3, CD3 эпсилон (CD3ε), CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195, TRGV9 или NKG2C.

59) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 58, где антиген лимфоцита представляет собой CD3ε.

60) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 54-59, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv, (scFv)2, Fv, Fab, F(ab')2, Fd, dAb или VHH.

61) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 60, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат Fab.

62) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 60, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат VHH.

63) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 60, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй

антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат scFv.

64) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 60 или пункту 63, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

65) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 64, где L1 содержит

приблизительно 5-50 аминокислот;

приблизительно 5-40 аминокислот;

приблизительно 10-30 аминокислот или

приблизительно 10-20 аминокислот.

66) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 65, где L1 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

67) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 66, где L1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 108.

68) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 54-67, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

69) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 68, дополнительно содержащий второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

70) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 69 где L2 содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

71) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 68-70, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая

константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

72) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 68-71, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR.

73) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 72, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

74) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 68-71, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с Fcγ рецептором (FcγR).

75) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 74, где по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания мультиспецифического белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

76) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 72-75, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

77) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 67-76, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат по

меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка.

78) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 77, где по меньшей мере одна мутация, которая модулирует период полужизни мультиспецифического белка, выбрана из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

79) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 68-78, содержащий по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig.

80) Выделенный мультиспецифический белок по пункту 79, где по меньшей мере одна мутация в домене CH3 первой константной области Ig или в домене CH3 фрагмента первой константной области Ig и/или по меньшей мере одна мутация в домене CH3 второй константной области Ig или в домене CH3 фрагмента второй константной области Ig выбрана из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A,Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

81) Выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 68-80, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

82) Выделенный белок по любому из пунктов 1-16, где белок представляет собой химерный антигенный рецептор (CAR).

83) Выделенный белок по пункту 82, где CAR содержит

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по любому из пунктов 1-16;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

84) Выделенный белок по пункту 82 или 83, где CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

85) Выделенный белок по любому из пунктов 82-84, где

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

86) Выделенный белок по любому из пунктов 82-84, где

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

87) Выделенный белок по пункту 86, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки или любых их комбинаций.

88) Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен,

где антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, содержит связывающий домен, определяемый в любом из пунктов 1-16, 20-22 или 34-40.

89) CAR по пункту 88, дополнительно содержащий CD8a-шарнирную область.

90) CAR по пункту 88 или 89, где

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), и домен передачи первичного сигнала, содержащий компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z).

91) CAR по пункту 89 или 90, где

d) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

e) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

f) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163, и домен передачи первичного сигнала, имеющий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164.

92) CAR по любому из пунктов 88-91, где внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, дополнительно содержит сигнальный полипептид.

93) CAR по пункту 92, где сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 166.

94) CAR по любому из пунктов 88-93, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит полипептидный компонент, выбранный из группы, состоящей из компонента представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF (CD137), компонента дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонента кластера дифференцировки (CD27), компонента представителя суперсемейства кластеров дифференцировки и их комбинации.

95) CAR по любому из пунктов 90-94, где компонент CD137 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 163.

96) CAR по любому из пунктов 90-95, где компонент CD3z содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 164.

97) CAR по любому из пунктов 90-96, где домен внутриклеточной передачи сигнала содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 165.

98) CAR по любому из пунктов 90-97, где полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 162.

99) CAR по любому из пунктов 90-98, где CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

100) Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пунктов 90-99.

101) Выделенный лимфоцит по пункту 100, где лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит.

102) Выделенный лимфоцит по пункту 100, где лимфоцит представляет собой естественную киллерную (NK) клетку.

103) Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок по любому из пунктов 1-53 или выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 54-81, конъюгированный со средством.

104) Иммуноконъюгат по пункту 103, где средство представляет собой терапевтическое средство или визуализирующее средство.

105) Иммуноконъюгат по пункту 103, где средство представляет собой радиоактивное средство.

106) Иммуноконъюгат по пункту 105, где радиоактивное средство содержит ион радиометалла.

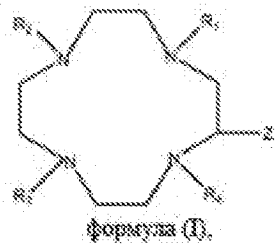
107) Иммуноконъюгат по пункту 106, где ион радиометалла представляет собой ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{225}Ac, ^{255}Fm, ^{227}Th, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{89}Zr или ^{111}In.

108) Иммуноконъюгат по пункту 107, где ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac, ^{111}In или ^{89}Zr.

109) Иммуноконъюгат по пункту 107, где ион радиометалла представляет собой ^{225}Ac.

110) Иммуноконъюгат по любому из пунктов 106-109, где ион радиометалла конъюгирован с хелатирующим фрагментом.

111) Иммуноконъюгат по пункту 110, где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил; и

Z представляет собой $(CH2)_nY$, при этом

n равняется 1-10, и

Y представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, Z представляет собой водород; и

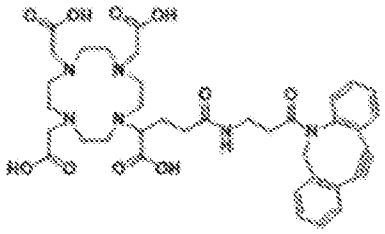
каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

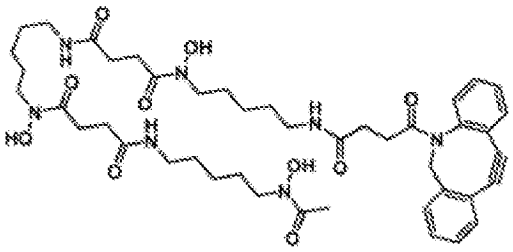
X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, хелант содержит открытоцепочечный лиганд.

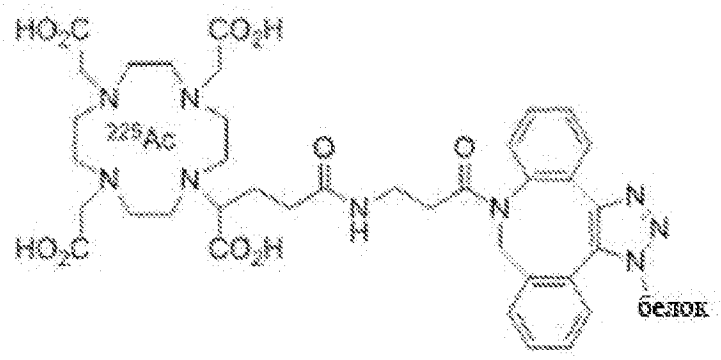
112) Иммуноконъюгат по пункту 110, где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (II):



или структуру формулы (III):



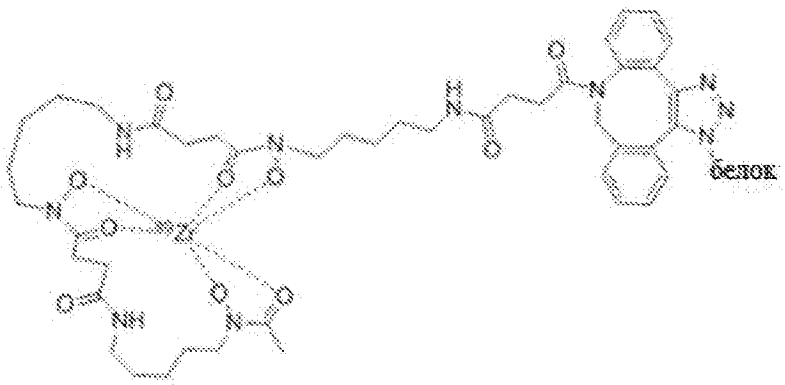
113) Иммуноконъюгат формулы (IV),



формула (IV),

где белок представляет собой выделенный белок, определяемый в любом из пунктов 1-53, 82-87, или выделенный мультиспецифический белок, определяемый в любом из пунктов 54-81.

114) Иммуноконъюгат формулы (V),



формула (V),

где белок представляет собой выделенный белок, определяемый в любом из пунктов 1-53, 82-87, или выделенный мультиспецифический белок, определяемый в любом из пунктов 54-81.

115) Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок по любому из пунктов 1-53, 82-87, выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 54-81, CAR по любому из пунктов 88-99, лимфоцит по любому из пунктов 100-102 или иммуноконъюгат по любому из пунктов 103-114 и фармацевтически приемлемый носитель.

116) Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок по любому из пунктов 1-53, 82-87, выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 54-81, CAR по любому из пунктов 88-99 или иммуноконъюгат по любому из пунктов 103-114.

117) Вектор, содержащий полинуклеотид по пункту 116.

118) Клетка-хозяин, содержащая вектор по пункту 117 или полинуклеотид по пункту 116.

119) Способ получения выделенного белка по любому из пунктов 1-53, 82-87 или выделенного мультиспецифического белка по любому из пунктов 54-81, включающий культивирование клетки-хозяина по пункту 118 в условиях, при которых экспрессируется белок, и извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

120) Способ получения иммуноконъюгата по любому из пунктов 103-114, включающий культивирование клетки-хозяина по пункту 118 в условиях, при которых экспрессируется белок, извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином, и конъюгирование белка, продуцируемого клеткой-хозяином, со средством.

121) Антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком по любому из пунктов 1-53 или 82-87.

122) Набор, содержащий выделенный белок по любому из пунктов 1-53, 82-87 или выделенный мультиспецифический белок по любому из пунктов 54-81 или CAR по любому из пунктов 88-99.

123) Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка по любому из пунктов 1-53, 82-87, выделенного мультиспецифического белка по любому из пунктов 54-81 или иммуноконъюгата по любому из пунктов 103-114 субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

124) Способ по пункту 123, где способ является эффективным для снижения количества экспрессирующих CD33 клеток у субъекта, при этом экспрессирующие

CD33 клетки являются раковыми клетками, или при этом экспрессирующие CD33 клетки являются нераковыми клетками.

125) Способ по пункту 123 или 124, где способ является эффективным для предупреждения развития рака с экспрессией CD33 у субъекта.

126) Способ лечения субъекта, имеющего рак с экспрессией CD33, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из пунктов 100-102 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом лимфоцит опосредует уничтожение рака с экспрессией CD33 у субъекта.

127) Способ целевого уничтожения раковой клетки, при этом способ включает приведение раковой клетки в контакт с лимфоцитом по любому из пунктов 100-102, при этом лимфоцит индуцирует целевое уничтожение раковой клетки.

128) Способ выявления присутствия рака у субъекта, включающий

a) приведение клеточного образца, полученного от субъекта, в контакт с CAR по любому из пунктов 88-99 с образованием тем самым комплекса CAR-клетка, и

b) выявление комплекса CAR-клетка, где выявление комплекса CAR-клетка указывает на присутствие рака у субъекта.

129) Способ по любому из пунктов 123-128, где рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак.

130) Способ по пункту 129, где гематологический рак представляет собой лейкоз, лимфому или множественную миелому.

131) Способ по пункту 130, где гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

132) Способ по пункту 131, где гематологический рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML).

133) Способ по любому из пунктов 123-132, где выделенный белок, выделенный мультиспецифический белок или иммуноконъюгат вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

134) Способ по пункту 133, где второе терапевтическое средство представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, андрогендепривационную терапию или облучение или любую их комбинацию.

Последовательности

SEQ ID NO: 1, CDR1 (C33B1785; C33B1787; C33B1780; C33B1789; C33B1788)
DYAIG

SEQ ID NO: 2, CDR1 (C33B1784)
TYVMG

SEQ ID NO: 3, CDR1 (C33B1786)
FSTMD

SEQ ID NO: 4, CDR1 (C33B1781)
INAMG

SEQ ID NO: 5, CDR1 (C33B1783; C33B1782)
DYAVG

SEQ ID NO: 6, CDR2 (C33B1785; C33B1780; C33B1789; C33B1788)
CISESDGRTYLSDSVKS

SEQ ID NO: 7, CDR2 (C33B1784)
AIVSGRNPTYADSVKS

SEQ ID NO: 8, CDR2 (C33B1787)
CISSSDGSTYYVDSVKG

SEQ ID NO: 9, CDR2 (C33B1786)
CIRPRYSTTTHADSIKG

SEQ ID NO: 10, CDR2 (C33B1781)
RITGGGATDYVDSVKG

SEQ ID NO: 11, CDR2 (C33B1783; C33B1782)
CISSSDGATYYADSVKG

SEQ ID NO: 12, CDR3 (C33B1785; C33B1780; C33B1789; C33B1788)
VDQAISESSYHCEKGFGS

SEQ ID NO: 13, CDR3 (C33B1784; C33B1786)
YHYSSQY

SEQ ID NO: 14, CDR3 (C33B1787)
LIIMYGSGSERAAAACRYKYEY

SEQ ID NO: 15, CDR3 (C33B1781)
DLVTRVGSDLLYDDY

SEQ ID NO: 16, CDR3 (C33B1783)
IIVRGSGWERAAAACRYEYSY

SEQ ID NO: 17, CDR3 (C33B1782)
VIVRGTGWERAAAACRYEYAY

SEQ ID NO: 18, последовательность VHH (C33B1785)
QVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAVFGFSLSDYAIGWFRQAPGKEREKVSCISESDGRTYLSDS
VKSRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPDDTGVYYCATVDQAISESSYHCEKGFGSWGQGTQVT
VSS

SEQ ID NO: 19, последовательность VHH (C33B1784)
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSTYVMGWFRQAPGQERELVAAIVSGRNPTYAD
SVKSRFTISRDNAKNTIYLHMNSLQPEDTAVYYCHMYHYSSQYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 20, последовательность VHH (C33B1787)
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAIGWFRQAPGKEREGVSCISSSDGSTYYVD
SVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTALIIMYGSGSERAAAACRYKYEYWGQ
GTQVTVSS

SEQ ID NO: 21, последовательность VHH (C33B1786)
EVQVVESGGGVVQSGGSLTLSCEASESILSFSTMDWFRQAPGKEREGVSCIRPRYSTTTHADS
IKGRFKMYSDNAKNTIYLHMNSLQPEDTAVYYCHMYHYSSQYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 22, последовательность VHH (C33B1781)

EVQVVESGGGLVQGGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWYHQAPGKQRELVARITGGGATDYVD
SVKGRFTISLDSAKSTVYLQMNSLKPEDTAVYHCYADLVTRVGSDLLYDDYWGQGTQVTVS
S

SEQ ID NO: 23, последовательность VHH (C33B1780)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVFGFSLSDYAIGWFRQAPGKEREKVSCISESDGRTYLSDS
VKSRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPDDTGVYYCATVDQAISESSYHCEKGFGSWGQGTQVT
VSS

SEQ ID NO: 24, последовательность VHH (C33B1783)
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAVGWFRQVPGKEREGVSCISSSDGATYYA
DSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCTAIIVRGSGWERAAAACRYEYSYWGQ
GTQVTVSS

SEQ ID NO: 25, последовательность VHH (C33B1782)
EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYAVGWFRQAPGKEREGISCISSSDGATYYAD
SVKGRFTISTDNAKNTAFLQMNSLKPEDTAVYYCTAVIVRGTGWERAAAACRYEYAYWGQ
GTQVTVSS

SEQ ID NO: 26, последовательность VHH (C33B1789)
QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAVFGFSLSDYAIGWFRQAPGKEREKVSCISESDGRTYLSD
SVKSRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPDDTGVYYCATVDQAISESSYHCEKGFGSWGQGTQV
TVSS

SEQ ID NO: 27, последовательность VHH (C33B1788)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVFGFSLSDYAIGWFRQAPGKEREKVSCISESDGRTYLSDS
VKSRFTISRDNGKNTVYLQMNNLKPDDTGVYYCATVDQAISESSYHCEKGFGSWGQGTQVT
VSS

SEQ ID NO: 28, CDR1 VH (C33B1474)
SFGMS

SEQ ID NO: 29, CDR1 VH (C33B1522)
SYYWG

SEQ ID NO: 30, CDR1 VH (C33B1607)
DYNIN

SEQ ID NO: 31, CDR1 VH (C33B1601)
NYAMS

SEQ ID NO: 32, CDR1 VH (C33B1517)
NYYWS

SEQ ID NO: 33, CDR1 VH (C33B1495; C33B931; C33B782)
SYWMS

SEQ ID NO: 34, CDR1 VH (C33B1478; C33B1477; C33B1476)
VSAIH

SEQ ID NO: 35, CDR1 VH (C33B1484)
VFAIH

SEQ ID NO: 36, CDR2 VH (C33B1474)
NIKRDGSEKYYVDSVKG

SEQ ID NO: 37, CDR2 VH (C33B1522)
YIYYSGSTNYNPSLKS

SEQ ID NO: 38, CDR2 VH (C33B1607)
TINPNNGVTFYNQRFKG

SEQ ID NO: 39, CDR2 VH (C33B1601)
GISNSGYSLYYPDTLKG

SEQ ID NO: 40, CDR2 VH (C33B1517)
HIYSTGNIHYNPSLKS

SEQ ID NO: 41, CDR2 VH (C33B1495)
NIKRDGSEKHYVDSVKG

SEQ ID NO: 42, CDR2 VH (C33B1478; C33B1484)
RIRSKGNSYATAYDVSVKG

SEQ ID NO: 43, CDR2 VH (C33B1477)
RIRSKGNSYATAYAASVKG

SEQ ID NO: 44, CDR2 VH (C33B1476)
RIRSKGNSYATAYNVSVKG

SEQ ID NO: 45, CDR3 VH (C33B1474)
DYGYFDF

SEQ ID NO: 46, CDR3 VH (C33B1522)
MWEILGFDP

SEQ ID NO: 47, CDR3 VH (C33B1607)
DGYDTYYAMDY

SEQ ID NO: 48, CDR3 VH (C33B1601)
DGGSYPYAMDY

SEQ ID NO: 49, CDR3 VH (C33B1517)
DNGAALFDY

SEQ ID NO: 50, CDR3 VH (C33B1495)
DYGYFDY

SEQ ID NO: 51, CDR3 VH (C33B1478; C33B1477; C33B1476; C33B1484)
HNDKWNYYGLDV

SEQ ID NO: 52, последовательность VH (C33B1474)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVANIKRDGSEKYYV
DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMSSLRAEDTAVYYCVRDYGYFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 53, последовательность VH (C33B1522)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWGWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMWEILGFDPWGQGTLVTVS

SEQ ID NO: 54, последовательность VH (C33B1607)

EVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFTDYNINWVKQSHGKNLEWIGTINPNNGVTFYNQ
RFKGQATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSRDGYDTYYAMDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 55, последовательность VH (C33B1607)
EVQLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVAGISNSGYSLYYP
DTLKGRFTISRDNARNTLYLQMISLRSEDTAMYYCARDGGSYPYAMDYWGHGTSVTVSS

SEQ ID NO: 56, последовательность VH (C33B1517)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 57, последовательность VH (C33B1495)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLDWVANIKRDGSEKHY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDSAVYYCTRDYGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 58, последовательность VH (C33B1478)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNSYATAY
DVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVS
S

SEQ ID NO: 59, последовательность VH (C33B1477)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNSYATAY
AASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVS
S

SEQ ID NO: 60, последовательность VH (C33B1476)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNSYATAY
NVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVS
S

SEQ ID NO: 61, последовательность VH (C33B1484)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVFAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNSYATAY
DVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVS
S

SEQ ID NO: 62, CDR1 VL (C33B1474)
QASQAISNYLN

SEQ ID NO: 63, CDR1 VL (C33B1522)
SGSSSNIGSNPVN

SEQ ID NO: 64, CDR1 VL (C33B1607)
KASQDVRTAEA

SEQ ID NO: 65, CDR1 VL (C33B1601)
KASQNVGTYVA

SEQ ID NO: 66, CDR1 VL (C33B1517; C33B1516)
SGSSSNIGSNIVN

SEQ ID NO: 67, CDR1 VL (C33B1495)
RASQGISSYLA

SEQ ID NO: 68, CDR1 VL (C33B1478; C33B1477; C33B1476; C33B1484)
KSSQSLLFSNGYKFLD

SEQ ID NO: 69, CDR2 VL (C33B1474)
DASNLET

SEQ ID NO: 70, CDR2 VL (C33B1522; C33B1517)
SNNQRPS

SEQ ID NO: 71, CDR2 VL (C33B1607)
SASNRYT

SEQ ID NO: 72, CDR2 VL (C33B1601)
SASYRYS

SEQ ID NO: 73, CDR2 VL (C33B1495)
AASTLQS

SEQ ID NO: 74, CDR2 VL (C33B1478; C33B1477; C33B1476; C33B1484; C33B1475)
LGSYRAS

SEQ ID NO: 75, CDR3 VL (C33B1474)
QHYDNLPYT

SEQ ID NO: 76, CDR3 VL (C33B1522; C33B1517; C33B1516)
AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 77, CDR3 VL (C33B1607)
QQYYTTPRT

SEQ ID NO: 78, CDR3 VL (C33B1601)
QQYKSYPLT

SEQ ID NO: 79, CDR3 VL (C33B1495)
QQLNSYPVT

SEQ ID NO: 80, CDR3 VL (C33B1478; C33B1477; C33B1476; C33B1484)
MQALQTPPT

SEQ ID NO: 81, последовательность VL (C33B1474)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQAISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTFTISSLQPEDFSTYFCQHYDNLPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 82, последовательность VL (C33B1522)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 83, последовательность VL (C33B1607)
DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAEAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRF
TGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQYYTTPRTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 84, последовательность VL (C33B1601)
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTYVAWYQQKPGHSPKALIYSASYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYKSYPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO: 85, последовательность VL (C33B1517)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 86, последовательность VL (C33B1495)
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKVLIYAASTLQSGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQLNSYPVTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 87, последовательность VL (C33B1478; C33B1477; C33B1476)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO: 88, последовательность VL (C33B1484)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 89, CDR1 VH (C33B933; C33B919; C33B937; C33B125)
SYGMH

SEQ ID NO: 90, CDR2 VH (C33B933; C33B919; C33B937; C33B125)
VISYDGSNKYYADSVKG

SEQ ID NO: 91, CDR2 VH (C33B931; C33B782)
NIKQHGSEKYYVDSVKG

SEQ ID NO: 92, CDR3 VH (C33B933)
DFRSLDWLPPDSTSYDGMDV

SEQ ID NO: 93, CDR3 VH (C33B933)
DFRSFDWLPPDSTSYYGMDV

SEQ ID NO: 94, CDR3 VH (C33B931)
DRDLGYFDY

SEQ ID NO: 95, последовательность VH (C33B933)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVISYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSLDWLPPDSTSYDGMDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 96, последовательность VH (C33B919; C33B125)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSTSYYGMDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 97, последовательность VH (C33B931)
EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHGSEKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDLGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 98, CDR1 VL (C33B933)
SGHKLGDKYAS

SEQ ID NO: 99, CDR1 VL (C33B919)
SGDKLGDKYVS

SEQ ID NO: 100, CDR1 VL (C33B931)
SGDKLGSKFAS

SEQ ID NO: 101, CDR2 VL (C33B933)
KDSKRPS

SEQ ID NO: 102, CDR2 VL (C33B919; C33B125)
QDRKRPS

SEQ ID NO: 103, CDR2 VL (C33B931)
QDSKRPS

SEQ ID NO: 104, CDR3 VL (C33B933; C33B919; C33B931; C33B782; C33B125)
QAWDSSTVV

SEQ ID NO: 105, последовательность VL (C33B933)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYASWYQQKPGQSPVVVIYKDSKRPSGIPERFSGS
NFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 106, последовательность VL (C33B919)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVVVIHQDRKRPSGIPERFSG
SNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 107, последовательность VL (C33B931)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 108, линкерная последовательность
GGSEGKSSGSGSESKSTGGS

SEQ ID NO: 109, линкерная последовательность
GGGSGGGS

SEQ ID NO: 110, линкерная последовательность
GGGSGGGSGGGS

SEQ ID NO: 111, линкерная последовательность
GGGSGGGSGGGSGGGS

SEQ ID NO: 112, линкерная последовательность
GGGSGGGSGGGSGGGSGGGS

SEQ ID NO: 113, линкерная последовательность
GGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 114, линкерная последовательность
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 115, линкерная последовательность
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS

SEQ ID NO: 116, линкерная последовательность
GSTSGSGKPGSGEGSTKG

SEQ ID NO: 117, линкерная последовательность
IRPRAIGGSKPRVA

SEQ ID NO: 118, линкерная последовательность
GKGGSGKGGSGKGGS

SEQ ID NO: 119, линкерная последовательность
GGKGSGGKGSGGKGS

SEQ ID NO: 120, линкерная последовательность
GGGKSGGGKSGGGKS

SEQ ID NO: 121, линкерная последовательность
GKGKSGKGKSGKGKS

SEQ ID NO: 122, линкерная последовательность
GGGKSGGKGSGKGGS

SEQ ID NO: 123, линкерная последовательность
GKPGSGKPGSGKPGS

SEQ ID NO: 124, линкерная последовательность
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

SEQ ID NO: 125, линкерная последовательность
GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS

SEQ ID NO: 126, линкерная последовательность
STAGDTHLGGEDFD

SEQ ID NO: 127, линкерная последовательность
GEGGSGEGGSGEGGS

SEQ ID NO: 128, линкерная последовательность
GGEGSGGEGSGGEGS

SEQ ID NO: 129, линкерная последовательность
GEGESGEGESGEGES

SEQ ID NO: 130, линкерная последовательность
GGGESGGEGSGEGGS

SEQ ID NO: 131, линкерная последовательность

GEGESGEGESGEGESGEGES

SEQ ID NO: 132, линкерная последовательность
GSTSGSGKPGSGEGSTKG

SEQ ID NO: 133, линкерная последовательность
PRGASKSGSASQTGSAPGS

SEQ ID NO: 134, линкерная последовательность
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG

SEQ ID NO: 135, линкерная последовательность
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG

SEQ ID NO: 136, линкерная последовательность
GKPGSGKPGSGKPGSGKPGS

SEQ ID NO: 137, линкерная последовательность
GSGS

SEQ ID NO: 138, линкерная последовательность
APAPAPAPAP

SEQ ID NO: 139, линкерная последовательность
APAPAPAPAPAPAPAPAP

SEQ ID NO: 140, линкерная последовательность
AEAAAKEAAAKEAAAAKEAAAAKEAAAAKAAA

SEQ ID NO: 141, HCDR1 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
TYAMN

SEQ ID NO: 142, HCDR2 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
RIRSKYNNYATYYAASVKG

SEQ ID NO: 143, HCDR3 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)

HGNFGNSYVSWFAY

SEQ ID NO: 144, LCDR1 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
RSSTGAVTTSNYAN

SEQ ID NO: 145, LCDR2 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
GTNKRAP

SEQ ID NO: 146, LCDR3 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
ALWYSNLWV

SEQ ID NO: 147, VH антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT
YYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 148, VL антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B219)
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPA
RFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 149, HCDR1 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
NNNAAWS

SEQ ID NO: 150, HCDR2 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
RTYYRSKWLYDYAVSVKS

SEQ ID NO: 151, HCDR3 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
GYSSSFDY

SEQ ID NO: 152, LCDR1 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
TGTSSNIGTYKFVS

SEQ ID NO: 153, LCDR2 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
EVSKRPS

SEQ ID NO: 154, LCDR3 антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)

VSYAGSGTLL

SEQ ID NO: 155, VH антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
QVQLQQSGPRLVRPSQTLSLTCAISGDSVFNNNAAWSWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWLY
DYAVSVKSRITVNPDTSRNQFTLQLNSVTPEDTALYYCARGYSSSFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 156, VL антигенсвязывающего домена, который связывает CD3ε (CD3B376)
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSNIGTYKFVSWYQQHPDKAPKVLLYEVSKRPSGVSSRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDQADYHCVSYAGSGTLLFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 157, CD8a-шарнирная область CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33
TSTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

SEQ ID NO: 158, шарнирная область CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33
EPKSCDKTHTCPPCP

SEQ ID NO: 159, шарнирная область CAR, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывает CD33
ERKCCVECPPCP

SEQ ID NO: 160, шарнирная область CAR, содержащая антигенсвязывающий домен, который связывает CD33
ELKTPLGDTTHTCPRCP(EPKSCDTPPPCPRCP)$_3$

SEQ ID NO: 161, шарнирная область CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33
ESKYGPPCPSCP

SEQ ID NO: 162, CD8a трансмембранная область CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33
IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC

SEQ ID NO: 163, CD137 костимуляторный домен CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

SEQ ID NO: 164, CD137 костимуляторный домен CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33

RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 165, домен внутриклеточной передачи сигнала CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33

KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCELRVKFSRSADAPAYKQGQNQL YNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGER RRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

SEQ ID NO: 166, шарнирная область CAR, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывает CD33

ESKYGPPCPSCP

SEQ ID NO: 167, CDR1 VH (C33B836)

NYAMN

SEQ ID NO: 168, CDR2 VH (C33B836)

WINTNTGNPTYAQGFTG

SEQ ID NO: 169, CDR3 VH (C33B836)

DRDRGTDY

SEQ ID NO: 170, последовательность VH (C33B836)

QVQLVQSGSELRKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINTNTGNPT YAQGFTGRFVFSLDTSVSSAYLQISSLKAEDTAMYYCATDRDRGTDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 171, последовательность VH (C33B782)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHGSEKYY VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDLGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 172, CDR1 VH (C33B806)

SSSYYWG

SEQ ID NO: 173, CDR2 VH (C33B806)
SINYSGSTYYNPSLKS

SEQ ID NO: 174, CDR3 VH (C33B806)
LDGYESPFDY

SEQ ID NO: 175, последовательность VH (C33B806)
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLDWIGSINYSGSTYYNPS
LKSRVTISVDTSKIQFSLKLRSVTAADTAVYYCARLDGYESPFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 176, CDR1 VH (C33B904)
DYAMH

SEQ ID NO: 177, CDR2 VH (C33B904)
GIGWSGGSIVYADSVKG

SEQ ID NO: 178, CDR3 VH (C33B904)
DSPYGDFFDY

SEQ ID NO: 179, последовательность VH (C33B904)
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIGWSGGSIVY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 180, CDR3 VH (C33B937)
DFRSFDWLPPDSASYHGMDV

SEQ ID NO: 181, последовательность VH (C33B937)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 182, CDR1 VL (C33B836)
TGTSSDVGDYNYVS

SEQ ID NO: 183, CDR2 VL (C33B836)
DVSNRPS

SEQ ID NO: 184, CDR3 VL (C33B836)
SSYSSSSALEV

SEQ ID NO: 185, последовательность VL (C33B836)
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDYNYVSWYQQHPGKVPKLMIYDVSNRPSGVSN
RFSGSMSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 186, CDR1 VL (C33B782)
SGNKLGAKFAS

SEQ ID NO: 187, CDR2 VL (C33B782)
QDNKRPS

SEQ ID NO: 188, последовательность VL (C33B782)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 189, CDR1 VL (C33B806)
RASQGISSWLA

SEQ ID NO: 190, CDR2 VL (C33B806)
AASSLQS

SEQ ID NO: 191, CDR3 VL (C33B806)
QQANSFPFT

SEQ ID NO: 192, последовательность VL (C33B806)
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFTFGPGTKVDIK

SEQ ID NO: 193, CDR1 VL (C33B904)
KSSQTVFYSSNNKNYLA

SEQ ID NO: 194, CDR2 VL (C33B904)
WASTRKS

SEQ ID NO: 195, CDR3 VL (C33B904)

QHYYSTPYT

SEQ ID NO: 196, последовательность VL (C33B904)
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWASTRKS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 197, CDR1 VL (C33B937)
SGDKLGDKYAS

SEQ ID NO: 198, CDR2 VL (C33B937)
QDGKRPS

SEQ ID NO: 199, CDR3 VL (C33B937)
QAWDRNTVV

SEQ ID NO: 200, последовательность VL (C33B937)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDGKRPSGIPERFSG
SNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRNTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 201, CDR1 VL (C33B125)
SGDKLGDKYVC

SEQ ID NO: 202, последовательность VL (C33B125)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVVIHQDRKRPSGIPERFSG
SNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 203, scFv (C33B836)
QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGDYNYVSWYQQHPGKVPKLMIYDVSNRPSGVSN
RFSGSMSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYSSSSALEVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSES
KSTGGSQVQLVQSGSELRKPGASVKVSCKASGYTFTNYAMNWVRQAPGQGLEWMGWINT
NTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVSSAYLQISSLKAEDTAMYYCATDRDRGTDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 204, scFv (C33B782)
SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGNKLGAKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDNKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAVDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGS

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHGSEKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDLGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 205, scFv (C33B806)

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPFTFGPGTKVDIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGS
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLDWIGSINYSGSTYYNPS
LKSRVTISVDTSKIQFSLKLRSVTAADTAVYYCARLDGYESPFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 206, scFv (C33B904)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLISWASTRKS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSTPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGS
ESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIG
WSGGSIVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDSPYGDFFDYWGQGT
LVTVSS

SEQ ID NO: 207, scFv (C33B933)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGHKLGDKYASWYQQKPGQSPVVVIYKDSKRPSGIPERFSGS
NFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGS
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVISYDGSNKYY
ADSVKGRFTISRDNSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSLDWLPPDSTSYDGMDVWG
QGTTVTVSS

SEQ ID NO: 208, scFv (C33B937)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYQDGKRPSGIPERFSG
SNFGNKATLTISGTQAMDEADYYCQAWDRNTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTG
GSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK
YYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEGTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSASYHGMDV
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 209, scFv (C33B919)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVSWYQQKPGQSPVVVIHQDRKRPSGIPERFSG
SNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGG
SQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSTSYYGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 210, scFv (C33B125)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYVCWYQQKPGQSPVVVIHQDRKRPSGIPERFSG
SNFGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGG
SQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFRSFDWLPPDSTSYYGMDVW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 211, scFv (C33B931)

SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGSKFASWYQQKPGQSPVLVIYQDSKRPSGIPERFSGS
NSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKSTGGS
EVQLVESGGGFVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQHGSEKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRDLGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 212, scFv (C33B1474)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQAISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTFTISSLQPEDFSTYFCQHYDNLPYTFGQGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGS
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVANIKRDGSEKYYV
DSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMSSLRAEDTAVYYCVRDYGYFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 213, scFv (C33B1522)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLGGSEGKSSGSGSESKST
GGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWGWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYN
PSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMWEILGFDPWGQGTLVTVS

SEQ ID NO: 214, scFv (C33B1607)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVRTAEAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRF
TGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQYYTTPRTFGGGTKLEIKGGSEGKSSGSGSESKSTG
GSEVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKASGYTFTDYNINWVKQSHGKNLEWIGTINPNNGVTFY
NQRFKGQATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSRDGYDTYYAMDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO: 215, scFv (C33B1601)

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTYVAWYQQKPGHSPKALIYSASYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYKSYPLTFGAGTKLELKGGSEGKSSGSGSESKST
GGSEVQLVESGGGLVRPGGSLKLSCAASGFTFSNYAMSWVRQTPEKRLEWVAGISNSGYSL
YYPDTLKGRFTISRDNARNTLYLQMISLRSEDTAMYYCARDGGSYPYAMDYWGHGTSVTVS
S

SEQ ID NO: 216, scFv (C33B1517)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGPGTKVTVLGGSEGKSSGSGSESKS
TGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIH
YNPSLKSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 217, scFv (C33B1495)
DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKVLIYAASTLQSGVPSRFSG
SGSGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQLNSYPVTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESKSTGGSE
VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLDWVANIKRDGSEKHYV
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDSAVYYCTRDYGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 218, scFv (C33B1478)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESK
STGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNS
YATAYDVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 219, scFv (C33B1477)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESK
STGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNS
YATAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 220, scFv (C33B1476)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESK
STGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNS
YATAYNVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 221, scFv (C33B1484)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESK

STGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVFAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNS
YATAYDVSVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQG
TTVTVSS

SEQ ID NO: 222, IgG1 дикого типа
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 223, IgG2 дикого типа
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTV
VHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 224, IgG4 дикого типа
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 225, антиген CD33: HSA N-концевое слияние; CynoCD33ECD-HSA(C34S)-6xHis
DPRVRLEVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPVPYHTRNSPVHGYWFREGAIVSLDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMEKGSTKYSYKSTQLSVHVTDL
THRPQILIPGALDPDHSKNLTCSVPWACEQGTPPIFSWMSAAPTSLGLRTTHSSVLIITPRPQDH
GTNLTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVSYASQNPRTDIFLGDGSGKQGVVQGSGSGSENLYFQG
VRSSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADE
SAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRP
EVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKV

HTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAA
DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV
SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPC
FSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD
DFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSHHHHHH

SEQ ID NO: 226, антиген CD33: HSA N-концевое слияние; человеческий CD33ECD-Tev-HSA(C34S)-6xHis

DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDL
THRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDH
GTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSGSGSENL
YFQGVRSSSDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTC
VADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPR
LVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKA
ACLLPKLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVT
DLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEM
PADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEK
CCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLV
NRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLK
AVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLGGGSHHHHHH

SEQ ID NO: 227, антиген CD33: HSA N-концевое слияние; hCD33 Ig-подобный домен V-типа (Uniprot P20138, V136-H259), слитый с HSA и 6xHis-меткой на C-конце

DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDL
THRDAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADES
AENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPE
VDVMCTAFHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLP
KLDELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKV
HTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPS
LAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAA
DPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEV
SRNLGKVGSKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPC

FSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD
DFAAFVEKCCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

SEQ ID NO: 228, антиген CD33: HSA N-концевое слияние; Ig-подобный домен C2-типа hCD33 (Uniprot P20138, V136-H259), слитый с HSA и 6xHis-меткой на C-конце
VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT
PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHDAH
KSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQQSPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKS
LHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTA
FHDNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDELRDE
GKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGD
LLECADDRADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVES
KDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAK
VFDEFKPLVEEPQNLIKQNCELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVG
SKCCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET
YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKC
CKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGLHHHHHH

SEQ ID NO: 229, антиген CD33: hCD33_Ig-подобный домен V-типа
DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDL
THRGSHHHHHH

SEQ ID NO: 230, антиген CD33: Ig-подобный домен C2-типа hCD33
VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIIT
PRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSH
HHHHH

SEQ ID NO: 231, антиген CD33: MuIgV_Hu IgC2 химера CD33-6xHis_v1
QDLEFQLVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTLGPVTGSWLRKGVSLHEDSPVATSDPRQ
LVQKATQGRFQLLGDPQKHDCSLFIRDAQKNDTGMYFFRVVREPFVRYSYKKSQLSLHVTSL
SRTPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDHG
TNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSHHHHHH

SEQ ID NO: 232, антиген CD33: MuIgV_cyno IgC2 химера CD33-6xHis_v1
QDLEFQLVAPESVTVEEGLCVHVPCSVFYPSIKLTLGPVTGSWLRKGVSLHEDSPVATSDPRQ
LVQKATQGRFQLLGDPQKHDCSLFIRDAQKNDTGMYFFRVVREPFVRYSYKKSQLSLHVTSL

SRTPQILIPGALDPDHSKNLTCSVPWACEQGTPPIFSWMSAAPTSLGLRTTHSSVLIITPRPQDH
GTNLTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVSYASQNPRTDIFLGDGSGRKARKQGVVQGSHHHHHH

SEQ ID NO: 233, антиген CD33: CD33 человека ECD (D18-H259) из Uniprot P20138 с C-концевой меткой 6xHis
DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDL
THRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDH
GTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSGKQETRAGVVHGSHHHHHH

SEQ ID NO: 234, антиген CD33: Cyno CD33 ECD (D37-Q274) из XP_005590138.1 с C-концевой меткой 6xHis
DPRVRLEVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPVPYHTRNSPVHGYWFREGAIVSLDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMEKGSTKYSYKSTQLSVHVTDL
THRPQILIPGALDPDHSKNLTCSVPWACEQGTPPIFSWMSAAPTSLGLRTTHSSVLIITPRPQDH
GTNLTCQVKFPGAGVTTERTIQLNVSYASQNPRTDIFLGDGSGKQGVVQGSHHHHHH

SEQ ID NO: 235, антиген CD33: CD33 человека ECD (D18-G241) из Uniprot P20138 с меткой 6xHis
DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYYDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVATNKLD
QEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDL
THRPKILIPGTLEPGHSKNLTCSVSWACEQGTPPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSSVLIITPRPQDH
GTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGHHHHHH

SEQ ID NO: 236, последовательность HCDR1 mAb к TRGV9 LP7A5_1, LP7A5_2, LP7A5_3, LP7A5_4
DHYIN

SEQ ID NO: 237, последовательность HCDR2 mAb к TRGV9 LP7A5_1, LP7A5_2, LP7A5_3, LP7A5_4
QIYPGDGNTYYNQKFKG

SEQ ID NO: 238, последовательность HCDR3 mAb к TRGV9 LP7A5_1
NYGDYTIDF

SEQ ID NO: 239, последовательность LCDR1 mAb к TRGV9 LP7A5_1, LP7A5_2, LP7A5_3, LP7A5_4
KSSQSLLYSSNQKNYLA

SEQ ID NO: 240, последовательность LCDR2 mAb к TRGV9 LP7A5_1, LP7A5_2, LP7A5_3, LP7A5_4
WASTRES

SEQ ID NO: 241, последовательность LCDR3 mAb к TRGV9 LP7A5_1, LP7A5_2, LP7A5_3, LP7A5_4
QQYYRYHT

SEQ ID NO: 242, последовательность HCDR3 mAb к TRGV9 LP7A5_2
NMGMYTIDF

SEQ ID NO: 243, последовательность HCDR3 mAb к TRGV9 LP7A5_3
NMGMYTLDF

SEQ ID NO: 244, последовательность HCDR3 mAb к TRGV9 LP7A5_4
NYGDYTLDF

SEQ ID NO: 245, последовательность тяжелой цепи LP7A5_1
EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDHYINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGDGNTYYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAPNYGDYTIDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 246, последовательность тяжелой цепи LP7A5_2
EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDHYINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGDGNTYYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAPNMGMYTIDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 247, последовательность тяжелой цепи LP7A5_3
EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDHYINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGDGNTYYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAPNMGMYTLDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 248, последовательность тяжелой цепи LP7A5_4
EVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDHYINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGDGNTYYN
QKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAPNMGMYTLDFWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 249, последовательность легкой цепи LP7A5_1
DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYRYHTFGTGTKLEIK

SEQ ID NO: 250, последовательность формирующего впадину плеча антитела к TRGV9

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNYLAW
YQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYRYHTF
GTGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSS
GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDHYINWV
KQRTGQGLEWIGQIYPGDGNTYYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAP
NYGDYTIDFWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP
CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 251, последовательность формирующего выступ плеча антитела к CD33

MAWVWTLLFLMAAAQSIQADIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQTVFYSSNNKNYLAWY
QQKPGQPPKLLISWASTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTVSSLQAEDVAVYYCQHYYSTPYTF
GQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSS
GSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHW
VRQAPGKGLEWVSGIGWSGGSIVYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCA
KDSPYGDFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
RLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 252, последовательность формирующего выступ плеча антитела к RSV

MAWVWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQ
APRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEI
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKST
EGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGL
EWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSTDLDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEA
AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEM
TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID NO: 253, CDR1 VH (C33B1475)
SYWMT

SEQ ID NO: 254, CDR1 VH (C33B1516)
NYYWS

SEQ ID NO: 255, CDR1 VH (C33B1481)
NYWMS

SEQ ID NO: 256, CDR2 VH (C33B1475)
NIKQDGSERYYVDSVKG

SEQ ID NO: 257, CDR2 VH (C33B1516)
HIFSTGHINYDSSLKS

SEQ ID NO: 258, CDR2 VH (C33B1481)
SIKRDGSDKYYVDSVKG

SEQ ID NO: 259, CDR3 VH (C33B1475)
EVGYNWNQGGYFDY

SEQ ID NO: 260, CDR3 VH (C33B1516)
DNGAALFDF

SEQ ID NO: 261, CDR3 VH (C33B1481)
GEFDY

SEQ ID NO: 262, последовательность VH (C33B1475)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 263, последовательность VH (C33B1516)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 264, последовательность VH (C33B1481)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKRDGSDKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMHSLRAEDTAVYYCAKGEFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 265, CDR1 VL (C33B1475)
RSSQSLLHSDGYNYLD

SEQ ID NO: 266, CDR1 VL (C33B1481)
RSSQSLVYSDGNTYLN

SEQ ID NO: 267, CDR2 VL (C33B1516)
SDNQRPS

SEQ ID NO: 268, CDR2 VL (C33B1481)
KVSTRDS

SEQ ID NO: 269, CDR3 VL (C33B1475)
MQVLQTPWT

SEQ ID NO: 270, CDR3 VL (C33B1481)
LQGTHWPWT

SEQ ID NO: 271, последовательность VL (C33B1475)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSDGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQVLQTPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 272, последовательность VL (C33B1516)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 273, последовательность VL (C33B1481)
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSTRDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVAVYYCLQGTHWPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 274, scFv (C33B1475)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSDGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQVLQTPWTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSESK
STGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDGS
ERYYVDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQ
GTLVTVSS

SEQ ID NO: 275, scFv (C33B1516)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGTGTKVTVLGGSEGKSSGSGSESKS
TGGSQVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINY
DSSLKSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 276, scFv (C33B1481)
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSTRDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVAVYYCLQGTHWPWTFGQGTKVEIKGGSEGKSSGSGSE
SKSTGGSQVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKRD
GSDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMHSLRAEDTAVYYCAKGEFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 277, huIgG1_G1m(17)-шарнир-FC_C220S|IgG1| (C33B1475; C33B1516; C33B1481; C33B1477; C33B1517; C33B1522)
EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 278, huIgG1_G1m(17)
EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 279, Fab HC (C33B1475)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKRDGSDKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMHSLRAEDTAVYYCAKGEFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS

VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO: 280, Fab HC (C33B1516)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNGAALFDFWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO: 281, Fab HC (C33B1481)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFSNYWMSWVRQAPGKGLEWVASIKRDGSDKYY
VDSVKGRFTISRDNAKNSLSLQMHSLRAEDTAVYYCAKGEFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO: 282, Fab HC (C33B1477)
EVQLVESGGGLVQPGGSLKVSCEASGFTFSVSAIHWVRQASGKGLEWIGRIRSKGNSYATAY
AASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMDSLKTEDTAVYYCTRHNDKWNYYGLDVWGQGTTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO: 283, Fab HC (C33B1517)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNGAALFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO: 284, Fab HC (C33B1522)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWGWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNPSL
KSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARMWEILGFDPWGQGTLVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

SEQ ID NO: 285, Fab LC (C33B1475)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSDGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGIYYCMQVLQTPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE

QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 286, Fab LC (C33B1516)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGTGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE
ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 287, Fab LC (C33B1481)
DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKVSTRDSGV
PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVAVYYCLQGTHWPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 288, Fab LC (C33B1477)
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSLLFSNGYKFLDWYLQRPGQSPQLLIYLGSYRASGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMQALQTPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 289, Fab LC (C33B1517)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGPGTKVTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE
ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 290, Fab LC (C33B1522)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSE
ELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQ
WKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

SEQ ID NO: 291, (C33B1475VH1-2)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQGGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 292, (C33B1475VH1-3)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQAGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 293, (C33B1475VH1-5)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQYGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 294, (C33B1475VH1-12)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQPGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 295, (C33B1475VH1-14)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQNGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 296, (C33B1475VH1-22)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQSGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 297, (C33B1475VH1-27)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQRGSERYY
VDS
VKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 298, (C33B1475VH1-32)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQLGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 299, (C33B1475VH1-36)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQVGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 300, (C33B1475VH1-46)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQTGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 301, (C33B1475VH1-63)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQFGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 302, (C33B1475VH1-89)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQWGSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 303, (C33B1475VH2-12)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDVSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 304, (C33B1475VH2-16)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDPSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 305, (C33B1475VH2-20)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDRSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 306, (C33B1475VH2-22)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDASERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 307, (C33B1475VH2-24)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDLSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 308, (C33B1475VH2-35)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDQSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 309, (C33B1475VH2-58)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDTSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 310, (C33B1475VH2-86)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVVSGFTFSSYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKQDHSERYY
VDSVKGRFTISRDSAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREVGYNWNQGGYFDYWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO: 311, (C33B1516 VL1-1)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLVGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 312, (C33B1516 VL1-2)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLRGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 313, (C33B1516 VL1-4)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLPGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 314, (C33B1516 VL1-10)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLTGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 315, (C33B1516 VL1-11)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLGGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 316, (C33B1516 VL1-14)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLQGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 317, (C33B1516 VL1-16)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 328, (C33B1516 VL1-20)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLAGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 319, (C33B1516 VL1-22)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLLGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 320, (C33B1516 VL1-23)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLYGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 321, (C33B1516 VL1-30)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLEGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 322, (C33B1516VL1-39)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLFGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 323, (C33B1516VL1-41)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLDGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 324, (C33B1516VL1-63)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLIGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 325, (C33B1516VL1-90)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLHGPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 326, (C33B1516 VL2-3)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNVPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 327, (C33B1516 VL2-4)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNPPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 328, (C33B1516 VL2-7)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNRPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 329, (C33B1516 VL2-8)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNDPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 330, (C33B1516 VL2-10)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNEPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 331, (C33B1516 VL2-11)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNWPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 332, (C33B1516 VL2-29)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNYPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 333, (C33B1516 VL2-35)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNAPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 334, (C33B1516VL2-37)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNNPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 335, (C33B1516VL2-38)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNKPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 336, (C33B1516VL2-90)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLLYSDNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNLPVFGTGTKVTVL

SEQ ID NO: 337, (C33B1516VH1-1)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDVGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 338, (C33B1516VH1-3)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDSGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 339, (C33B1516VH1-4)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDEGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 340, (C33B1516VH1-6)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDHGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 341, (C33B1516VH1-7)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDAGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 342, (C33B1516VH1-8)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDGGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 343, (C33B1516VH1-10)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDKGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 344, (C33B1516VH1-13)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDTGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 345, (C33B1516VH1-17)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDFGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 346, (C33B1516VH1-20)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDVGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 347, (C33B1516VH1-21)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDRGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 348, (C33B1516VH1-27)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDLGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 349, (C33B1516VH1-38)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDHGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 350, (C33B1516VH1-56)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDIGAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 351, (C33B1516VH2-8)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNSAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 352, (C33B1516VH2-9)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGGSIRNYYWSWIRQSAGKELEWFGHIFSTGHINYDSSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNAAALFDFWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 353, (C33B1517VL1-1)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLGGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 354, (C33B1517VL1-7)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLDGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 355, (C33B1517VL1-8)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLPGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 356, (C33B1517VL1-12)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLKGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 357, (C33B1517VL1-13)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLEGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 358, (C33B1517VL1-16)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLAGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 359, (C33B1517VL1-22)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLRGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 360, (C33B1517VL1-24)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLQGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 361, (C33B1517VL1-27)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLIGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 362, (C33B1517VL1-35)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLVGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 363, (C33B1517VL1-49)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLHGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 364, (C33B1517VL1-66)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLKGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 365, (C33B1517VL1-69)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLWGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 366, (C33B1517VL1-71)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNIVNWYQQFPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRVS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGPGTKVTVL

SEQ ID NO: 367, (C33B1517VH1-1)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDRGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 368, (C33B1517VH1-3)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDPGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 369, (C33B1517VH1-4)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDGGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 370, (C33B1517VH1-6)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDVGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 371, (C33B1517VH1-8)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDLGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 372, (C33B1517VH1-11)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDDGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 373, (C33B1517VH1-17)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDEGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 374, (C33B1517VH1-33)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDAGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 375, (C33B1517VH1-60)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDQGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 376, (C33B1517VH1-71)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDTGAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 377, (C33B1517VH2-7)

QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNSAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 378, (C33B1517VH2-30)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNAAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 379, (C33B1517VH2-31)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNLAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 380, (C33B1517VH2-60)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNPAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 381, (C33B1517VH2-68)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNTAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 382, (C33B1517VH2-76)
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCSVSGASIRNYYWSWIRQTAGKGLEWLGHIYSTGNIHYNPSL
KSRVTMSVDTSNNQFSLKLRSVTAADTAVYYCARDNQAALFDYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 383, (C33B1522VL1-2)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 384, (C33B1522VL1-3)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLQGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 385, (C33B1522VL1-4)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLVGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 386, (C33B1522VL1-5)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLGGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 387, (C33B1522VL1-7)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLWGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 388, (C33B1522VL1-12)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLTGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 389, (C33B1522VL1-15)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLIGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 390, (C33B1522VL1-27)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLEGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 391, (C33B1522VL1-29)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLAGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 392, (C33B1522VL1-32)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLRGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 393, (C33B1522VL1-47)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLLGPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 394, (C33B1522VL2-82)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNVPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 395, (C33B1522VL2-1)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNAPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 396, (C33B1522VL2-2)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNPPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 397, (C33B1522VL2-8)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNLPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 398, (C33B1522VL2-17)
QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNPVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFS
GSKSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAAWDDSLNTPVFGGGTKLTVL

SEQ ID NO: 399, HC AbM CDR1 (C33B1522)
GGSISSYYWG

SEQ ID NO: 400, HC AbM CDR1 (C33B1477)
GFTFSVSAIH

SEQ ID NO: 401, HC AbM CDR1 (C33B1475)
GFTFSSYWMT

SEQ ID NO: 402, HC AbM CDR1 (C33B1517)
GASIRNYYWS

SEQ ID NO: 403, HC AbM CDR1 (C33B1516)
GGSIRNYYWS

SEQ ID NO: 404, HC AbM CDR1 (C33B1481)
GITFSNYWMS

SEQ ID NO: 405, HC AbM CDR2 (C33B1522)
YIYYSGSTN

SEQ ID NO: 406, HC AbM CDR2 (C33B1477)

RIRSKGNSYATA

SEQ ID NO: 407, HC AbM CDR2 (C33B1475)
NIKQDGSERY

SEQ ID NO: 408, HC AbM CDR2 (C33B1517)
HIYSTGNIH

SEQ ID NO: 409, HC AbM CDR2 (C33B1516)
HIFSTGHIN

SEQ ID NO: 410, HC AbM CDR2 (C33B1481)
SIKRDGSDKY

SEQ ID NO: 411, HC AbM CDR3 (C33B1522)
MWEILGFDP

SEQ ID NO: 412, HC AbM CDR3 (C33B1477)
HNDKWNYYGLDV

SEQ ID NO: 413, HC AbM CDR3 (C33B1475)
EVGYNWNQGGYFDY

SEQ ID NO: 414, HC AbM CDR3 (C33B1517)
DNGAALFDY

SEQ ID NO: 415, HC AbM CDR3 (C33B1516)
DNGAALFDF

SEQ ID NO: 416, HC AbM CDR3 (C33B1481)
GEFDY

SEQ ID NO: 417, LC AbM CDR1 (C33B1522)
SGSSSNIGSNPVN

SEQ ID NO: 418, LC AbM CDR1 (C33B1477)
KSSQSLLFSNGYKFLD

SEQ ID NO: 419, LC AbM CDR1 (C33B1475)
RSSQSLLHSDGYNYLD

SEQ ID NO: 420, LC AbM CDR1 (C33B1517)
SGSSSNIGSNIVN

SEQ ID NO: 421, LC AbM CDR1 (C33B1516)
SGSSSNIGSNIVN

SEQ ID NO: 422, LC AbM CDR1 (C33B1481)
RSSQSLVYSDGNTYLN

SEQ ID NO: 423, LC AbM CDR2 (C33B1522)
SNNQRPS

SEQ ID NO: 424, LC AbM CDR2 (C33B1477)
LGSYRAS

SEQ ID NO: 425, LC AbM CDR2 (C33B1475)
LGSYRAS

SEQ ID NO: 426, LC AbM CDR2 (C33B1517)
SNNQRPS

SEQ ID NO: 427, LC AbM CDR2 (C33B1516)
SDNQRPS

SEQ ID NO: 428, LC AbM CDR2 (C33B1481)
KVSTRDS

SEQ ID NO: 429, LC AbM CDR3 (C33B1522)
AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 430, LC AbM CDR3 (C33B1477)
MQALQTPPT

SEQ ID NO: 431, LC AbM CDR3 (C33B1475)
MQVLQTPWT

SEQ ID NO: 432, LC AbM CDR3 (C33B1517)
AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 433, LC AbM CDR3 (C33B1516)
AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 434, LC AbM CDR3 (C33B1481)
LQGTHWPWT

SEQ ID NO: 435, HC CHOTHIA CDR1 (C33B1522)
GGSISSY

SEQ ID NO: 436, HC CHOTHIA CDR1 (C33B1477)
GFTFSVS

SEQ ID NO: 437, HC CHOTHIA CDR1 (C33B1475)
GFTFSSY

SEQ ID NO: 438, HC CHOTHIA CDR1 (C33B1517)
GASIRNY

SEQ ID NO: 439, HC CHOTHIA CDR1 (C33B1516)
GGSIRNY

SEQ ID NO: 440, HC CHOTHIA CDR1 (C33B1481)
GITFSNY

SEQ ID NO: 441, HC CHOTHIA CDR2 (C33B1522)
YYSGS

SEQ ID NO: 442, HC CHOTHIA CDR2 (C33B1477)
RSKGNSYA

SEQ ID NO: 443, HC CHOTHIA CDR2 (C33B1475)

KQDGSE

SEQ ID NO: 444, HC CHOTHIA CDR2 (C33B1517)
YSTGN

SEQ ID NO: 445, HC CHOTHIA CDR2 (C33B1516)
FSTGH

SEQ ID NO: 446, HC CHOTHIA CDR2 (C33B1481)
KRDGSD

SEQ ID NO: 447, HC CHOTHIA CDR3 (C33B1522)
MWEILGFD

SEQ ID NO: 448, HC CHOTHIA CDR3 (C33B1477)
HNDKWNYYGLD

SEQ ID NO: 449, HC CHOTHIA CDR3 (C33B1475)
EVGYNWNQGGYFD

SEQ ID NO: 450, HC CHOTHIA CDR3 (C33B1517)
DNGAALFD

SEQ ID NO: 451, HC CHOTHIA CDR3 (C33B1516)
DNGAALFD

SEQ ID NO: 452, HC CHOTHIA CDR3 (C33B1481)
GEFD

SEQ ID NO: 453, LC CHOTHIA CDR1 (C33B1522)
SSSNIGSNP

SEQ ID NO: 454, LC CHOTHIA CDR1 (C33B1477)
SQSLLFSNGYKF

SEQ ID NO: 455, LC CHOTHIA CDR1 (C33B1475)
SQSLLHSDGYNY

SEQ ID NO: 456, LC CHOTHIA CDR1 (C33B1517)
SSSNIGSNI

SEQ ID NO: 457, LC CHOTHIA CDR1 (C33B1516)
SSSNIGSNI

SEQ ID NO: 458, LC CHOTHIA CDR1 (C33B1481)
SQSLVYSDGNTY

SEQ ID NO: 459, LC CHOTHIA CDR2 (C33B1522)
SNN

SEQ ID NO: 460, LC CHOTHIA CDR2 (C33B1477)
LGS

SEQ ID NO: 461, LC CHOTHIA CDR2 (C33B1475)
LGS

SEQ ID NO: 462, LC CHOTHIA CDR2 (C33B1517)
SNN

SEQ ID NO: 463, LC CHOTHIA CDR2 (C33B1516)
SDN

SEQ ID NO: 464, LC CHOTHIA CDR2 (C33B1481)
KVS

SEQ ID NO: 465, LC CHOTHIA CDR3 (C33B1522)
WDDSLNGP

SEQ ID NO: 466, LC CHOTHIA CDR3 (C33B1477)
ALQTPP

SEQ ID NO: 467, LC CHOTHIA CDR3 (C33B1475)
VLQTPW

SEQ ID NO: 468, LC CHOTHIA CDR3 (C33B1517)
WDDSLNGP

SEQ ID NO: 469, LC CHOTHIA CDR3 (C33B1516)
WDDSLNGP

SEQ ID NO: 470, LC CHOTHIA CDR3 (C33B1481)
GTHWPW

SEQ ID NO: 471, HC IMGT CDR1 (C33B1522)
GGSISSYY

SEQ ID NO: 472, HC IMGT CDR1 (C33B1477)
GFTFSVSA

SEQ ID NO: 473, HC IMGT CDR1 (C33B1475)
GFTFSSYW

SEQ ID NO: 474, HC IMGT CDR1 (C33B1517)
GASIRNYY

SEQ ID NO: 475, HC IMGT CDR1 (C33B1516)
GGSIRNYY

SEQ ID NO: 476, HC IMGT CDR1 (C33B1481)
GITFSNYW

SEQ ID NO: 477, HC IMGT CDR2 (C33B1522)
IYYSGST

SEQ ID NO: 478, HC IMGT CDR2 (C33B1477)
IRSKGNSYAT

SEQ ID NO: 479, HC IMGT CDR2 (C33B1475)
IKQDGSER

SEQ ID NO: 480, HC IMGT CDR2 (C33B1517)

IYSTGNI

SEQ ID NO: 481, HC IMGT CDR2 (C33B1516)
IFSTGHI

SEQ ID NO: 482, HC IMGT CDR2 (C33B1481)
IKRDGSDK

SEQ ID NO: 483, HC IMGT CDR3 (C33B1522)
ARMWEILGFDP

SEQ ID NO: 484, HC IMGT CDR3 (C33B1477)
TRHNDKWNYYGLDV

SEQ ID NO: 485, HC IMGT CDR3 (C33B1475)
AREVGYNWNQGGYFDY

SEQ ID NO: 486, HC IMGT CDR3 (C33B1517)
ARDNGAALFDY

SEQ ID NO: 487, HC IMGT CDR3 (C33B1516)
ARDNGAALFDF

SEQ ID NO: 488, HC IMGT CDR3 (C33B1481)
AKGEFDY

SEQ ID NO: 489, LC IMGT CDR1 (C33B1522)
SSNIGSNP

SEQ ID NO: 490, LC IMGT CDR1 (C33B1477)
QSLLFSNGYKF

SEQ ID NO: 491, LC IMGT CDR1 (C33B1475)
QSLLHSDGYNY

SEQ ID NO: 492, LC IMGT CDR1 (C33B1517)
SSNIGSNI

SEQ ID NO: 493, LC IMGT CDR1 (C33B1516)
SSNIGSNI

SEQ ID NO: 494, LC IMGT CDR1 (C33B1481)
QSLVYSDGNTY

SEQ ID NO: 495, LC IMGT CDR2 (C33B1522)
SNN

SEQ ID NO: 496, LC IMGT CDR2 (C33B1477)
LGS

SEQ ID NO: 497, LC IMGT CDR2 (C33B1475)
LGS

SEQ ID NO: 498, LC IMGT CDR2 (C33B1517)
SNN

SEQ ID NO: 499, LC IMGT CDR2 (C33B1516)
SDN

SEQ ID NO: 500, LC IMGT CDR2 (C33B1481)
KVS

SEQ ID NO: 501, LC IMGT CDR3 (C33B1522)
AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 502, LC IMGT CDR3 (C33B1477)
MQALQTPPT

SEQ ID NO: 503, LC IMGT CDR3 (C33B1475)
MQVLQTPWT

SEQ ID NO: 504, LC IMGT CDR3 (C33B1517)
AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 505, LC IMGT CDR3 (C33B1516)

AAWDDSLNGPV

SEQ ID NO: 506, LC IMGT CDR3 (C33B1481)
LQGTHWPWT

SEQ ID NO: 507, HC CONTACT CDR1 (C33B1522)
SSYYWG

SEQ ID NO: 508, HC CONTACT CDR1 (C33B1477)
SVSAIH

SEQ ID NO: 509, HC CONTACT CDR1 (C33B1475)
SSYWMT

SEQ ID NO: 510, HC CONTACT CDR1 (C33B1517)
RNYYWS

SEQ ID NO: 511, HC CONTACT CDR1 (C33B1516)
RNYYWS

SEQ ID NO: 512, HC CONTACT CDR1 (C33B1481)
SNYWMS

SEQ ID NO: 513, HC CONTACT CDR2 (C33B1522)
WIGYIYYSGSTN

SEQ ID NO: 514, HC CONTACT CDR2 (C33B1477)
WIGRIRSKGNSYATA

SEQ ID NO: 515, HC CONTACT CDR2 (C33B1475)
WVANIKQDGSERY

SEQ ID NO: 516, HC CONTACT CDR2 (C33B1517)
WLGHIYSTGNIH

SEQ ID NO: 517, HC CONTACT CDR2 (C33B1516)
WFGHIFSTGHIN

SEQ ID NO: 518, HC CONTACT CDR2 (C33B1481)
WVASIKRDGSDKY

SEQ ID NO: 519, HC CONTACT CDR3 (C33B1522)
ARMWEILGFD

SEQ ID NO: 520, HC CONTACT CDR3 (C33B1477)
TRHNDKWNYYGLD

SEQ ID NO: 521, HC CONTACT CDR3 (C33B1475)
AREVGYNWNQGGYFD

SEQ ID NO: 522, HC CONTACT CDR3 (C33B1517)
ARDNGAALFD

SEQ ID NO: 523, HC CONTACT CDR3 (C33B1516)
ARDNGAALFD

SEQ ID NO: 524, HC CONTACT CDR3 (C33B1481)
AKGEFD

SEQ ID NO: 525, LC CONTACT CDR1 (C33B1522)
IGSNPVNWY

SEQ ID NO: 526, LC CONTACT CDR1 (C33B1477)
LFSNGYKFLDWY

SEQ ID NO: 527, LC CONTACT CDR1 (C33B1475)
LHSDGYNYLDWY

SEQ ID NO: 528, LC CONTACT CDR1 (C33B1517)
IGSNIVNWY

SEQ ID NO: 529, LC CONTACT CDR1 (C33B1516)
IGSNIVNWY

SEQ ID NO: 530, LC CONTACT CDR1 (C33B1481)
VYSDGNTYLNWF

SEQ ID NO: 531, LC CONTACT CDR2 (C33B1522)
LLIYSNNQRP

SEQ ID NO: 532, LC CONTACT CDR2 (C33B1477)
LLIYLGSYRA

SEQ ID NO: 533, LC CONTACT CDR2 (C33B1475)
LLIYLGSYRA

SEQ ID NO: 534, LC CONTACT CDR2 (C33B1517)
LLIYSNNQRP

SEQ ID NO: 535, LC CONTACT CDR2 (C33B1516)
LLLYSDNQRP

SEQ ID NO: 536, LC CONTACT CDR2 (C33B1481)
RLIYKVSTRD

SEQ ID NO: 537, LC CONTACT CDR3 (C33B1522)
AAWDDSLNGP

SEQ ID NO: 538, LC CONTACT CDR3 (C33B1477)
MQALQTPP

SEQ ID NO: 539, LC CONTACT CDR3 (C33B1475)
MQVLQTPW

SEQ ID NO: 540, LC CONTACT CDR3 (C33B1517)
AAWDDSLNGP

SEQ ID NO: 541, LC CONTACT CDR3 (C33B1516)
AAWDDSLNGP

SEQ ID NO: 542, LC CONTACT CDR3 (C33B1481)

LQGTHWPW

Ссылочные материалы

1. www_lls_org/sites/default/files/file_assets/PS32_AML_Booklet_2019_FINAL.pdf
2. D H Wiseman, B F Greystoke & T C P Somervaille, The variety of leukemic stem cells in myeloid malignancy, , Oncogene volume 33, pages3091–3098(2014)
3. American Cancer Society: Cancer Facts and Figures 2014. Atlanta, Ga: American Cancer Society, 2014. Available onlineExit Disclaimer
4. www.uniprot.org/uniprot/P20138
5. Engagement of p75/AIRM1 or CD33 inhibits the proliferation of normal or leukemic myeloid cells, Vitale C., Romagnani C., Falco M., Ponte M., Vitale M., Moretta A., Bacigalupo A., Moretta L., Mingari M.C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:15091-15096(1999)
6. Ehninger A. Et al (2015) Blood Cancer Journal (2014) 4, e218
7. Felix S. Lichtenegger, et al., Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia, J Hematol Oncol. 2017; 10: 142.

* * *

Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Следует отметить, что различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в данном документе станут очевидными специалистам в данной области из вышеуказанного описания и прилагаемых графических материалов. Такие модификации предполагаются как находящиеся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Кроме того, следует учитывать, что все значения являются приблизительными и представлены для описания.

По всей настоящей заявке цитируются патенты, заявки на патенты, публикации, описания продуктов и протоколы, описания которых включены в данный документ посредством ссылки в полном своем объеме для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 вариабельной области тяжелой цепи (VH) под SEQ ID NO: 53;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263; или

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264.

2. Выделенный белок по п. 1, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

b) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

c) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

d) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

e) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или

f) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

3. Выделенный белок, который связывает CD33, где выделенный белок содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3 под

a) SEQ ID NO: 29, 37 и 46 соответственно;

b) SEQ ID NO: 32, 40 и 49 соответственно;

c) SEQ ID NO: 34, 43 и 51 соответственно;

d) SEQ ID NO: 253, 256 и 259 соответственно;

e) SEQ ID NO: 254, 257 и 260 соответственно; или

f) SEQ ID NO: 255, 258 и 261 соответственно.

4. Выделенный белок по п. 1 или п. 2, где выделенный белок содержит

a) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 53 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 82;

b) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 56 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 85;

c) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 59 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 87;

d) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 262 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 271;

e) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 263 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 272; или

f) HCDR1, HCDR2 и HCDR3 VH под SEQ ID NO: 264 и LCDR1, LCDR2 и LCDR3 VL под SEQ ID NO: 273.

5. Выделенный белок по п. 3 или п. 4, содержащий HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 под

a) SEQ ID NO: 29, 37, 46, 63, 70 и 76 соответственно;
b) SEQ ID NO: 32, 40, 49, 66, 70 и 76 соответственно;
c) SEQ ID NO: 34, 43, 51, 68, 74 и 80 соответственно;
d) SEQ ID NO: 253, 256, 259, 265, 74 и 269 соответственно;
e) SEQ ID NO: 254, 257, 260, 66, 267 и 76 соответственно; или
f) SEQ ID NO: 255, 258, 261, 266, 268 и 270 соответственно.

6. Выделенный белок по любому из пп. 1-5, где выделенный белок содержит VH под SEQ ID NO: 53, 56, 59, 262, 263, 264, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, или 382 и VL под SEQ ID NO: 82, 85, 87, 271, 272, 273, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397 или 398.

7. Выделенный белок по п. 6, где выделенный белок содержит

a) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 82;
b) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 85;
c) VH под SEQ ID NO: 59 и VL под SEQ ID NO: 87;
d) VH под SEQ ID NO: 262 и VL под SEQ ID NO: 271;
e) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 272;

f) VH под SEQ ID NO: 264 и VL под SEQ ID NO: 273;
g) VH под SEQ ID NO: 291 и VL под SEQ ID NO: 271;
h) VH под SEQ ID NO: 292 и VL под SEQ ID NO: 271;
i) VH под SEQ ID NO: 293 и VL под SEQ ID NO: 271;
j) VH под SEQ ID NO: 294 и VL под SEQ ID NO: 271;
k) VH под SEQ ID NO: 295 и VL под SEQ ID NO: 271;
l) VH под SEQ ID NO: 296 и VL под SEQ ID NO: 271;
m) VH под SEQ ID NO: 297 и VL под SEQ ID NO: 271;
n) VH под SEQ ID NO: 298 и VL под SEQ ID NO: 271;
o) VH под SEQ ID NO: 299 и VL под SEQ ID NO: 271;
p) VH под SEQ ID NO: 300 и VL под SEQ ID NO: 271;
q) VH под SEQ ID NO: 301 и VL под SEQ ID NO: 271;
r) VH под SEQ ID NO: 302 и VL под SEQ ID NO: 271;
s) VH под SEQ ID NO: 303 и VL под SEQ ID NO: 271;
t) VH под SEQ ID NO: 304 и VL под SEQ ID NO: 271;
u) VH под SEQ ID NO: 305 и VL под SEQ ID NO: 271;
v) VH под SEQ ID NO: 306 и VL под SEQ ID NO: 271;
w) VH под SEQ ID NO: 307 и VL под SEQ ID NO: 271;
x) VH под SEQ ID NO: 308 и VL под SEQ ID NO: 271;
y) VH под SEQ ID NO: 309 и VL под SEQ ID NO: 271;
z) VH под SEQ ID NO: 310 и VL под SEQ ID NO: 271;
aa) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 311;
ab) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 312;
ac) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 313;
ad) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 314;
ae) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 315;
af) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 316;
ag) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 317;
ah) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 318;
ai) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 319;
aj) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 320;
ak) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 321;
al) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 322;
am) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 323;

an) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 324;
ao) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 325;
ap) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 326;
aq) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 327;
ar) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 328;
as) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 329;
at) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 330;
au) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 331;
av) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 332;
aw)VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 333;
ax) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 334;
ay) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 335;
az) VH под SEQ ID NO: 263 и VL под SEQ ID NO: 336;
ba) VH под SEQ ID NO: 337 и VL под SEQ ID NO: 272;
bb) VH под SEQ ID NO: 338 и VL под SEQ ID NO: 272;
bc) VH под SEQ ID NO: 339 и VL под SEQ ID NO: 272;
bd) VH под SEQ ID NO: 340 и VL под SEQ ID NO: 272;
be) VH под SEQ ID NO: 341 и VL под SEQ ID NO: 272;
bf) VH под SEQ ID NO: 342 и VL под SEQ ID NO: 272;
bg) VH под SEQ ID NO: 343 и VL под SEQ ID NO: 272;
bh) VH под SEQ ID NO: 344 и VL под SEQ ID NO: 272;
bi) VH под SEQ ID NO: 345 и VL под SEQ ID NO: 272;
bj) VH под SEQ ID NO: 346 и VL под SEQ ID NO: 272;
bk) VH под SEQ ID NO: 347 и VL под SEQ ID NO: 272;
bl) VH под SEQ ID NO: 348 и VL под SEQ ID NO: 272;
bm) VH под SEQ ID NO: 349 и VL под SEQ ID NO: 272;
bn) VH под SEQ ID NO: 350 и VL под SEQ ID NO: 272;
bo) VH под SEQ ID NO: 351 и VL под SEQ ID NO: 272;
bp) VH под SEQ ID NO: 352 и VL под SEQ ID NO: 272;
bq) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 353;
br) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 354;
bs) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 355;
bt) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 356;
bu) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 357;

bv) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 358;

bw) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 359;

bx) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 360;

by) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 361;

bz) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 362;

ca) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 363;

cb) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 364;

cc) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 365;

cd) VH под SEQ ID NO: 56 и VL под SEQ ID NO: 366;

ce) VH под SEQ ID NO: 367 и VL под SEQ ID NO: 85;

cf) VH под SEQ ID NO: 368 и VL под SEQ ID NO: 85;

cg) VH под SEQ ID NO: 369 и VL под SEQ ID NO: 85;

ch) VH под SEQ ID NO: 370 и VL под SEQ ID NO: 85;

ci) VH под SEQ ID NO: 371 и VL под SEQ ID NO: 85;

cj) VH под SEQ ID NO: 372 и VL под SEQ ID NO: 85;

ck) VH под SEQ ID NO: 373 и VL под SEQ ID NO: 85;

cl) VH под SEQ ID NO: 374 и VL под SEQ ID NO: 85;

cm) VH под SEQ ID NO: 375 и VL под SEQ ID NO: 85;

cn) VH под SEQ ID NO: 376 и VL под SEQ ID NO: 85;

co) VH под SEQ ID NO: 377 и VL под SEQ ID NO: 85;

cp) VH под SEQ ID NO: 378 и VL под SEQ ID NO: 85;

cq) VH под SEQ ID NO: 379 и VL под SEQ ID NO: 85;

cr) VH под SEQ ID NO: 380 и VL под SEQ ID NO: 85;

cs) VH под SEQ ID NO: 381 и VL под SEQ ID NO: 85;

ct) VH под SEQ ID NO: 382 и VL под SEQ ID NO: 85;

cu) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 383;

cv) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 384;

cw)VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 385;

cx) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 386;

cy) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 387;

cz) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 388;

da) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 389;

db) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 390;

dc) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 391;

dd) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 392;
de) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 393;
df) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 394;
dg) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 395;
dh) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 396;
di) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 397 или
dj) VH под SEQ ID NO: 53 и VL под SEQ ID NO: 398.

8. Выделенный белок по любому из пп. 1-7, где выделенный белок представляет собой Fab, scFv, $(scFv)_2$, Fv, $F(ab')_2$, Fd, dAb или VHH.

9. Выделенный белок по п. 8, где scFv содержит от N- до C-конца VH, первый линкер (L1) и VL (VH-L1-VL) или VL, L1 и VH (VL-L1-VH).

10. Выделенный белок по п. 9, где L1 содержит
a) аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140;
b) приблизительно 5-50 аминокислот; приблизительно 5-40 аминокислот; приблизительно 10-30 аминокислот или приблизительно 10-20 аминокислот.

11. Выделенный белок по п. 10, где выделенный белок представляет собой scFv, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 213, 216, 219, 274, 275 или 276.

12. Выделенный белок по любому из пп. 1-11, где белок конъюгирован с удлиняющим или модулирующим период полужизни фрагментом, выбранным из иммуноглобулина (Ig); фрагмента Ig; константной области Ig; фрагмента константной области Ig; Fc-области; фрагмента константной области Ig, содержащего Fc-область; фрагмента константной области Ig, содержащего домен CH2; фрагмента константной области Ig, содержащего домен CH3; фрагмента константной области Ig, содержащего домен CH2 и домен CH3; фрагмента константной области Ig, содержащего по меньшей мере часть шарнира, домена CH2 и домена CH3; фрагмента константной области Ig, содержащего шарнир, домен

CH2 и домен CH3; трансферрина; альбумина; альбуминсвязывающего домена или полиэтиленгликоля.

13. Выделенный белок по п. 12, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, где

a) указанный антигенсвязывающий домен конъюгирован с N-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig;

b) указанный антигенсвязывающий домен конъюгирован с C-концом константной области Ig или фрагмента константной области Ig; или

c) указанный антигенсвязывающий домен конъюгирован с константной областью Ig или фрагментом константной области Ig через второй линкер (L2), содержащий аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

14. Выделенный белок по любому из пп. 1-13, где выделенный белок представляет собой моноспецифический белок, мультиспецифический белок, биспецифический белок или триспецифический белок.

15. Выделенный белок по п. 14, где каждый из мультиспецифического белка, биспецифического белка или триспецифического белка независимо содержит антигенсвязывающий домен, который связывает антиген на лимфоците, Т-клетке, $CD8^+$ Т-клетке или естественной киллерной (NK) клетке.

16. Выделенный белок по п. 15, где каждый из мультиспецифического белка, биспецифического белка или триспецифического белка независимо содержит антигенсвязывающий домен, который связывает TRGV9, CD3 эпсилон (CD3ε), CD3, CD8, KI2L4, NKG2E, NKG2D, NKG2F, BTNL3, CD186, BTNL8, PD-1, CD195 или NKG2C.

17. Выделенный белок по любому из пп. 15-16, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержат Fab, scFv, VHH, (scFv)2, Fv, F(ab')2, Fd или dAb; или где первый антигенсвязывающий домен, который

связывает CD33, содержит scFv, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, содержит VHH.

18. Выделенный белок по любому из пп. 12-17, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, при этом необязательно константная область Ig или фрагмент константной области Ig относятся к IgG1.

19. Выделенный белок по п. 18, где фрагмент константной области Ig имеет последовательность под SEQ ID NO: 277 или 278.

20. Выделенный белок по любому из пп. 12-19, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к снижению степени связывания белка с Fcγ-рецептором (FcγR); при этом по меньшей мере одна мутация, которая приводит к снижению степени связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из F234A/L235A, L234A/L235A, L234A/L235A/D265S, V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S, F234A/L235A, S228P/F234A/L235A, N297A, V234A/G237A, K214T/E233P/L234V/L235A/делеции G236/A327G/P331A/D365E/L358M, H268Q/V309L/A330S/P331S, S267E/L328F, L234F/L235E/D265A, L234A/L235A/G237A/P238S/H268A/A330S/P331S, S228P/F234A/L235A/G237A/P238S и S228P/F234A/L235A/делеции G236/G237A/P238S, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

21. Выделенный белок по любому из пп. 12-19, где константная область Ig или фрагмент константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR; при этом по меньшей мере одна мутация, которая приводит к усилению связывания белка с FcγR, выбрана из группы, состоящей из S239D/I332E, S298A/E333A/K334A, F243L/R292P/Y300L, F243L/R292P/Y300L/P396L, F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L и G236A/S239D/I332E, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

22. Выделенный белок по п. 20 или п. 21, где FcγR представляет собой FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIII или любую их комбинацию.

23. Выделенный белок по любому из пп. 12-22, где константная область Ig фрагмента константной области Ig содержит по меньшей мере одну мутацию, которая модулирует период полужизни белка, выбранную из группы, состоящей из H435A, P257I/N434H, D376V/N434H, M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F, T308P/N434A и H435R, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

24. Выделенный белок по любому из пп. 12-23, где белок содержит по меньшей мере одну мутацию в домене CH3 константной области Ig, выбранную из группы, состоящей из T350V, L351Y, F405A, Y407V, T366Y, T366W, F405W, T394W, T394S, Y407T, Y407A, T366S/L368A/Y407V, L351Y/F405A/Y407V, T366I/K392M/T394W, F405A/Y407V, T366L/K392M/T394W, L351Y/Y407A, T366A/K409F, L351Y/Y407A, T366V/K409F, T366A/K409F, T350V/L351Y/F405A/Y407V и T350V/T366L/K392L/T394W, при этом нумерация остатков соответствует индексу EU.

25. Выделенный мультиспецифический белок, биспецифический белок или триспецифический белок, каждый независимо, по любому из пп. 14-24, где первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, конъюгирован с первой константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом первой константной области Ig, и/или второй антигенсвязывающий домен, который связывает антиген лимфоцита, конъюгирован со второй константной областью иммуноглобулина (Ig) или фрагментом второй константной области Ig.

26. Выделенный мультиспецифический белок, биспецифический белок или триспецифический белок, каждый независимо, по п. 25, дополнительно содержащий второй линкер (L2) между первым антигенсвязывающим доменом, который связывает CD33, и первой константной областью Ig или фрагментом первой константной области Ig, и вторым антигенсвязывающим доменом, который связывает антиген лимфоцита, и второй константной областью Ig или фрагментом второй константной области Ig.

27. Выделенный мультиспецифический белок, биспецифический белок или триспецифический белок, каждый независимо, по п. 26, где L2 содержит

аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, или 140.

28. Выделенный биспецифический белок по любому из пп. 25-27, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig относятся к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

29. Выделенный биспецифический белок по любому из пп. 25-28, где первая константная область Ig или фрагмент первой константной области Ig и вторая константная область Ig или фрагмент второй константной области Ig содержат следующие мутации:

L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W во второй константной области Ig; или

L235A_L235A_D265S_T350V_T366L_K392L_T394W в первой константной области Ig и L235A_L235A_D265S_T350V_L351Y_F405A_Y407V во второй константной области Ig.

30. Химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий

a) внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, по любому из пп. 1-11;

b) трансмембранный домен и

c) домен внутриклеточной передачи сигнала, необязательно содержащий по меньшей мере один костимуляторный домен.

31. CAR по п. 30, где CAR дополнительно содержит CD8a-шарнирную область.

32. CAR по п. 30 или п. 31, где

a) трансмембранный домен содержит полипептид трансмембранной области CD8a (CD8a-TM); и

b) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, содержащий компонент представителя 9 суперсемейства рецепторов TNF

(CD137), компонент дзета-цепи CD3 поверхностного гликопротеина Т-клетки (CD3z), компонент кластера дифференцировки (CD27), компонент представителя суперсемейства кластеров дифференцировки и их комбинацию.

33. CAR по любому из пп. 30-32, где

a) CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 157;

b) трансмембранный домен содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 162; и/или

c) домен внутриклеточной передачи сигнала содержит костимуляторный домен, имеющий компонент CD137, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 163; компонент CD3z, содержащий аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности под SEQ ID NO: 164; или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 165.

34. CAR по любому из пп. 30-33, где внеклеточный домен, содержащий антигенсвязывающий домен, который связывает CD33, дополнительно содержит сигнальный полипептид.

35. CAR по п. 34, где сигнальный полипептид содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 166.

36. CAR по любому из пп. 30-35, где полипептид CD8a-TM содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 162.

37. CAR по любому из пп. 30-36, где CD8a-шарнирная область содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 157.

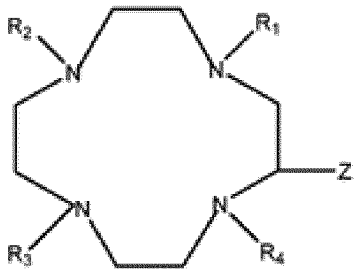
38. Выделенный лимфоцит, экспрессирующий CAR по любому из пп. 30-37.

39. Выделенный лимфоцит по п. 38, где лимфоцит представляет собой Т-лимфоцит или естественную киллерную (NK) клетку.

40. Иммуноконъюгат, содержащий выделенный белок по любому из пп. 1-29 или CAR по любому из пп. 30-37, конъюгированный с терапевтическим средством, визуализирующим средством или радиоактивным средством.

41. Иммуноконъюгат по п. 40, где радиоактивное средство содержит ион радиометалла, выбранный из ^{225}Ac, ^{111}In, ^{89}Zr, ^{32}P, ^{47}Sc, ^{67}Cu, ^{77}As, ^{89}Sr, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{105}Rh, ^{109}Pd, ^{111}Ag, ^{131}I, ^{153}Sm, ^{159}Gd, ^{165}Dy, ^{166}Ho, ^{169}Er, ^{177}Lu, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{194}Ir, ^{198}Au, ^{199}Au, ^{211}At, ^{212}Pb, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{223}Ra, ^{255}Fm, ^{227}Th, ^{62}Cu, ^{64}Cu, ^{67}Ga, ^{68}Ga или ^{86}Y.

42. Иммуноконъюгат по п. 41, где ион радиометалла конъюгирован с хелатирующим фрагментом, (а) при этом хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (I):



формула (I),

где каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил; и

Z представляет собой $(CH2)_nY$, при этом

n равняется 1-10, и

Y представляет собой электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, Z представляет собой водород; и

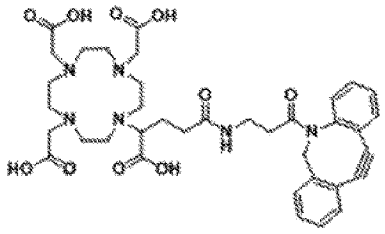
каждый из R_1, R_2, R_3 и R_4 независимо представляет собой $CHQCO_2X$, где

Q независимо представляет собой водород, C_1-C_4алкил или (C_1-C_2алкил)фенил, и

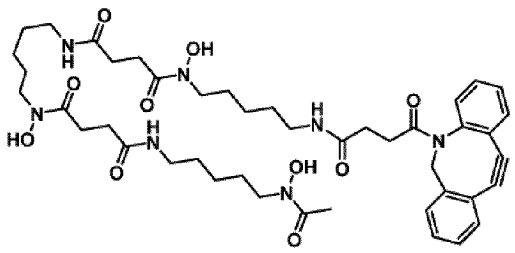
X независимо представляет собой водород, бензил, C_1-C_4алкил или электрофильный или нуклеофильный фрагмент, ковалентно связанный со вторым партнером клик-реакции;

в качестве альтернативы, хелант содержит открытоцепочечный лиганд; или

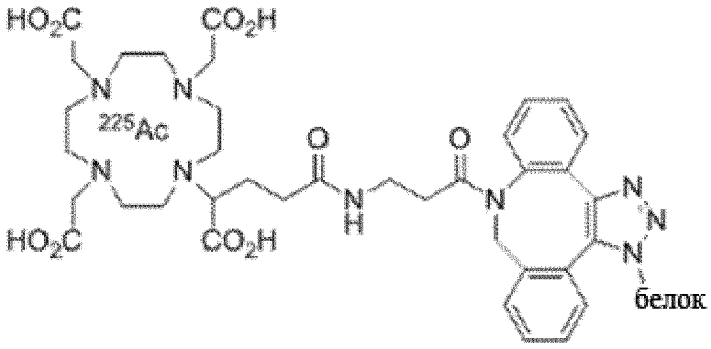
(b) где хелатирующий фрагмент содержит макроцикл, имеющий структуру формулы (II):



или структуру формулы (III):



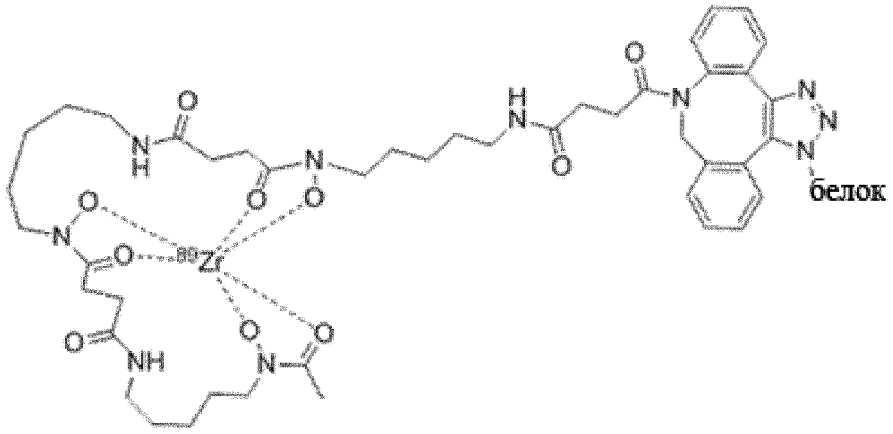
43. Иммуноконъюгат формулы (IV),



формула (IV),

где белок представляет собой выделенный белок по любому из пп. 1-29 или CAR по любому из пп. 30-37.

44. Иммуноконъюгат формулы (V),



формула (V),

где белок представляет собой выделенный белок по любому из пп. 1-29 или CAR по любому из пп. 30-37.

45. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенный белок по любому из пп. 1-29, CAR по любому из пп. 30-37, выделенный лимфоцит по любому из пп. 38-39 или иммуноконъюгат по любому из пп. 40-44 и фармацевтически приемлемый носитель.

46. Полинуклеотид, кодирующий выделенный белок по любому из пп. 1-29, CAR по любому из пп. 30-37 или иммуноконъюгат по любому из пп. 40-44.

47. Вектор, содержащий полинуклеотид по п. 46.

48. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 47 или полинуклеотид по п. 46.

49. Способ получения выделенного белка по любому из пп. 1-29, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 48 в условиях, при которых экспрессируется белок, и извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином.

50. Способ получения иммуноконъюгата по любому из пп. 40-44, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 48 в условиях, при которых экспрессируется белок, извлечение белка, продуцируемого клеткой-хозяином, и конъюгирование белка, продуцируемого клеткой-хозяином, со средством.

51. Антиидиотипическое антитело, связывающееся с выделенным белком по любому из пп. 1-29.

52. Набор, содержащий выделенный белок по любому из пп. 1-29 или CAR по любому из пп. 30-37.

53. Способ лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества выделенного белка по любому из пп. 1-29 или иммуноконъюгата по любому из пп. 40-44 субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

54. Способ лечения субъекта, имеющего рак с экспрессией CD33, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из пп. 38-39 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом лимфоцит опосредует уничтожение рака с экспрессией CD33 у субъекта.

55. Способ по любому из пп. 53-54, где рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак.

56. Способ по п. 55, где гематологический рак представляет собой лейкоз, лимфому, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную B-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

57. Способ по любому из пп. 53-56, где выделенный белок или иммуноконъюгат вводят в комбинации со вторым терапевтическим средством.

58. Способ по п. 57, где второе терапевтическое средство представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, андрогендепривационную терапию или облучение или любую их комбинацию.

59. Выделенный белок по любому из пп. 1-29 или иммуноконъюгат по любому из пп. 40-44 для применения в способе лечения рака с экспрессией CD33 у субъекта, включающий введение терапевтически эффективного количества субъекту в течение времени, достаточного для лечения рака с экспрессией CD33.

60. Лимфоцит по любому из пп. 38-39 для применения в способе лечения субъекта, имеющего рак с экспрессией CD33, при этом способ включает введение терапевтически эффективного количества лимфоцита по любому из пп. 38-39 субъекту, нуждающемуся в этом, при этом лимфоцит опосредует уничтожение рака с экспрессией CD33 у субъекта.

61. Выделенный белок, иммуноконъюгат или лимфоцит для применения по п. 59 или п. 60, где рак с экспрессией CD33 представляет собой гематологический рак.

62. Выделенный белок, иммуноконъюгат или лимфоцит для применения по п. 61, где гематологический рак представляет собой лейкоз, лимфому, множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (AML), миелодиспластический синдром (MDS), острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), диффузную В-крупноклеточную лимфому (DLBCL), хронический миелоидный лейкоз (CML) или бластное плазмоцитоидное дендритноклеточное новообразование (DPDCN).

63. Выделенный белок, иммуноконъюгат или лимфоцит для применения по любому из пп. 59-62, где выделенный белок или иммуноконъюгат вводятся в комбинации со вторым терапевтическим средством.

64. Выделенный белок, иммуноконъюгат или лимфоцит для применения по п. 63, где второе терапевтическое средство представляет собой хирургическое вмешательство, химиотерапию, андрогендепривационную терапию или облучение или любую их комбинацию.

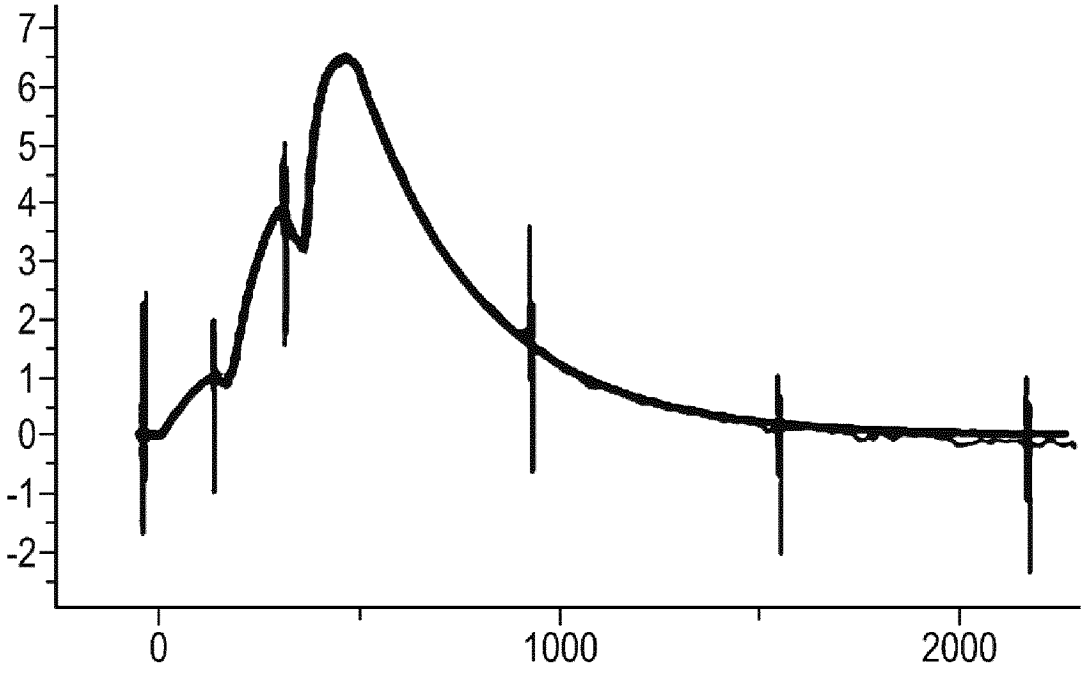
65. Способ выявления присутствия рака у субъекта, включающий

a) приведение клеточного образца, полученного от субъекта, в контакт с CAR по любому из пп. 30-37 с образованием тем самым комплекса CAR-клетка, и

b) выявление комплекса CAR-клетка, где выявление комплекса CAR-клетка указывает на присутствие рака у субъекта.

ФИГ. 1

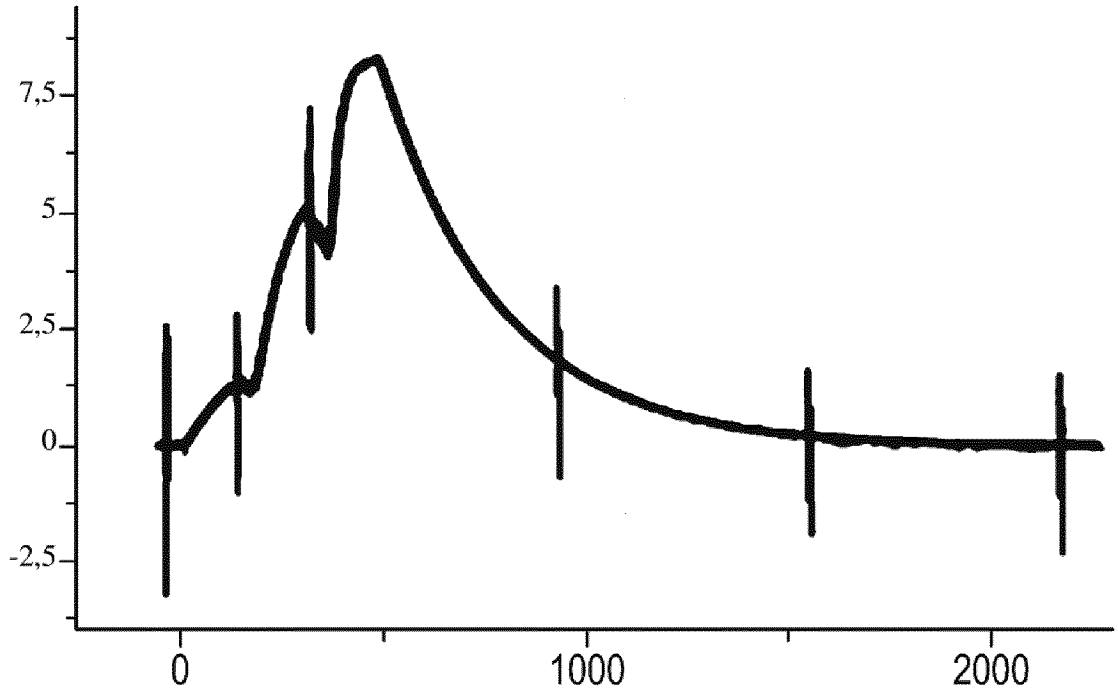
Лиганд	CL002405648
Аналит	Домен для CD33-hu
Сенсограмма	Ch 1, Fc 2-1
Температура	25



Модель	Группа 1 Связывание 1:1		
ka{1/мкс}	9,62e+05	kd{1/c}	3,25e+03
Rmax{RU}	7,1	KD{M}	3,38e-09

ФИГ. 1 (прод.)

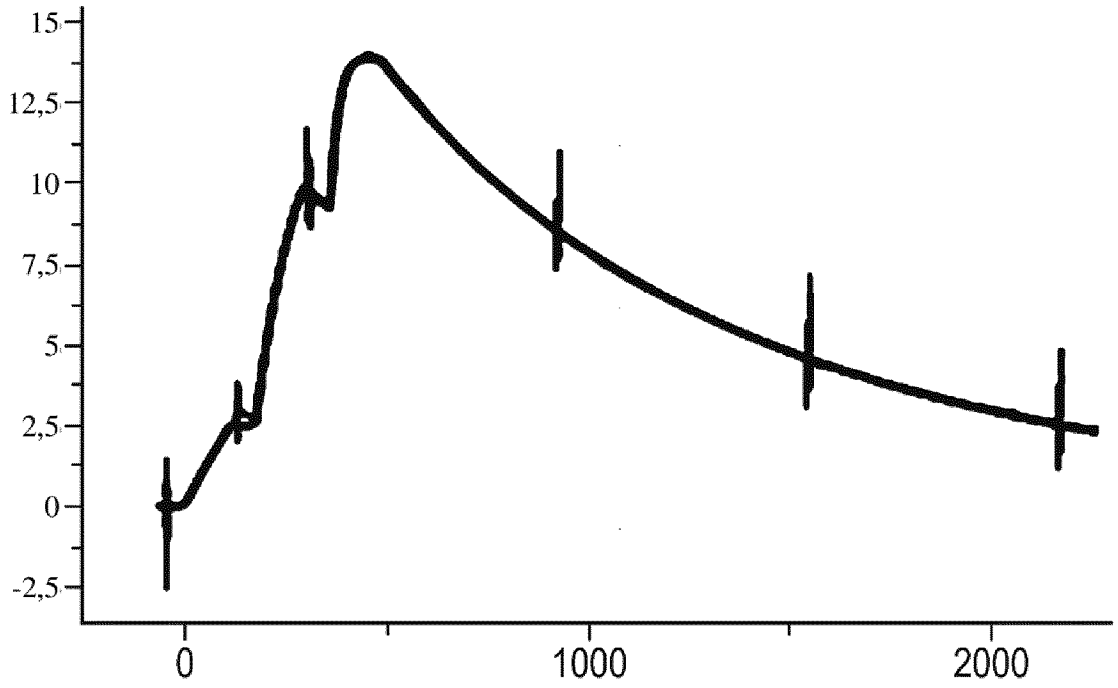
Лиганд	CL002405784
Аналит	Домен для CD33-hu
Сенсограмма	Ch 6, Fc 2-1
Температура	25



Модель	Группа 6 Связывание 1:1		
ka{1/мкс}	1,03e+06	kd{1/c}	3,40e-03
Rmax{RU}	9,0	KD{M}	3,31e-09

ФИГ. 1 (прод.)

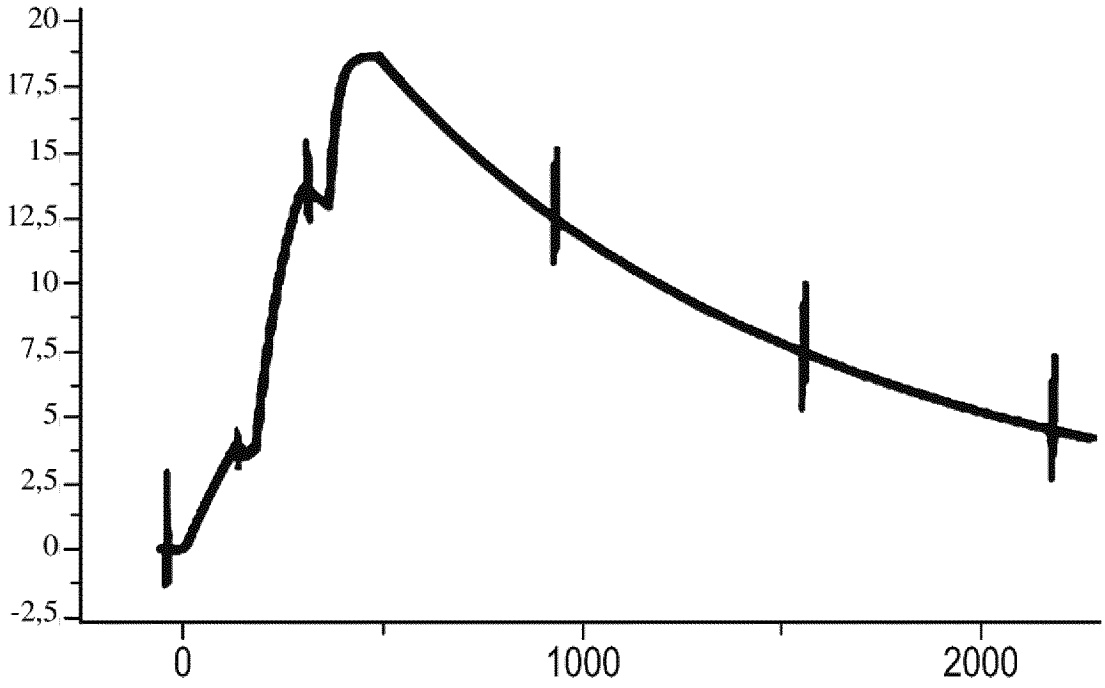
Лиганд	CL002405648
Аналит	CD33-hu-FL
Сенсограмма	Ch 1, Fc 2-1
Температура	25



Модель	Группа 9 Связывание 1:1		
ka{1/мкс}	1,38e+06	kd{1/c}	1,17e-03
Rmax{RU}	14,2	KD{M}	8,47e-10

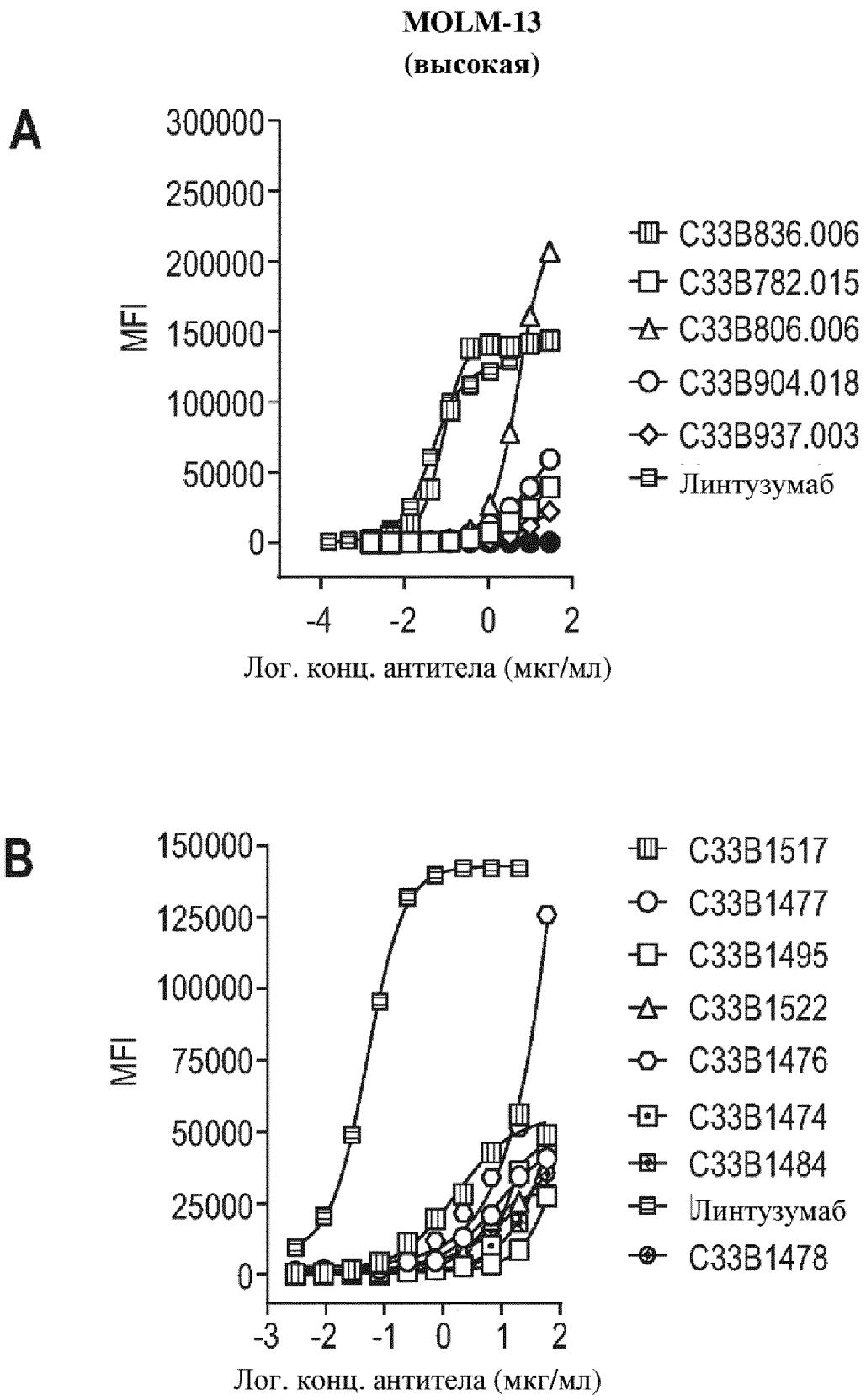
ФИГ. 1 (прод.)

Лиганд	CL002405784
Аналит	CD33-hu-FL
Сенсограмма	Ch 6, Fc 2-1
Температура	25



Модель	Группа 19 Связывание 1:1		
ka{1/мкс}	1,40e+06	kd{1/c}	9,28e-04
Rmax{RU}	18,9	KD{M}	6,61e-10

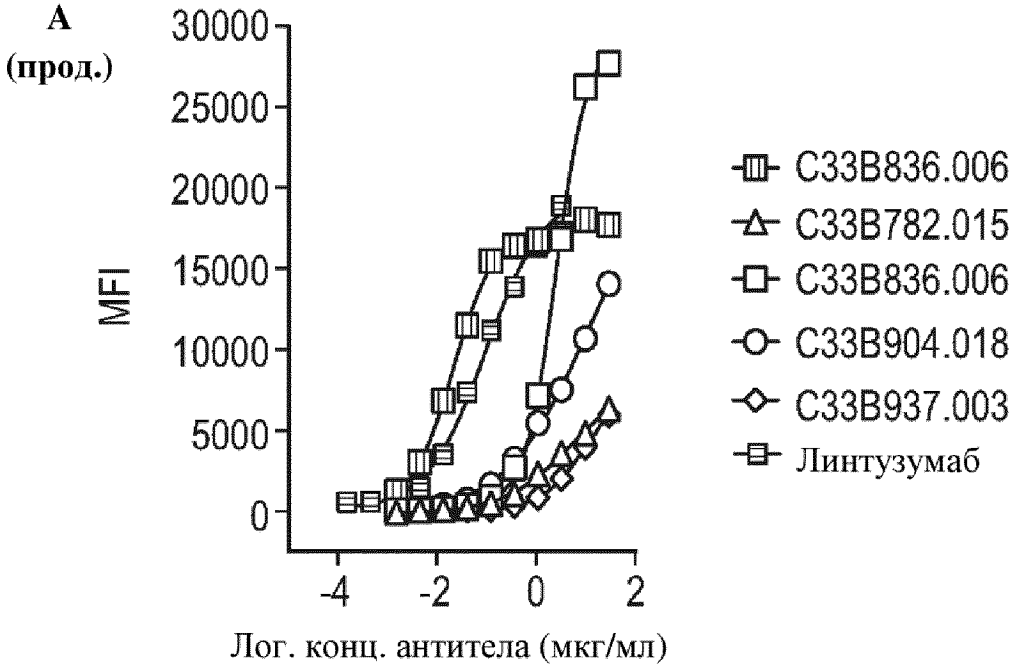
ФИГ. 2


MOLM-13
(высокая)
A
MFI
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
-4
-2
0
2
Лог. конц. антитела (мкг/мл)
C33B836.006
C33B782.015
C33B806.006
C33B904.018
C33B937.003
Линтузумаб
B
MFI
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-3
-2
-1
0
1
2
Лог. конц. антитела (мкг/мл)
C33B1517
C33B1477
C33B1495
C33B1522
C33B1476
C33B1474
C33B1484
Линтузумаб
C33B1478

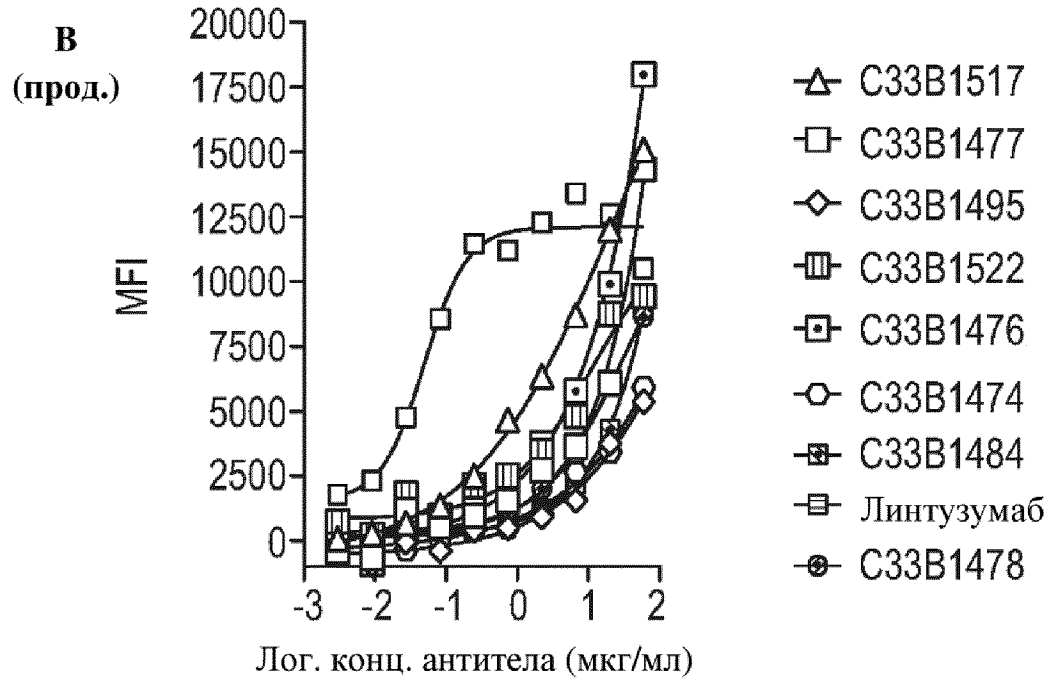
ФИГ. 2 (прод.)

Kasumi-1
(средняя)

A
(прод.)



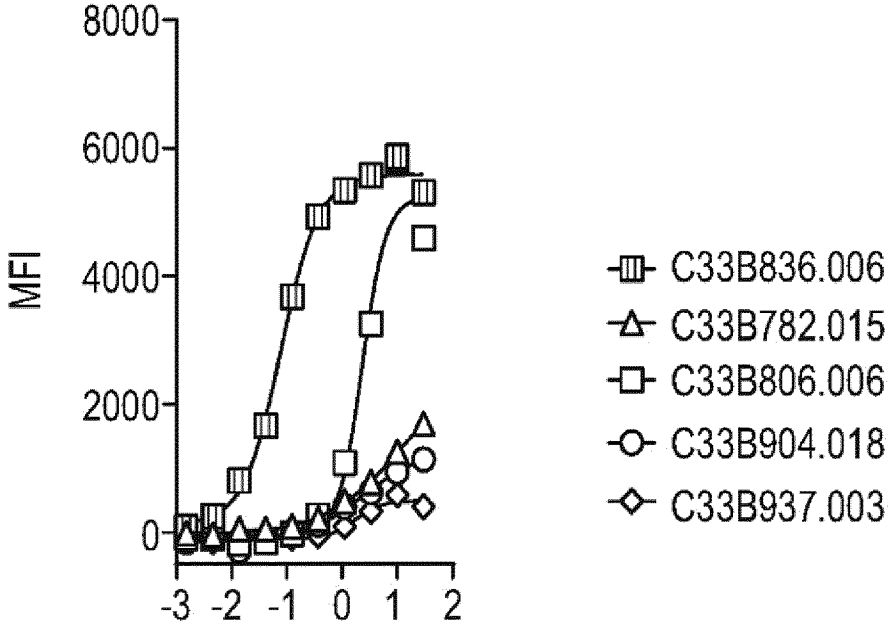
B
(прод.)



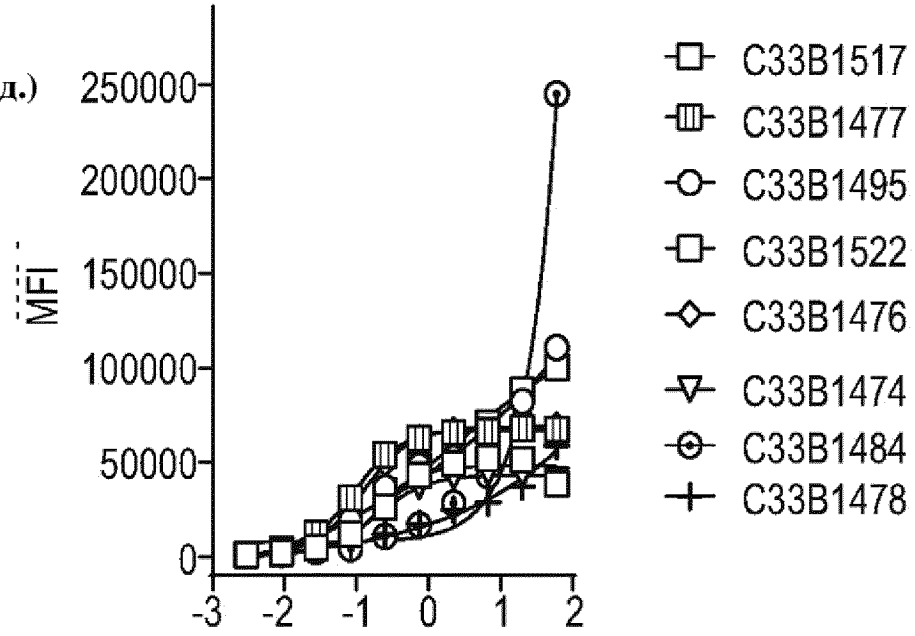
ФИГ. 2 (прод.)

OCI-AML-3
(низкая)

A
(прод.)

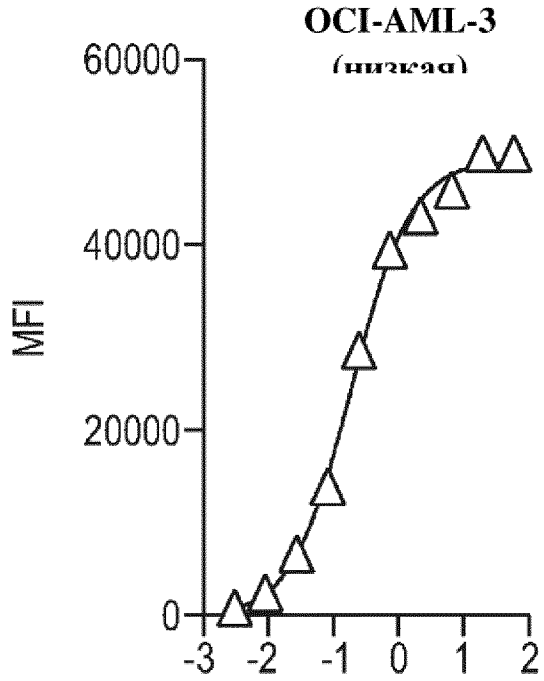


B
(прод.)

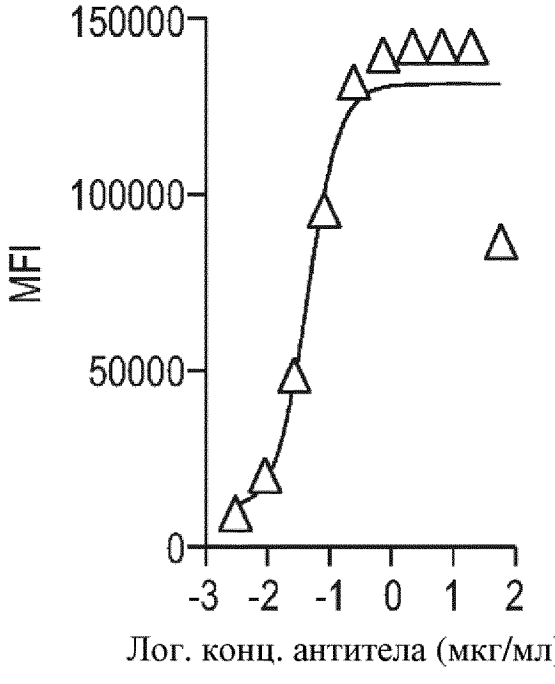


ФИГ. 2 (прод.)

A
(прод.)

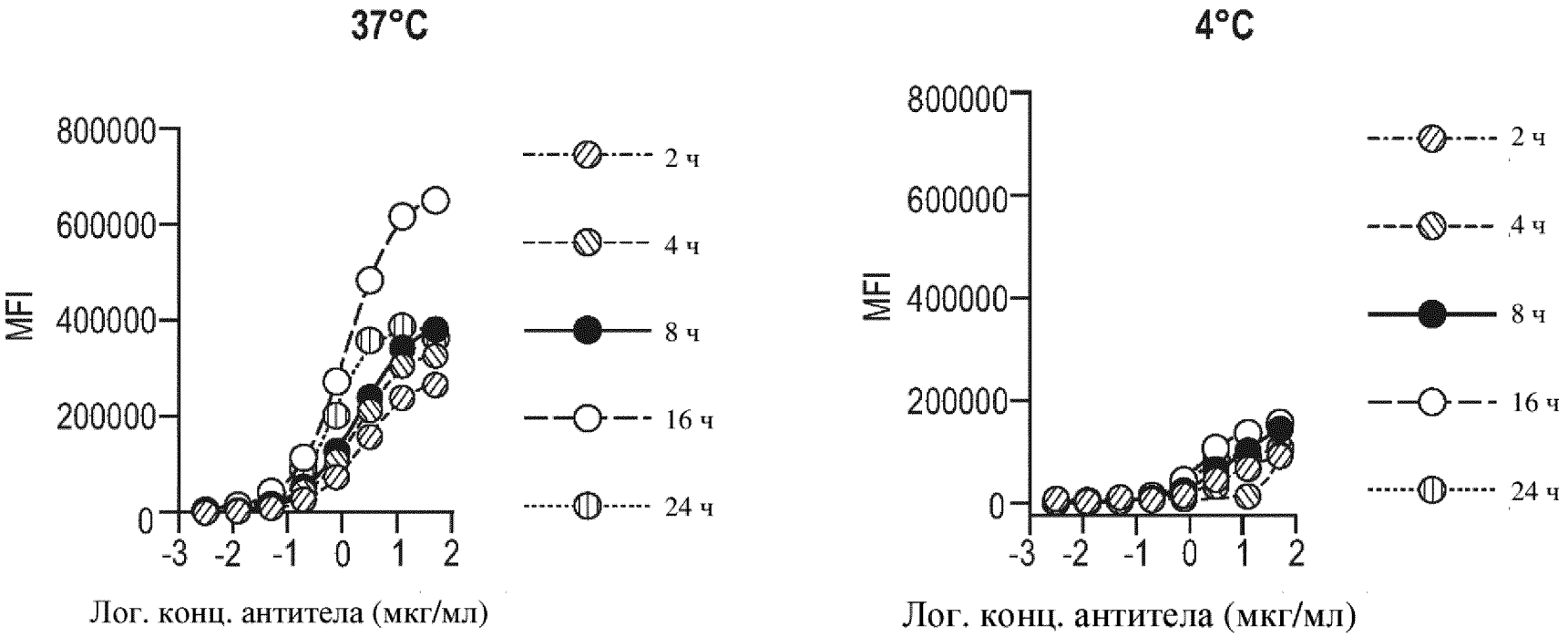


B
(прод.)



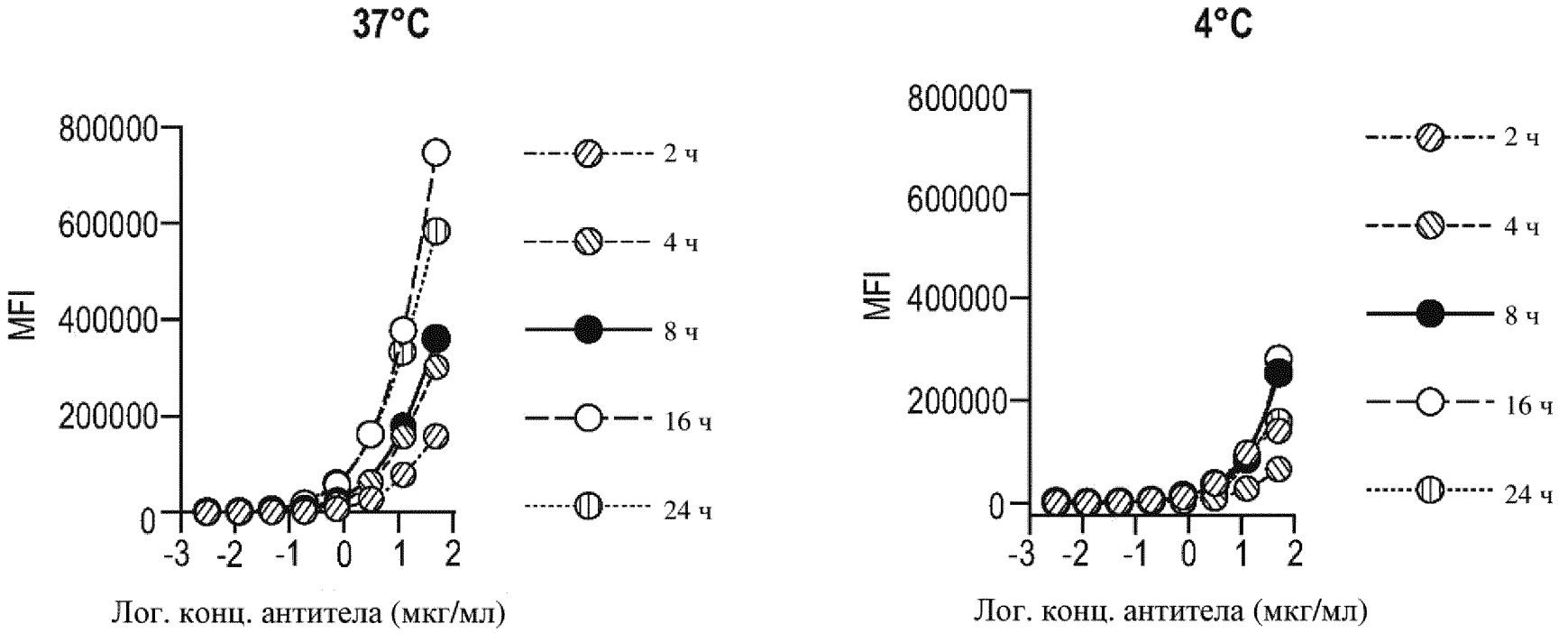
ФИГ. 3

C33B806.006



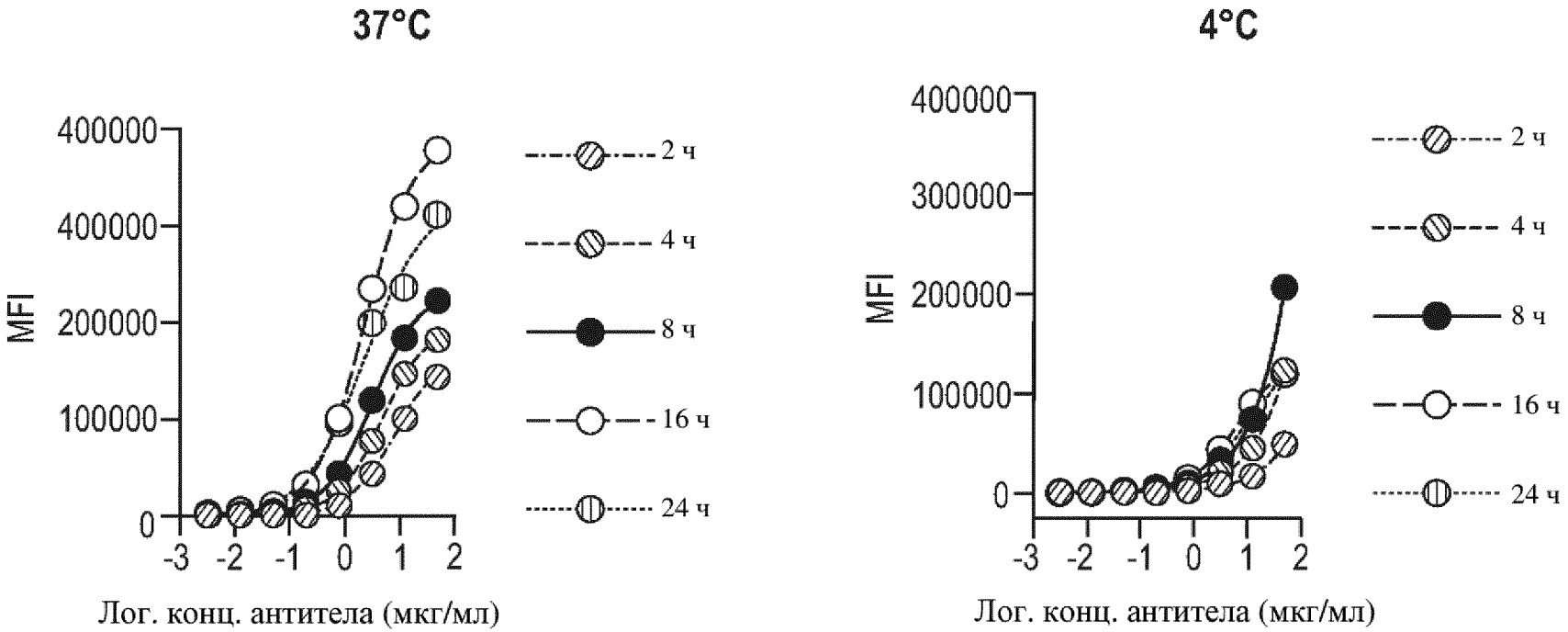
ФИГ. 3 (прод.)

C33B782.015



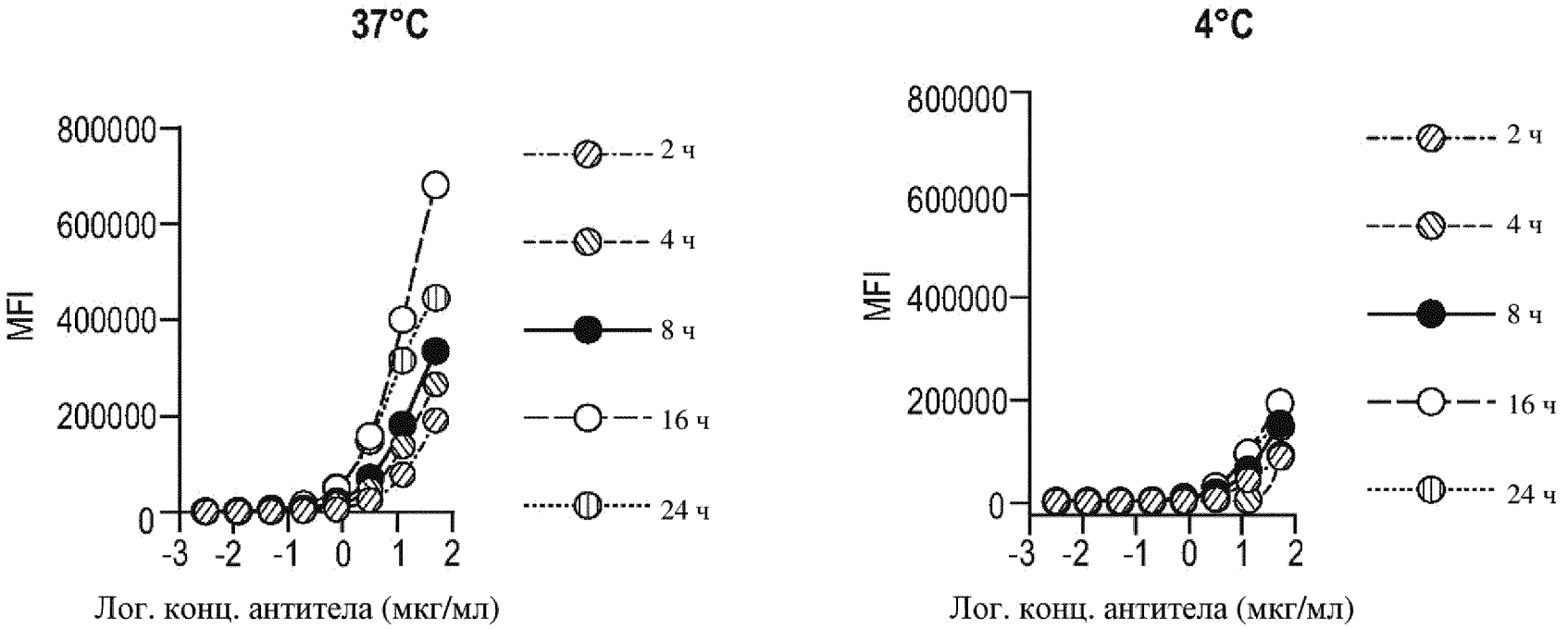
ФИГ. 3 (прод.)

C33B904.01



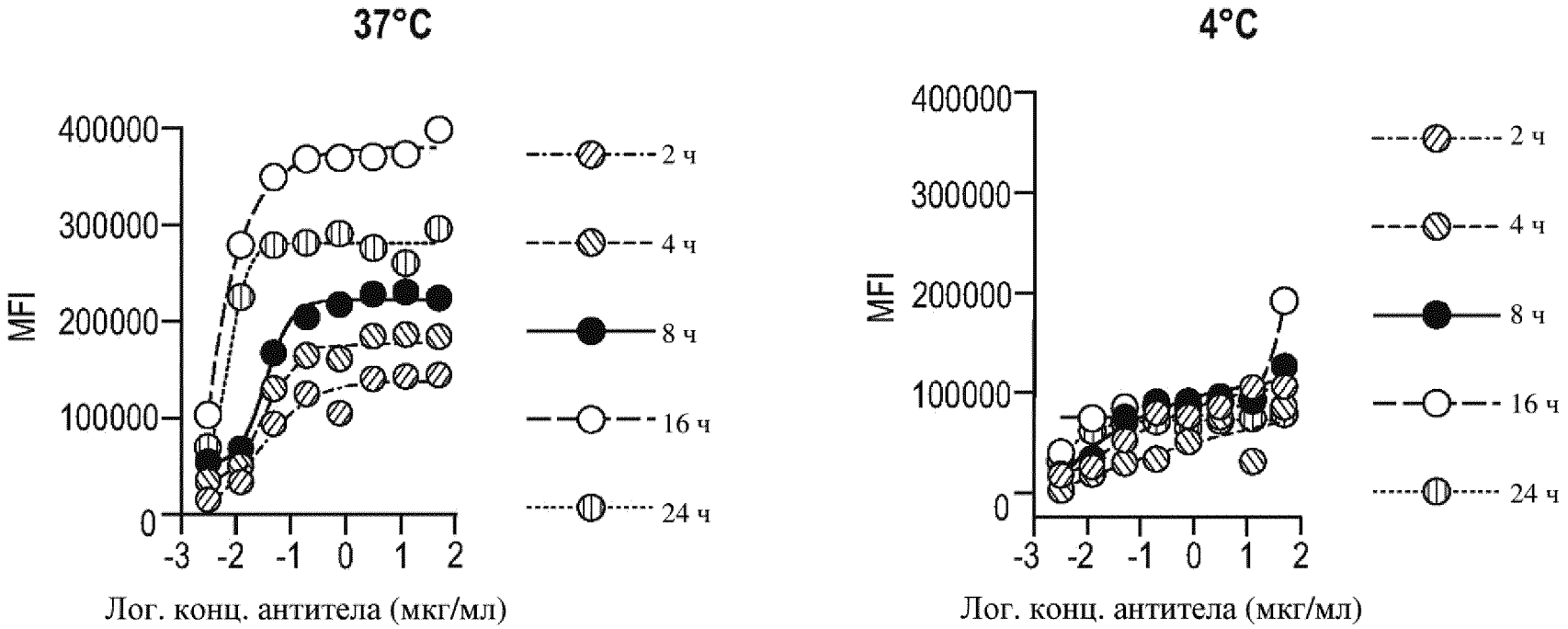
ФИГ. 3 (прод.)

C33B937.003



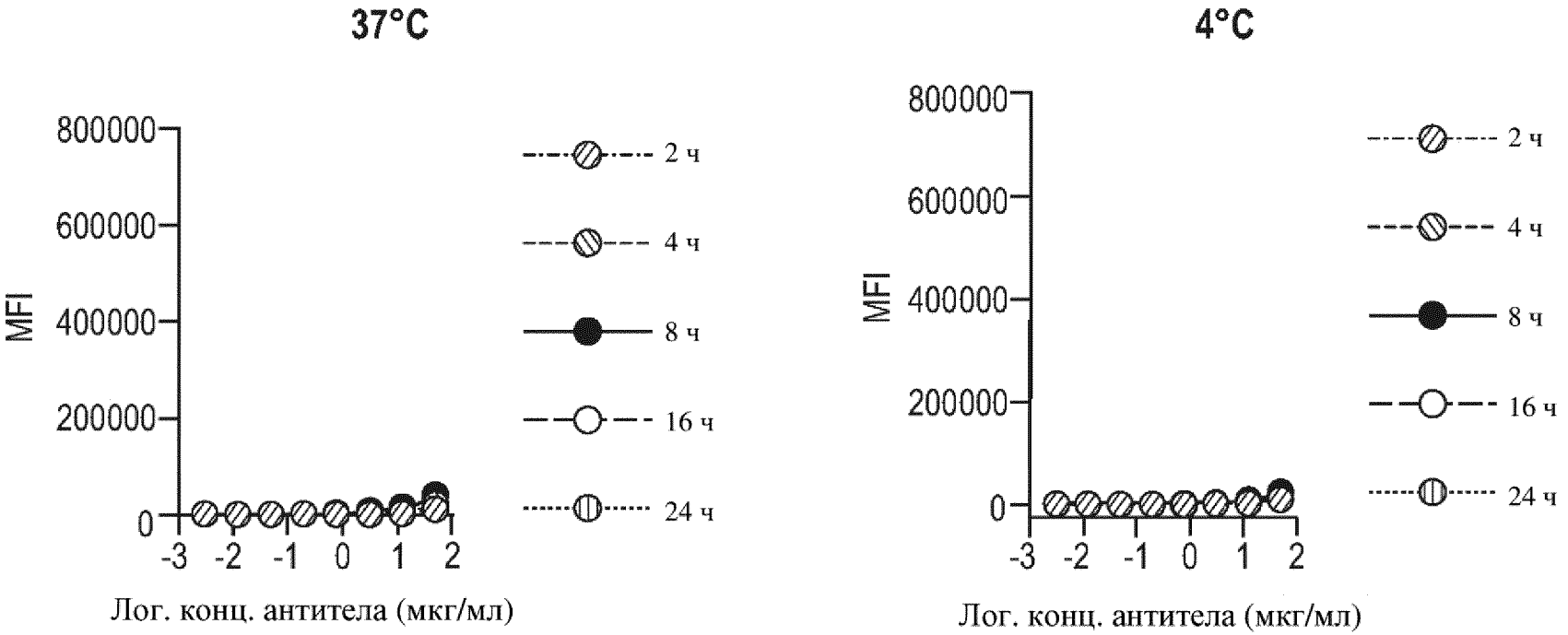
ФИГ. 3 (прод.)

C33B836.006



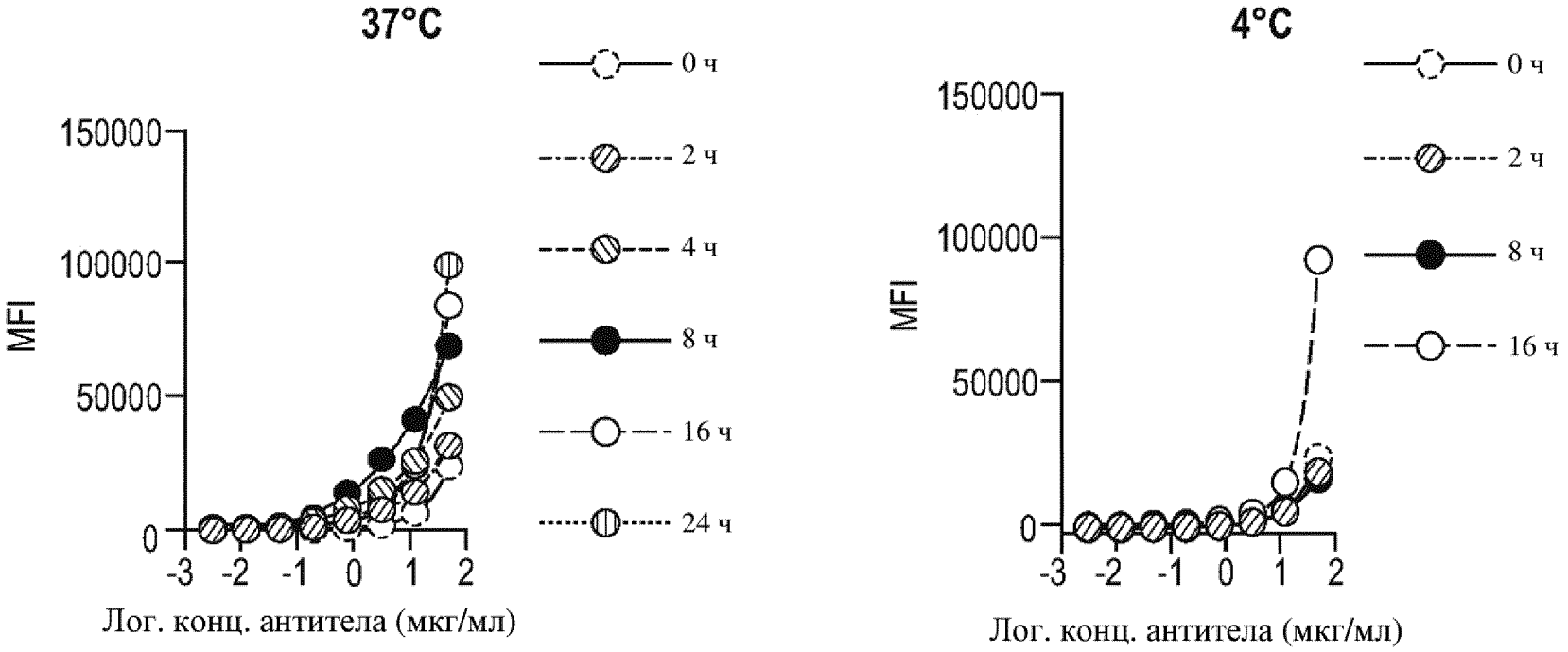
ФИГ. 3 (прод.)

изотип



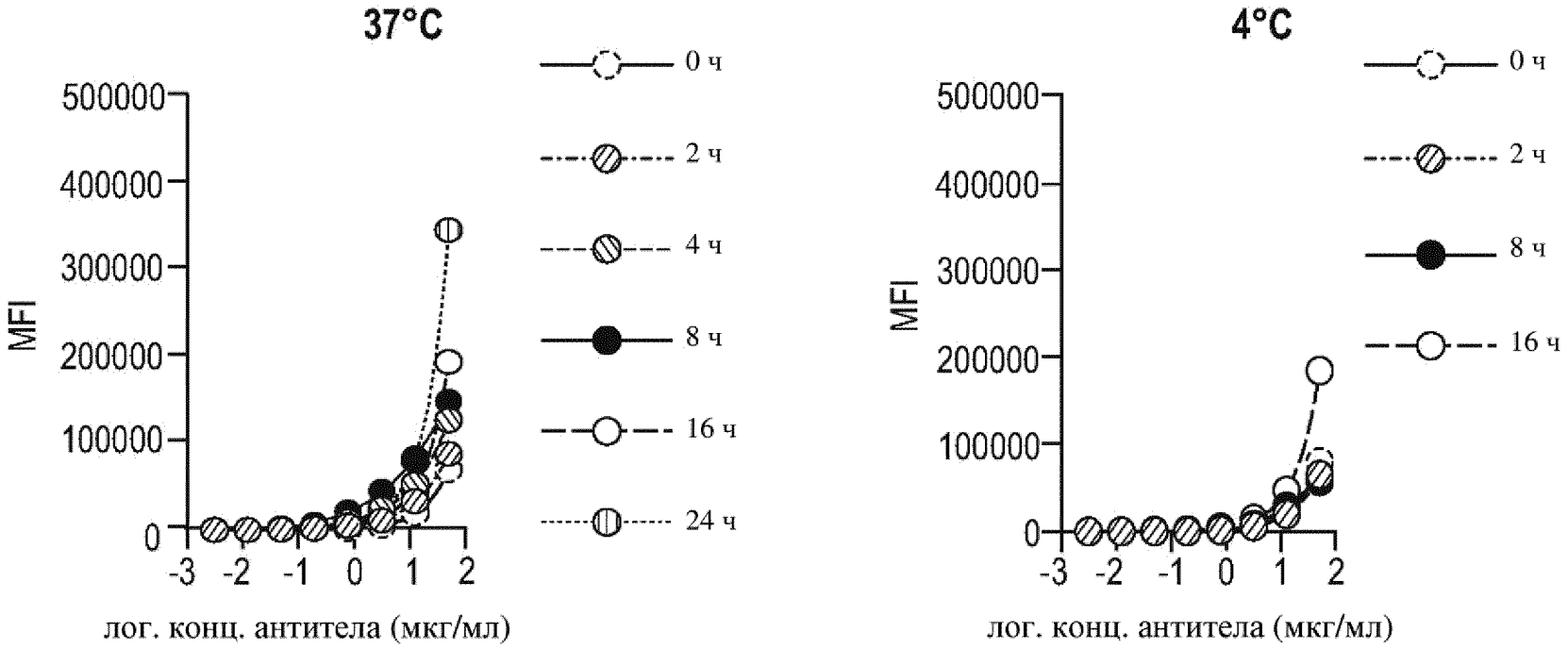
ФИГ. 3 (прод.)

sCD33B1474



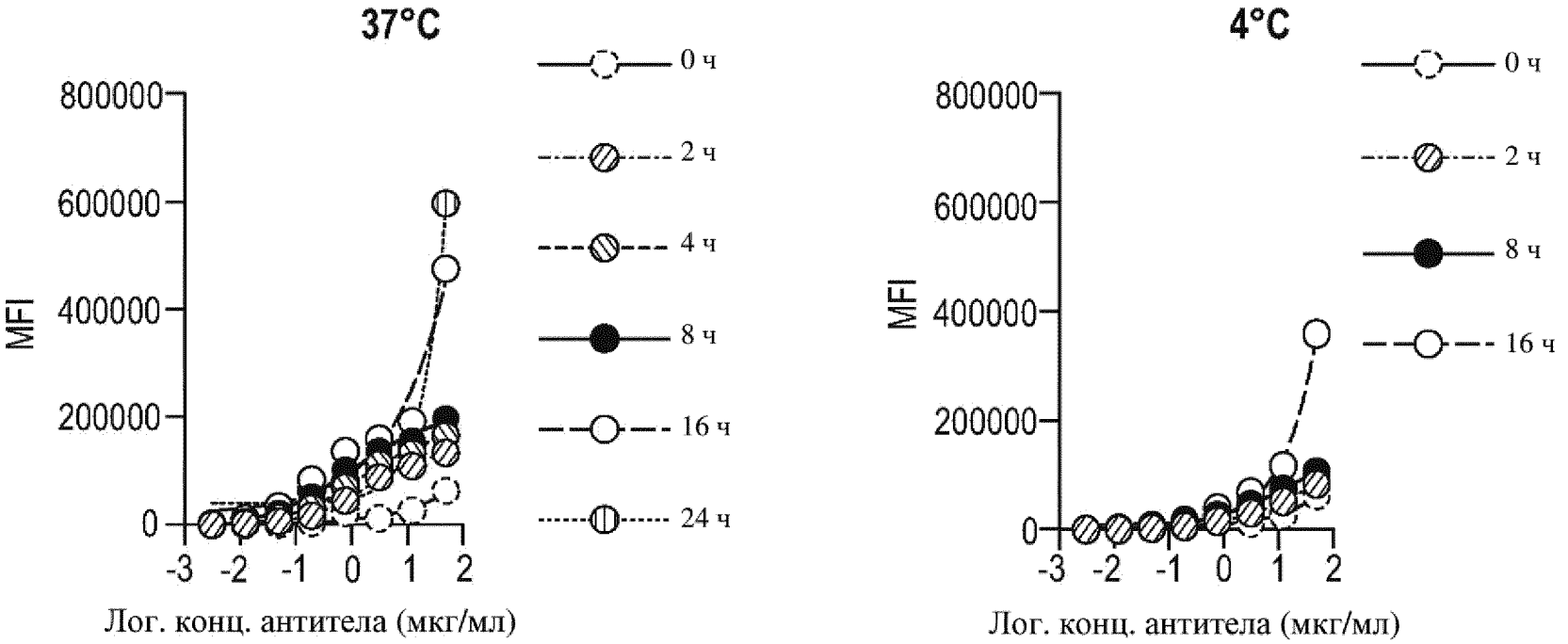
ФИГ. 3 (прод.)

sCD33B1478



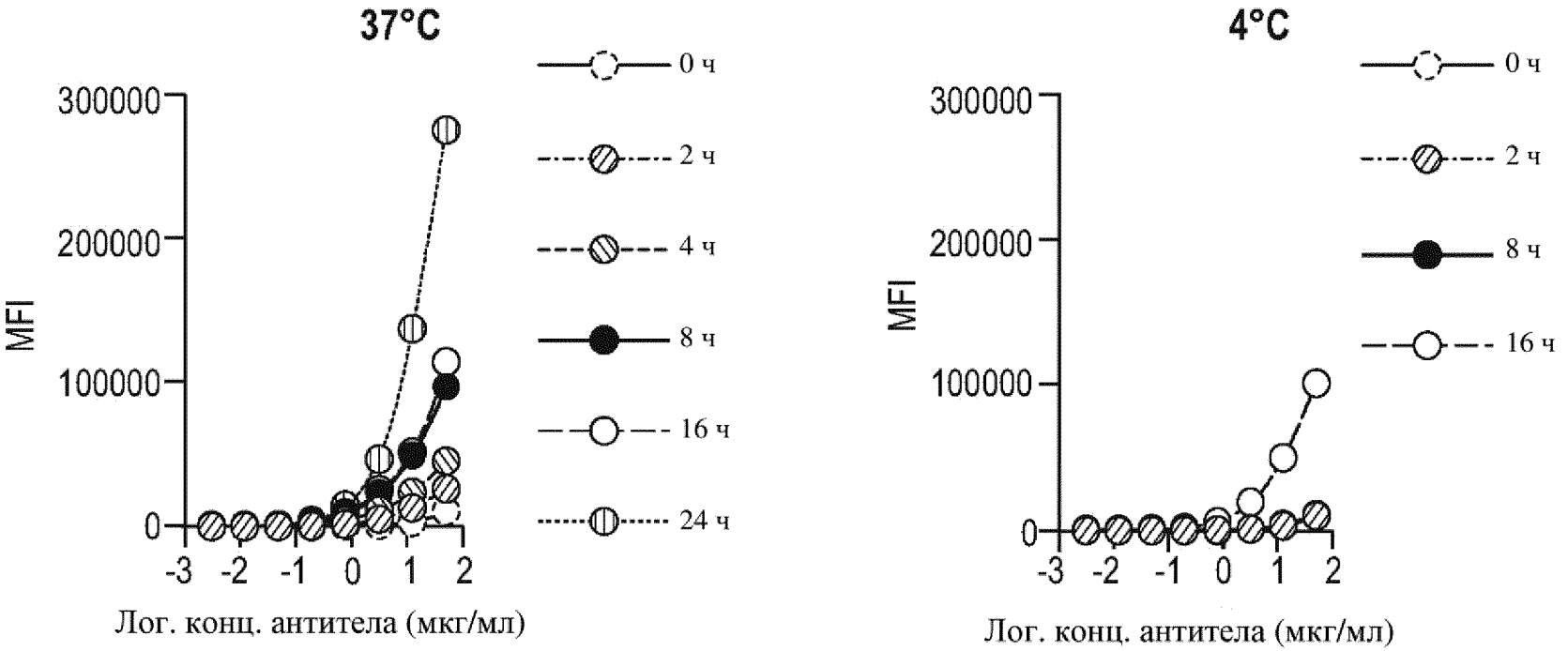
ФИГ. 3 (прод.)

sCD33B1517



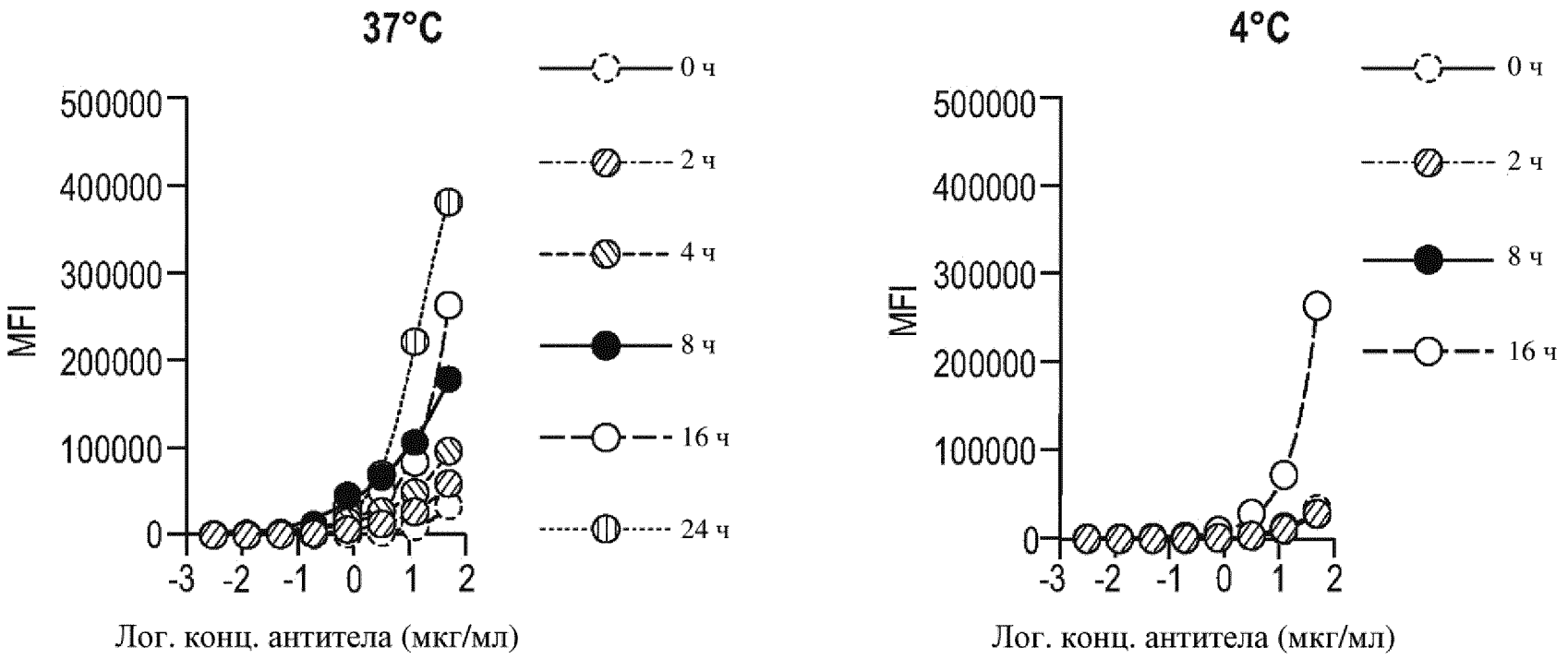
ФИГ. 3 (прод.)

sCD33B1476



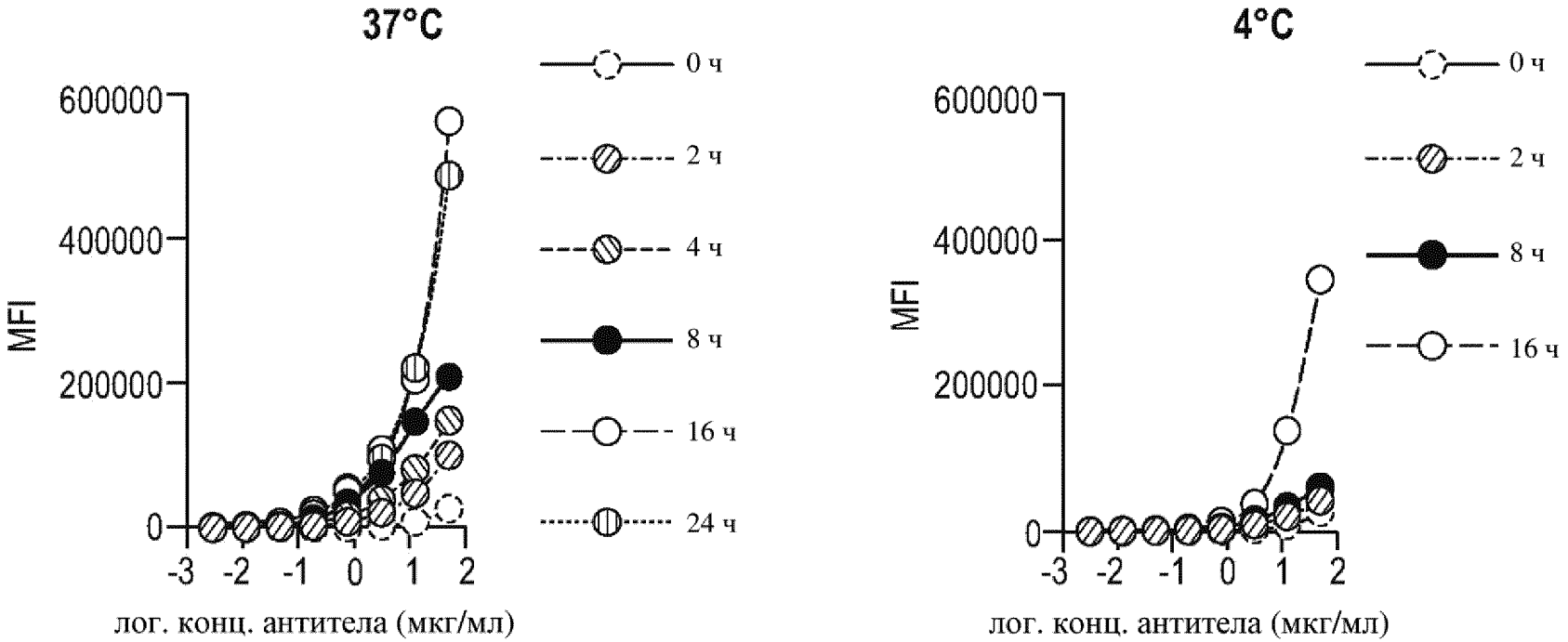
ФИГ. 3 (прод.)

sCD33B1484



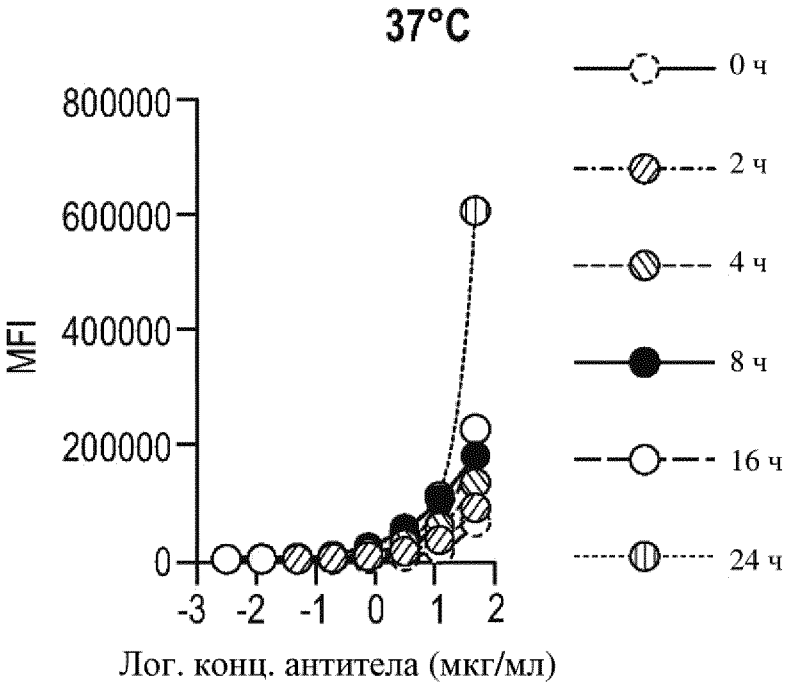
ФИГ. 3 (прод.)

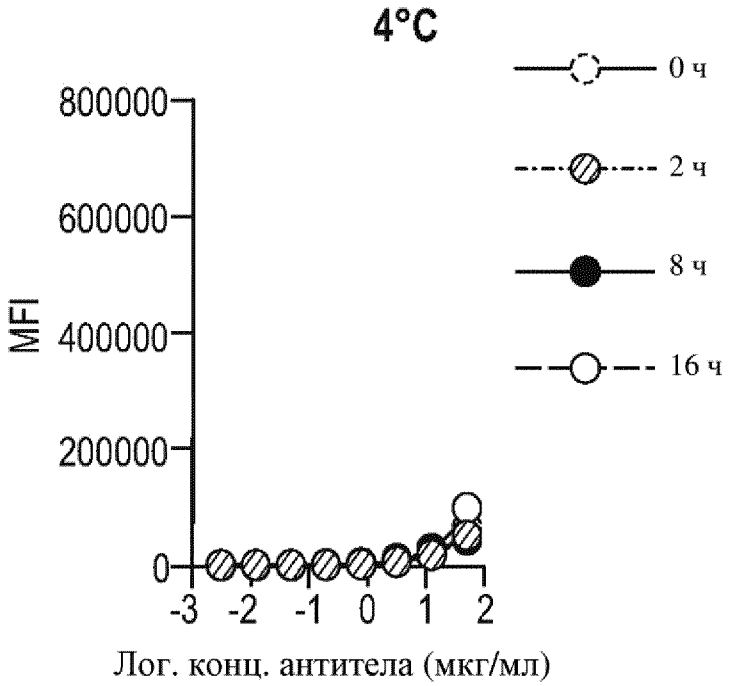
sCD33B1522



ФИГ. 3 (прод.)

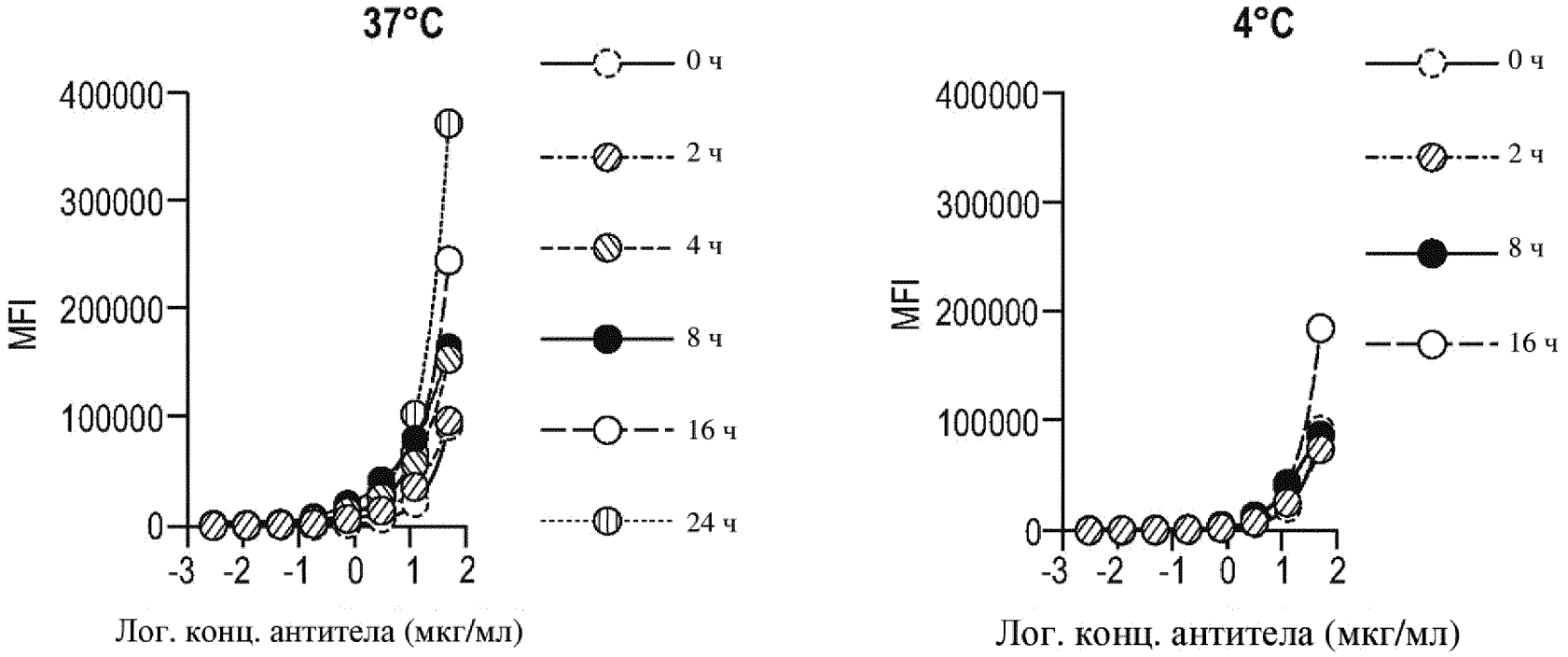
sCD33B1477



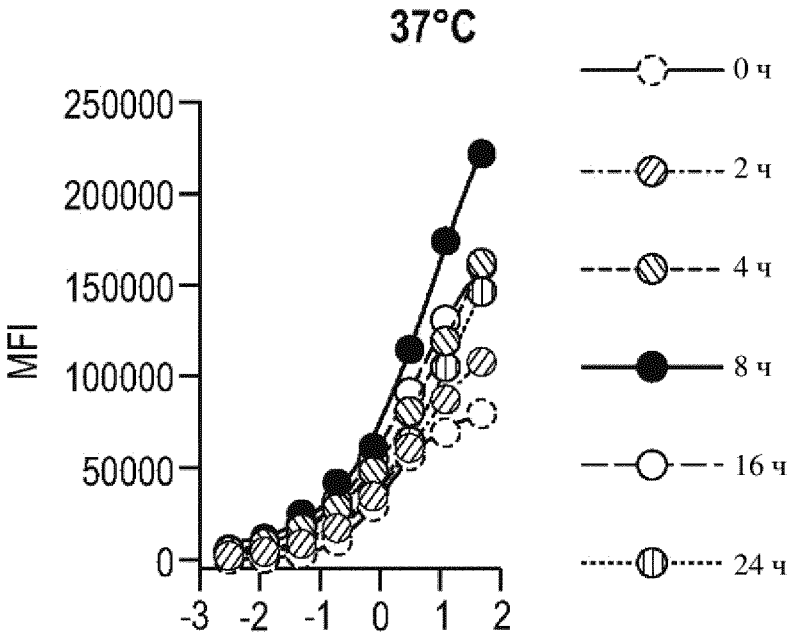


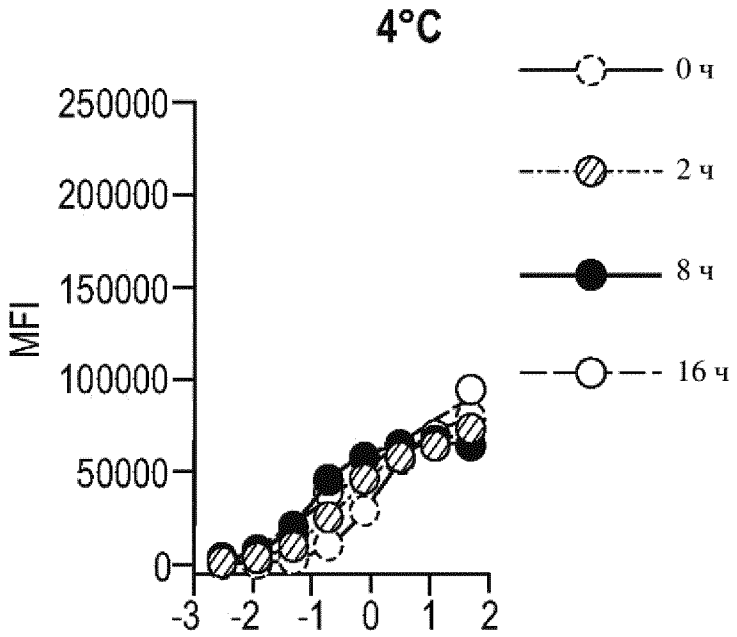
ФИГ. 3 (прод.)

sCD33B1495



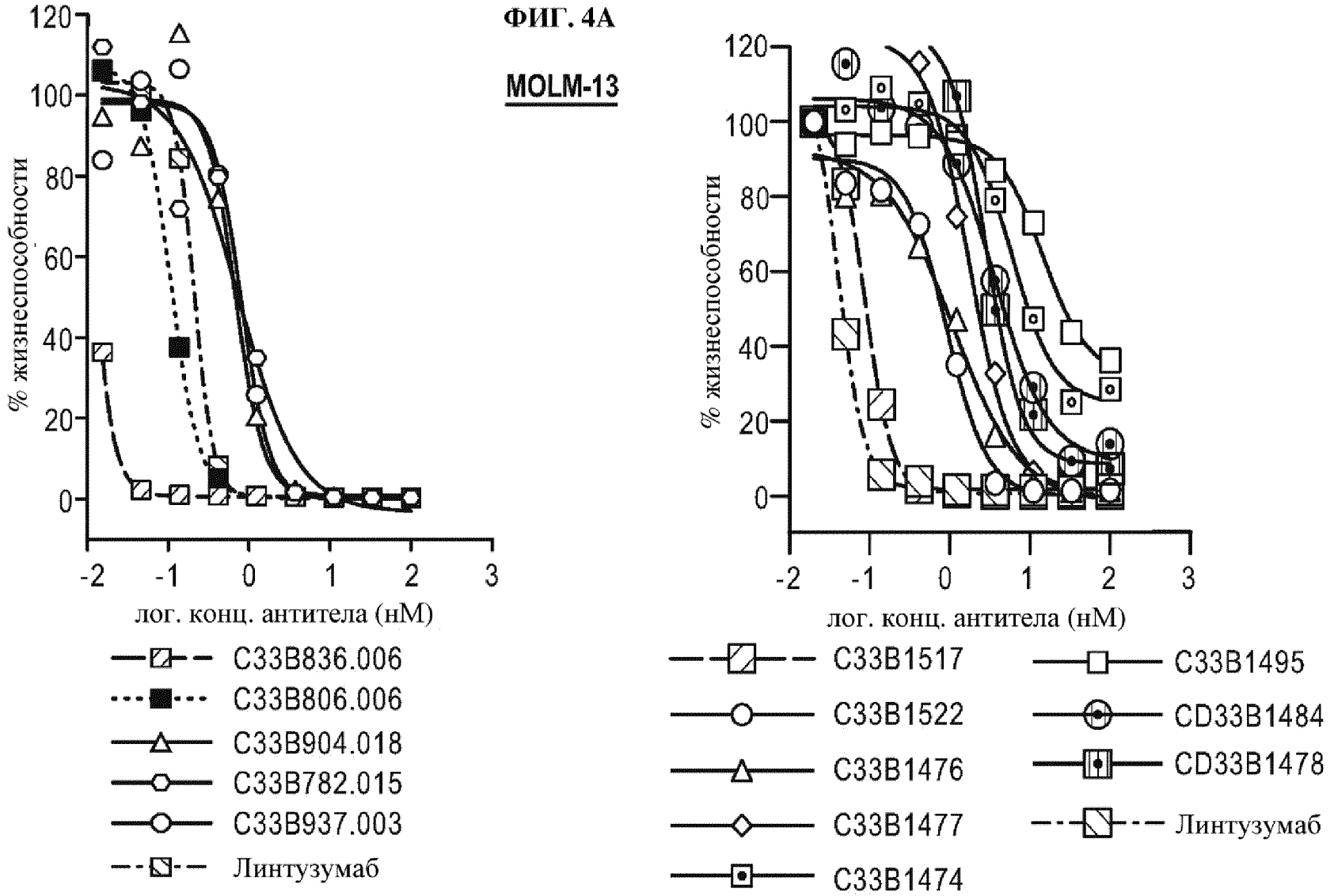
ФИГ. 3 (прод.)
Линтузумаб



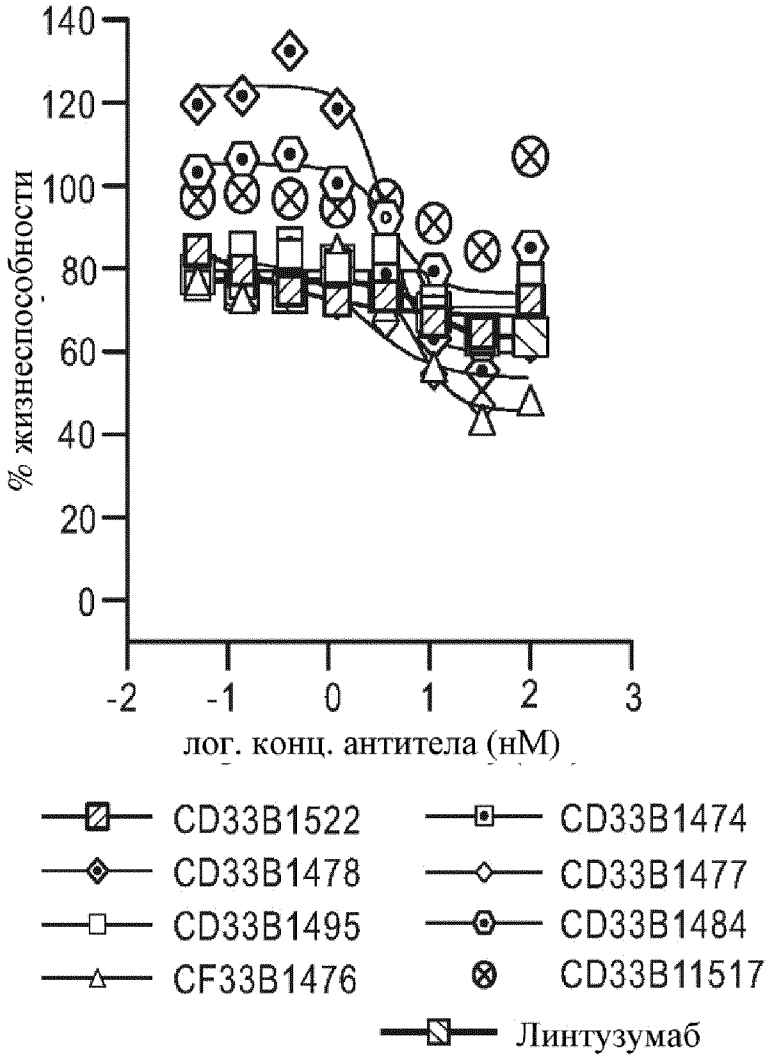


ФИГ. 4А

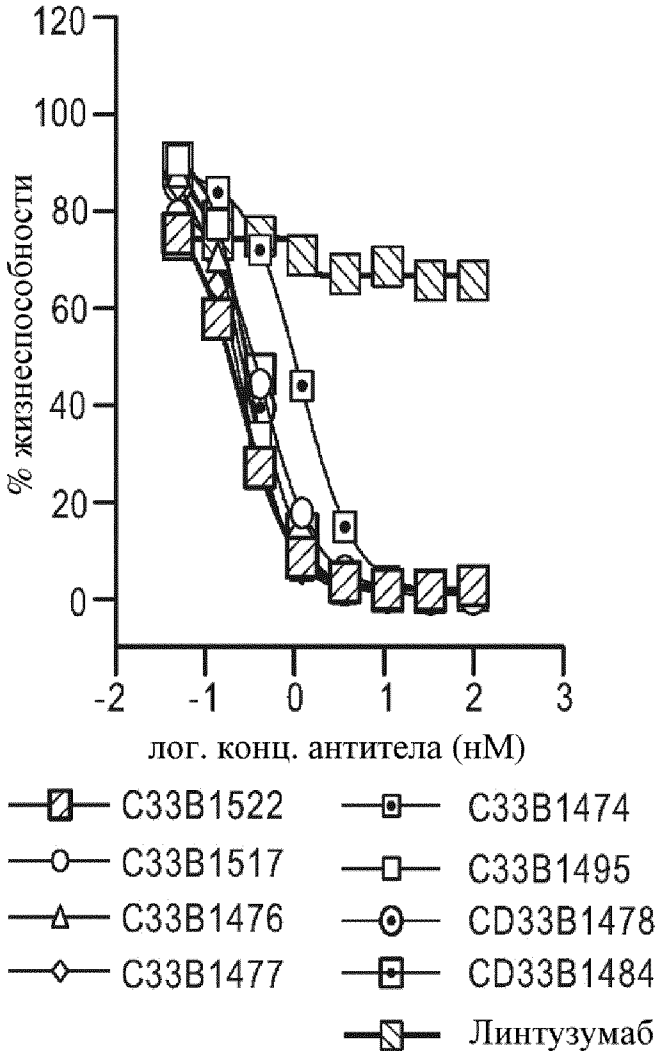
MOLM-13



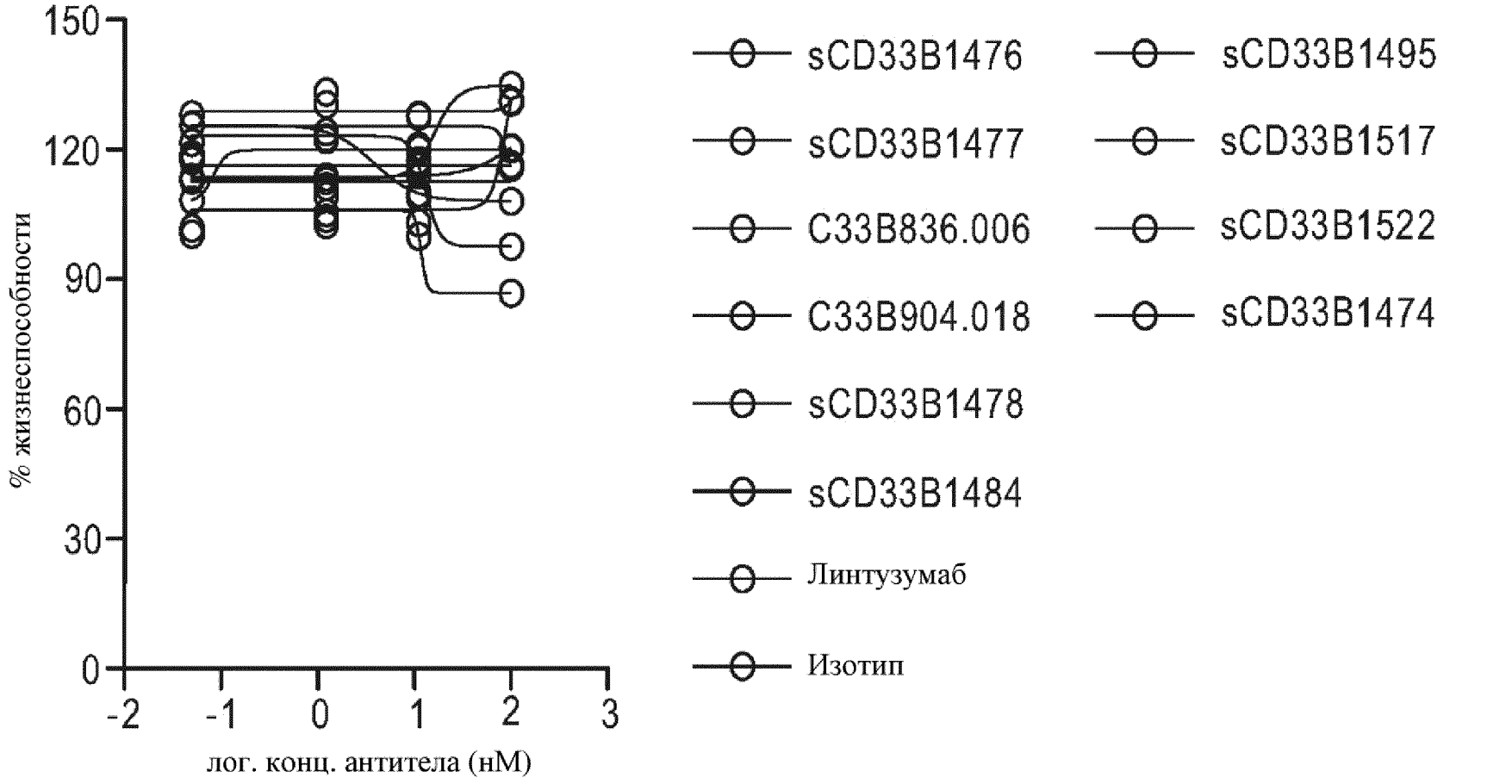
ФИГ. 4B Kasumi-1



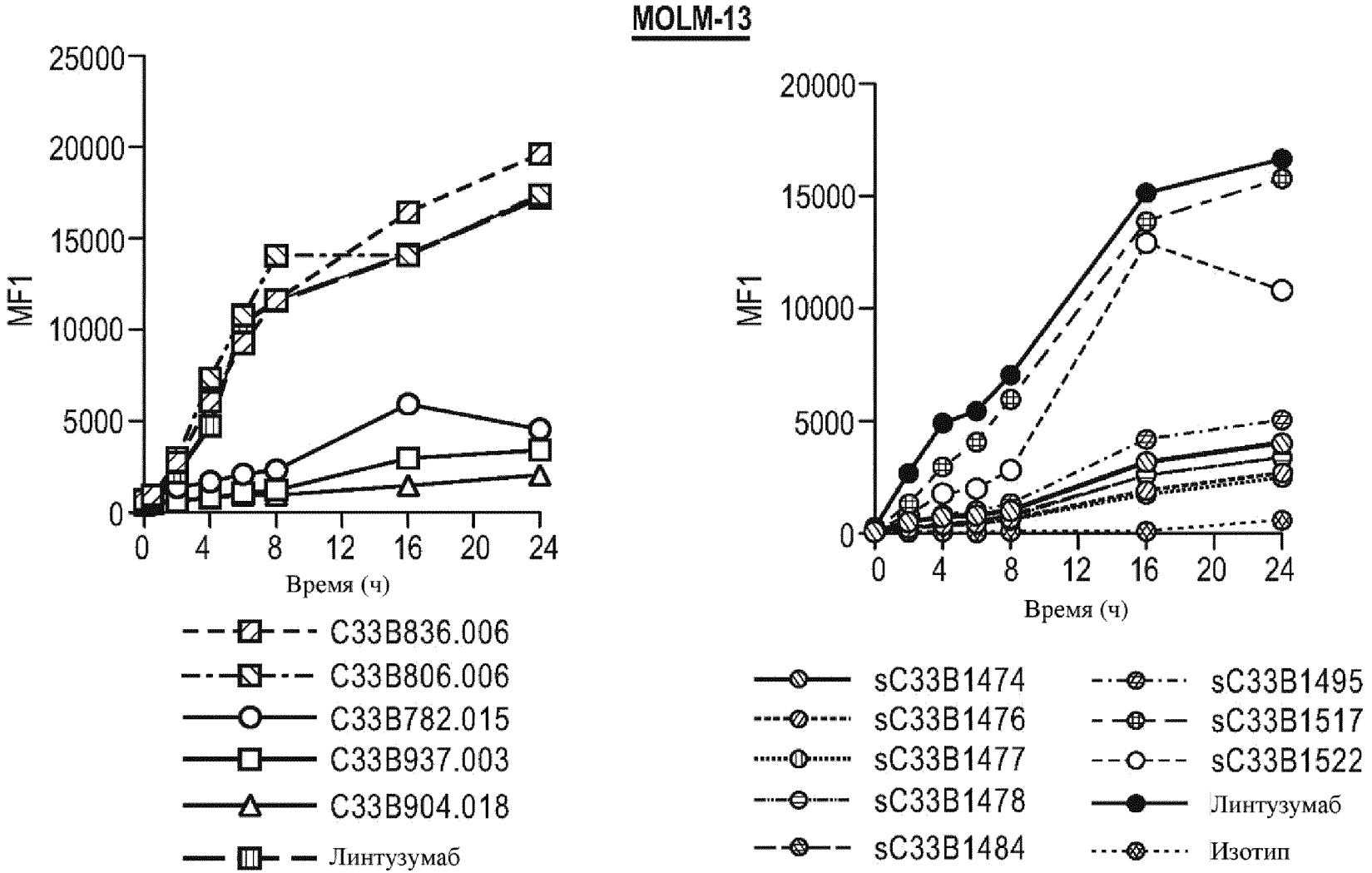
ФИГ. 4C OCI-AML-3



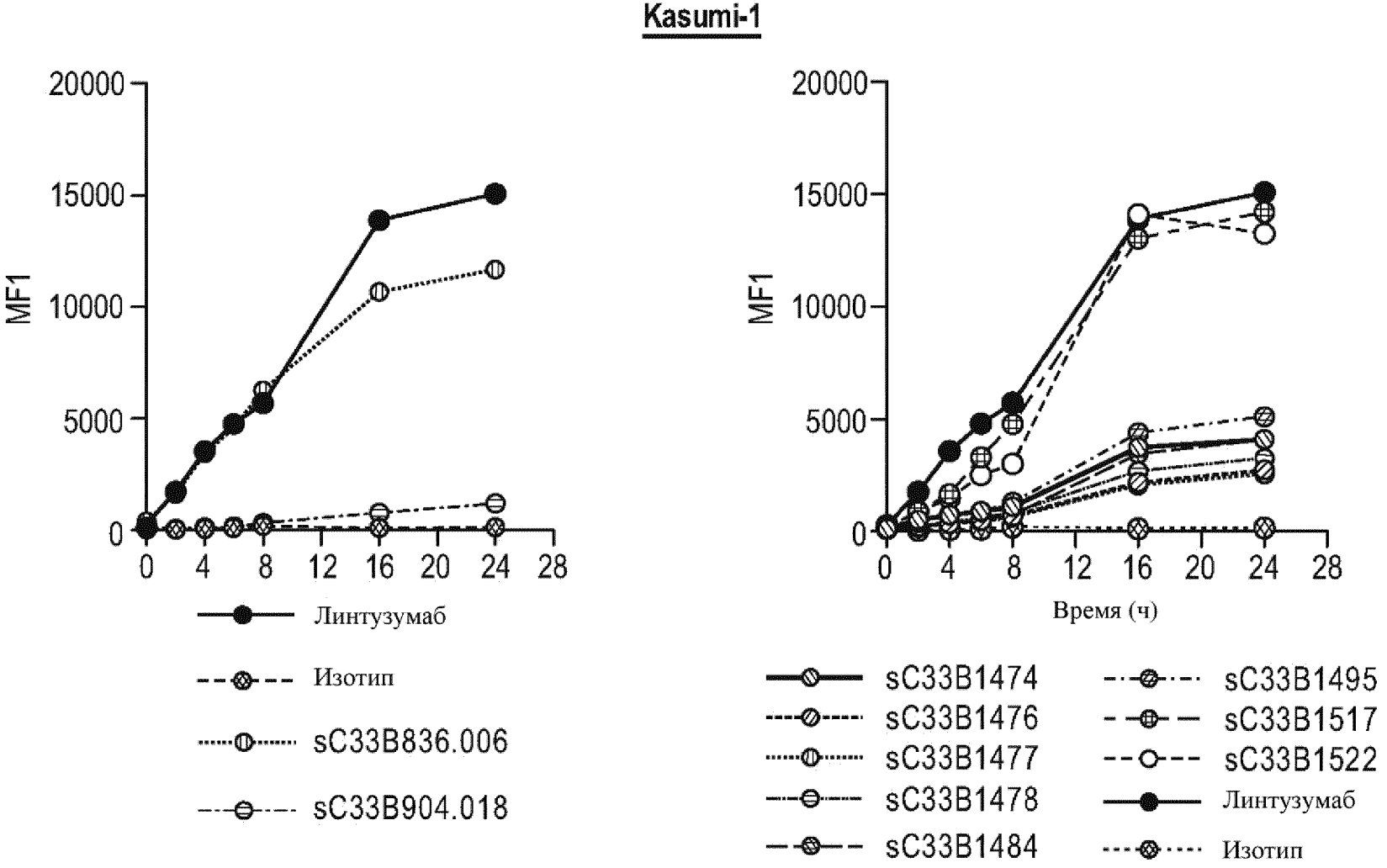
ФИГ. 4D


HDLM-2
150
120
90
60
30
0
% жизнеспособности
-2
-1
0
1
2
3
лог. конц. антитела (нМ)
sCD33B1476
sCD33B1477
C33B836.006
C33B904.018
sCD33B1478
sCD33B1484
Линтузумаб
Изотип
sCD33B1495
sCD33B1517
sCD33B1522
sCD33B1474

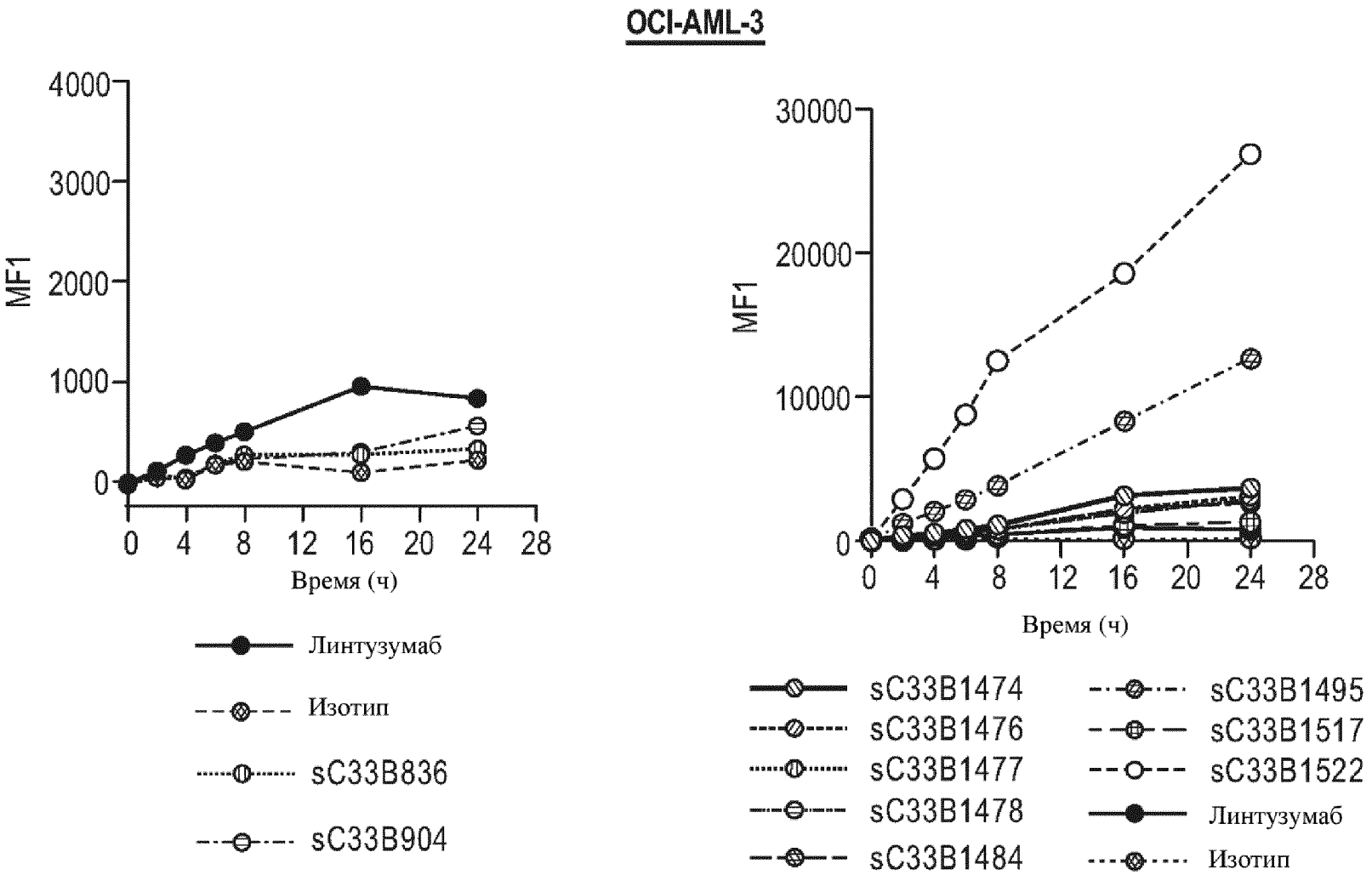
ФИГ. 5


MOLM-13
MF1
Время (ч)
C33B836.006
C33B806.006
C33B782.015
C33B937.003
C33B904.018
Линтузумаб
sC33B1474
sC33B1476
sC33B1477
sC33B1478
sC33B1484
sC33B1495
sC33B1517
sC33B1522
Линтузумаб
Изотип

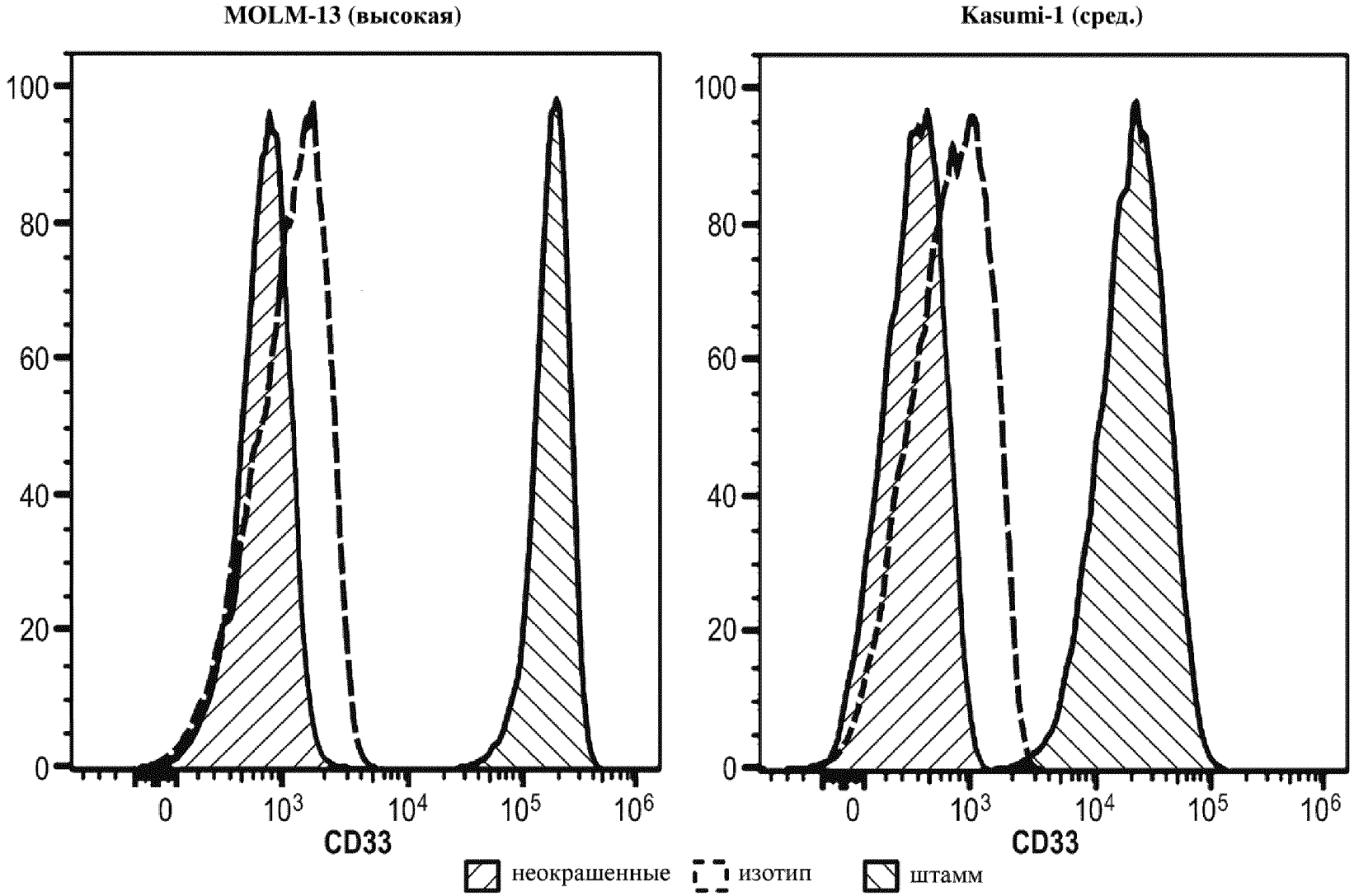
ФИГ. 5 (прод.)


Kasumi-1
MF1
20000
15000
10000
5000
0
0 4 8 12 16 20 24 28
Время (ч)
Линтузумаб
Изотип
sC33B836.006
sC33B904.018
sC33B1474
sC33B1476
sC33B1477
sC33B1478
sC33B1484
sC33B1495
sC33B1517
sC33B1522
Линтузумаб
Изотип

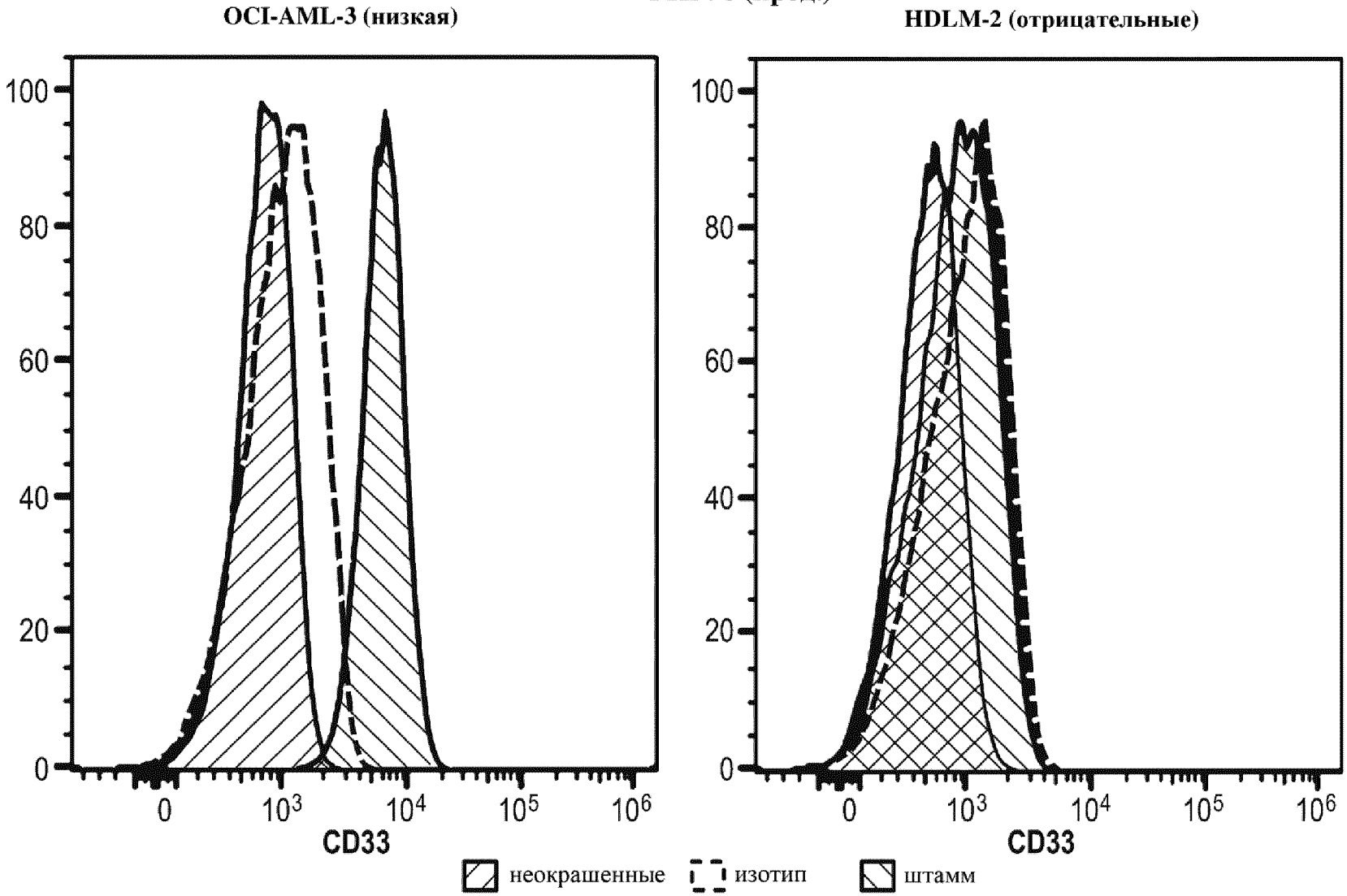
ФИГ. 5 (прод.)


OCI-AML-3
MF1
4000
3000
2000
1000
0
0 4 8 12 16 20 24 28
Время (ч)
Линтузумаб
Изотип
sC33B836
sC33B904
MF1
30000
20000
10000
0
0 4 8 12 16 20 24 28
Время (ч)
sC33B1474
sC33B1476
sC33B1477
sC33B1478
sC33B1484
sC33B1495
sC33B1517
sC33B1522
Линтузумаб
Изотип

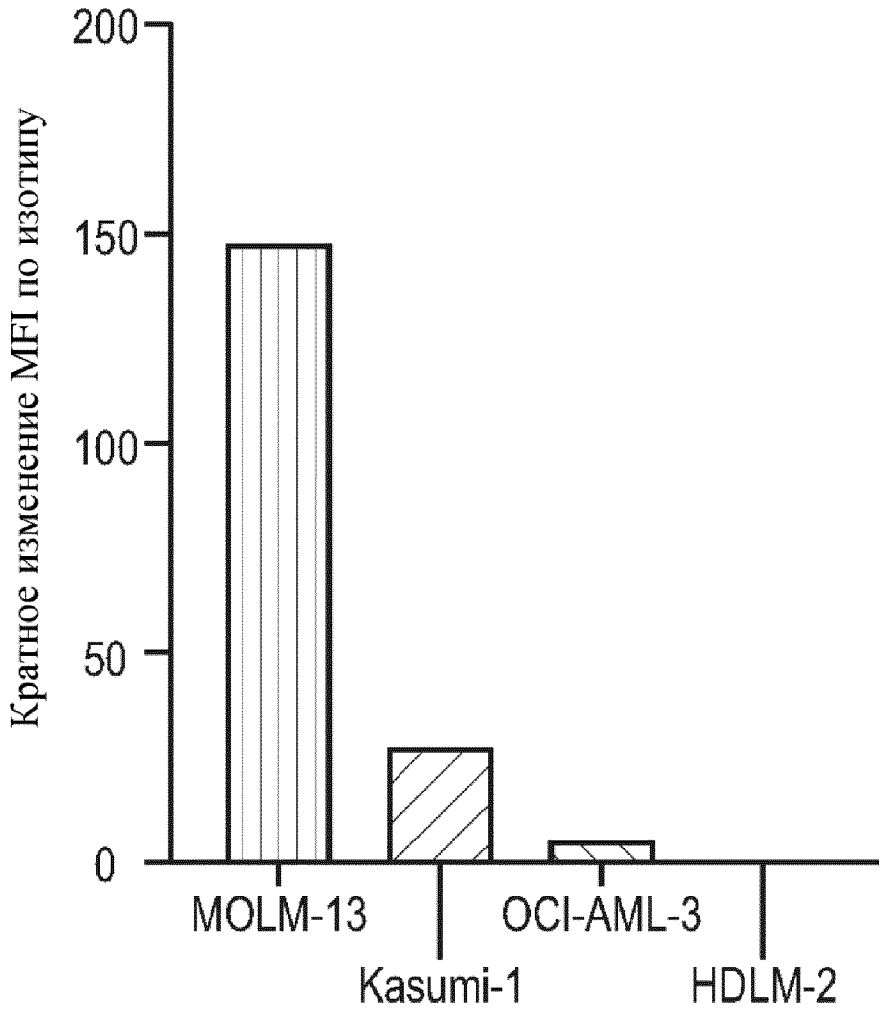
ФИГ. 6


MOLM-13 (высокая)
Kasumi-1 (сред.)
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
10^6
CD33
неокрашенные
изотип
штамм

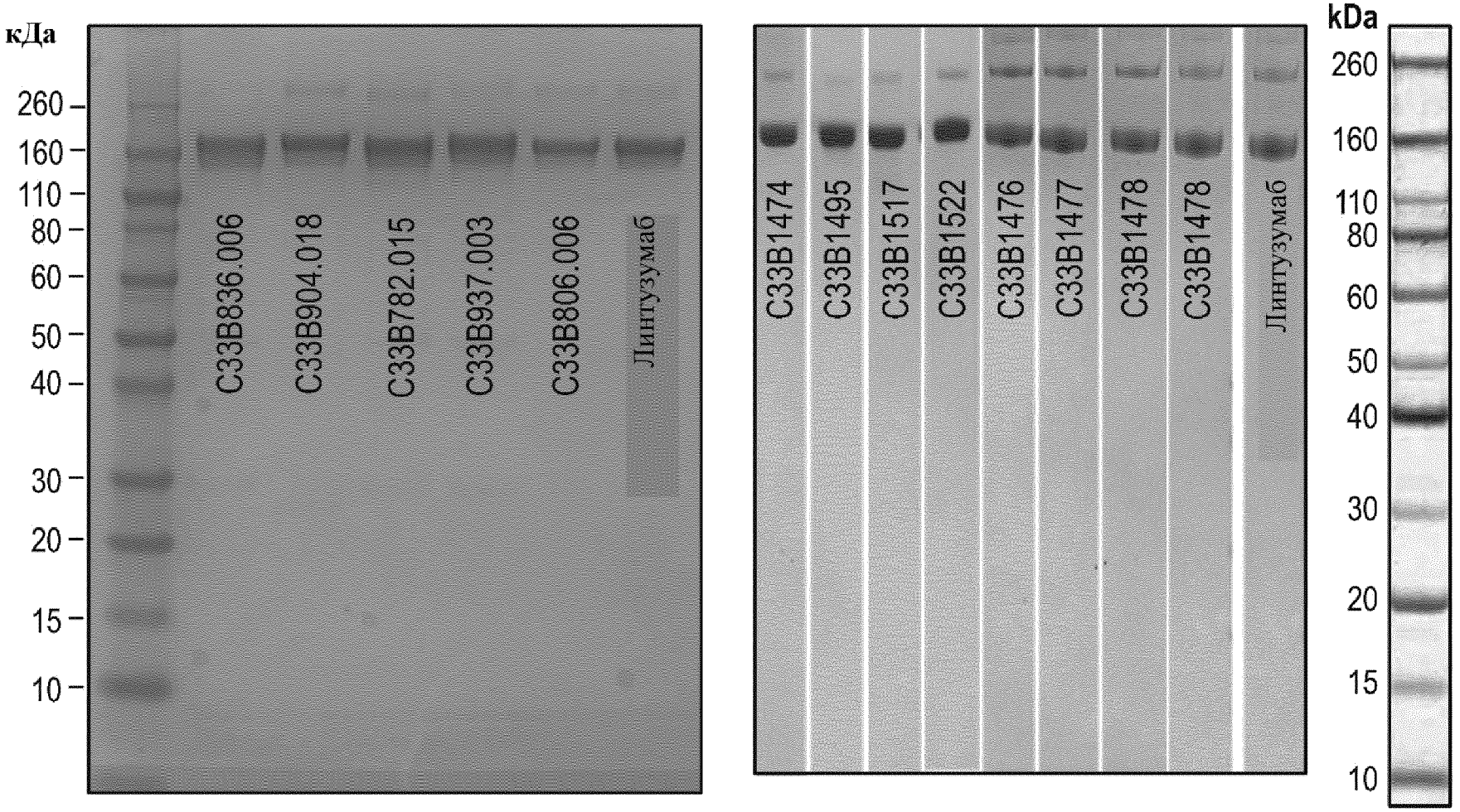
ФИГ. 6 (прод.)


OCI-AML-3 (низкая)
HDLM-2 (отрицательные)
100
80
60
40
20
0
0
10^3
10^4
10^5
10^6
CD33
неокрашенные
изотип
штамм

ФИГ. 6 (прод.)


Кратное изменение MFI по изотипу
200
150
100
50
0
MOLM-13
Kasumi-1
OCI-AML-3
HDLM-2

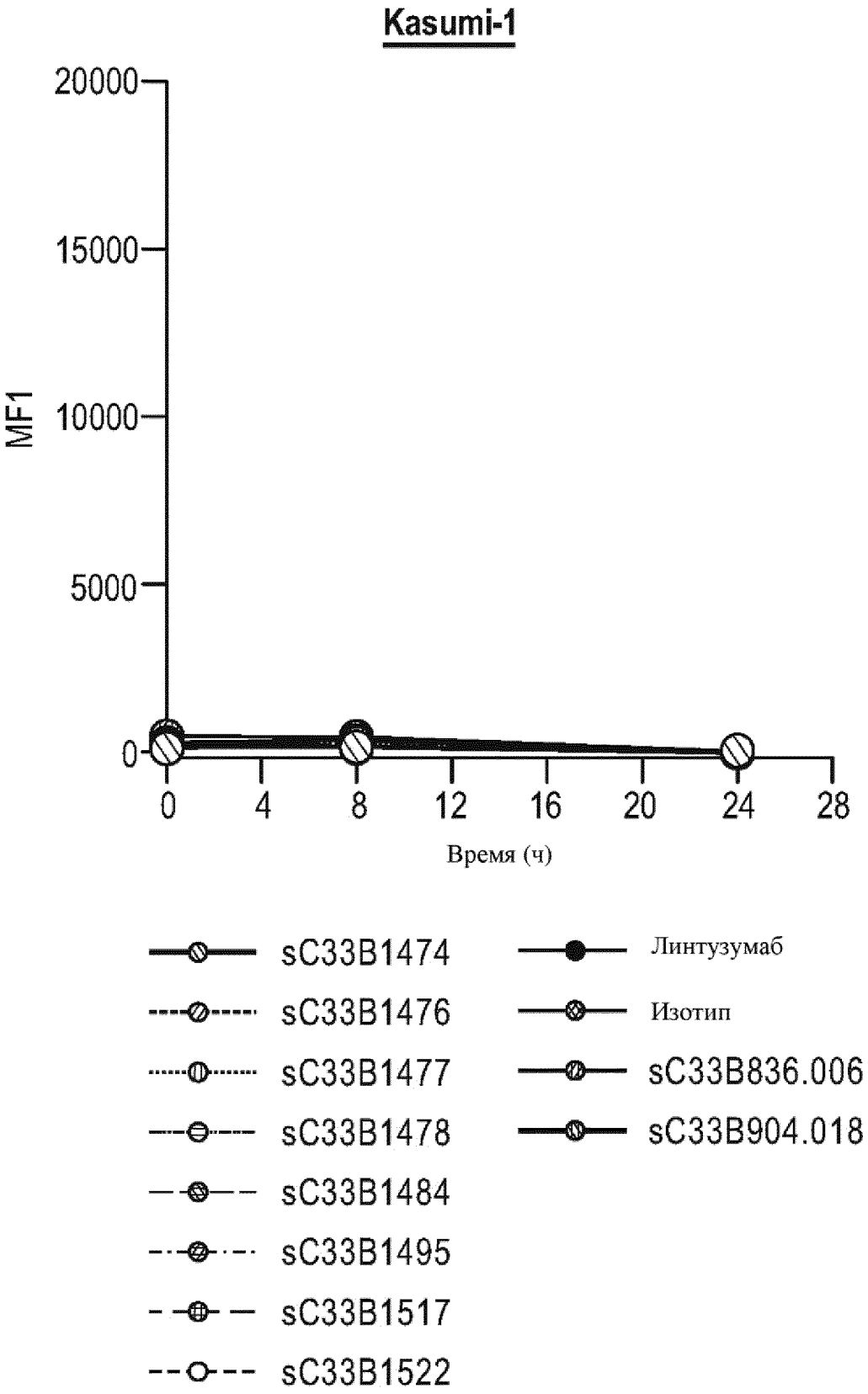
ФИГ. 7


кДа
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
C33B836.006
C33B904.018
C33B782.015
C33B937.003
C33B806.006
Линтузумаб
C33B1474
C33B1495
C33B1517
C33B1522
C33B1476
C33B1477
C33B1478
C33B1478
Линтузумаб
kDa
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10

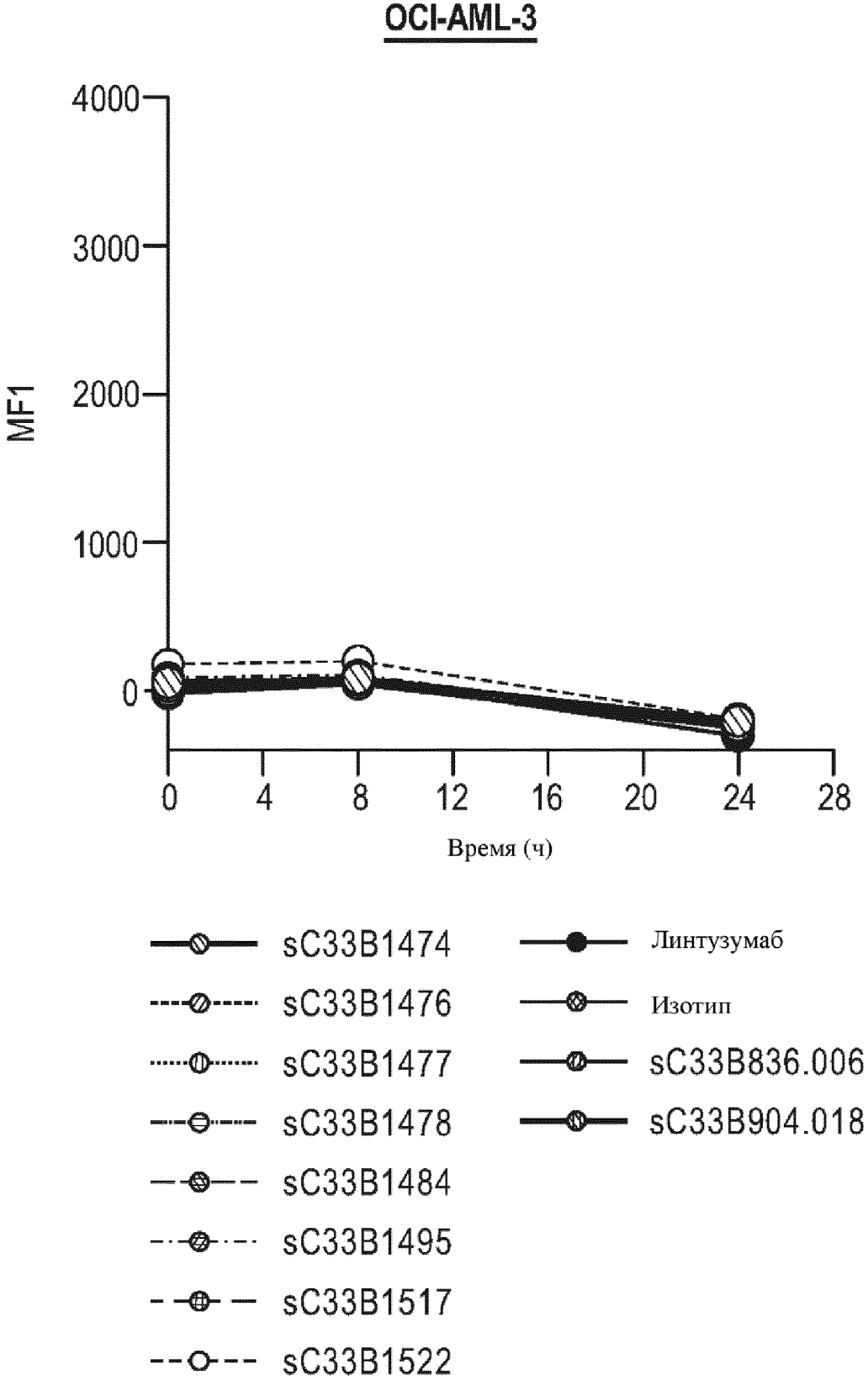
ФИГ. 7 (прод.)

Антитело	DAR
sC331474	4,5
sC331476	2,7
sC331477	2,6
sC331478	3,7
sC331484	5,2
sC331495	4,3
sC331517	2,1
sC331522	2,1
C33B836.006	3,2
C33B782.015	2,8
C33B904.018	3,5
C33B806.006	2,4
C33B937.003	3,2
Линтузумаб	3,6

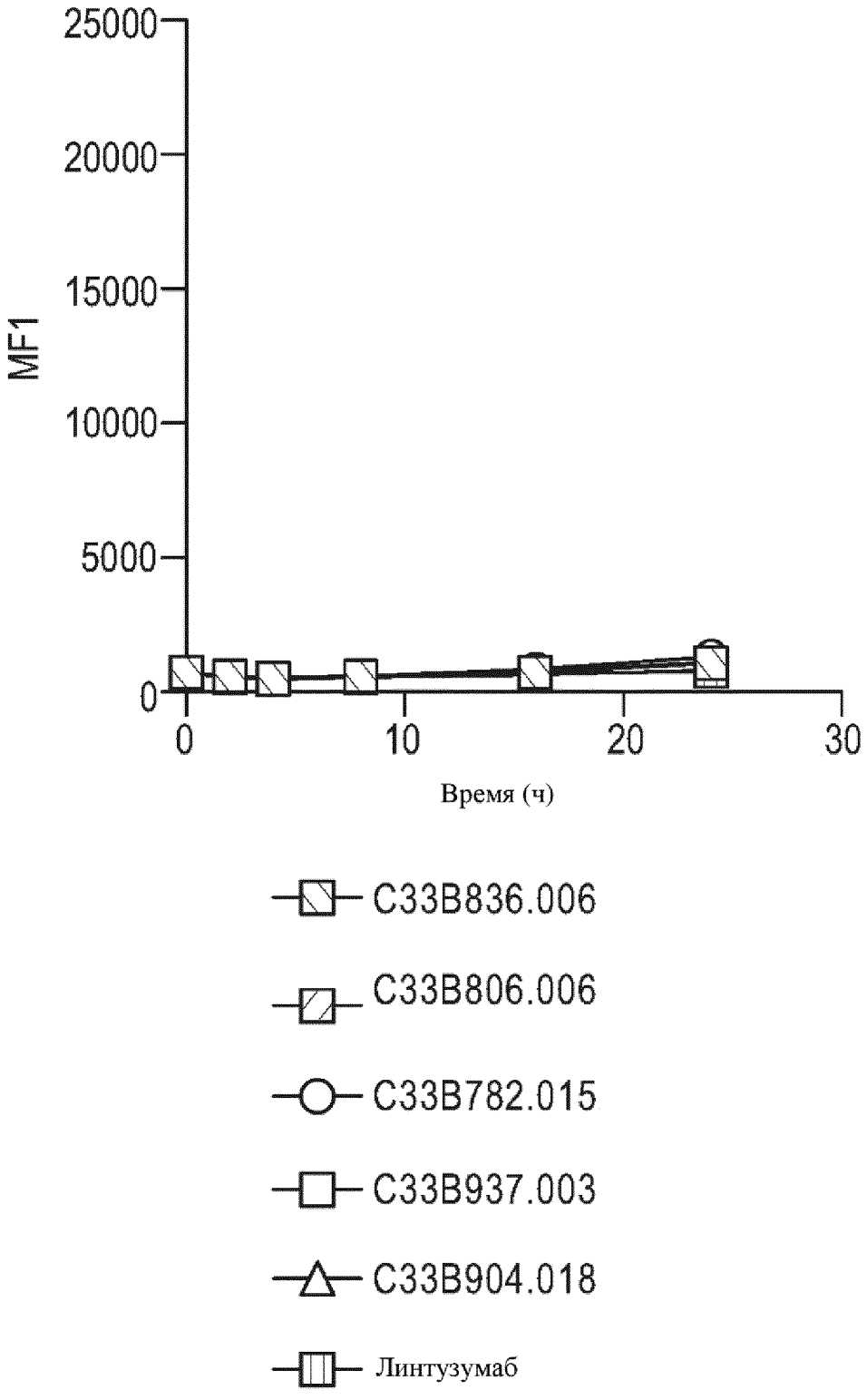
ФИГ. 8А


Kasumi-1
20000
15000
10000
5000
0
MF1
0
4
8
12
16
20
24
28
Время (ч)
sC33B1474
sC33B1476
sC33B1477
sC33B1478
sC33B1484
sC33B1495
sC33B1517
sC33B1522
Линтузумаб
Изотип
sC33B836.006
sC33B904.018

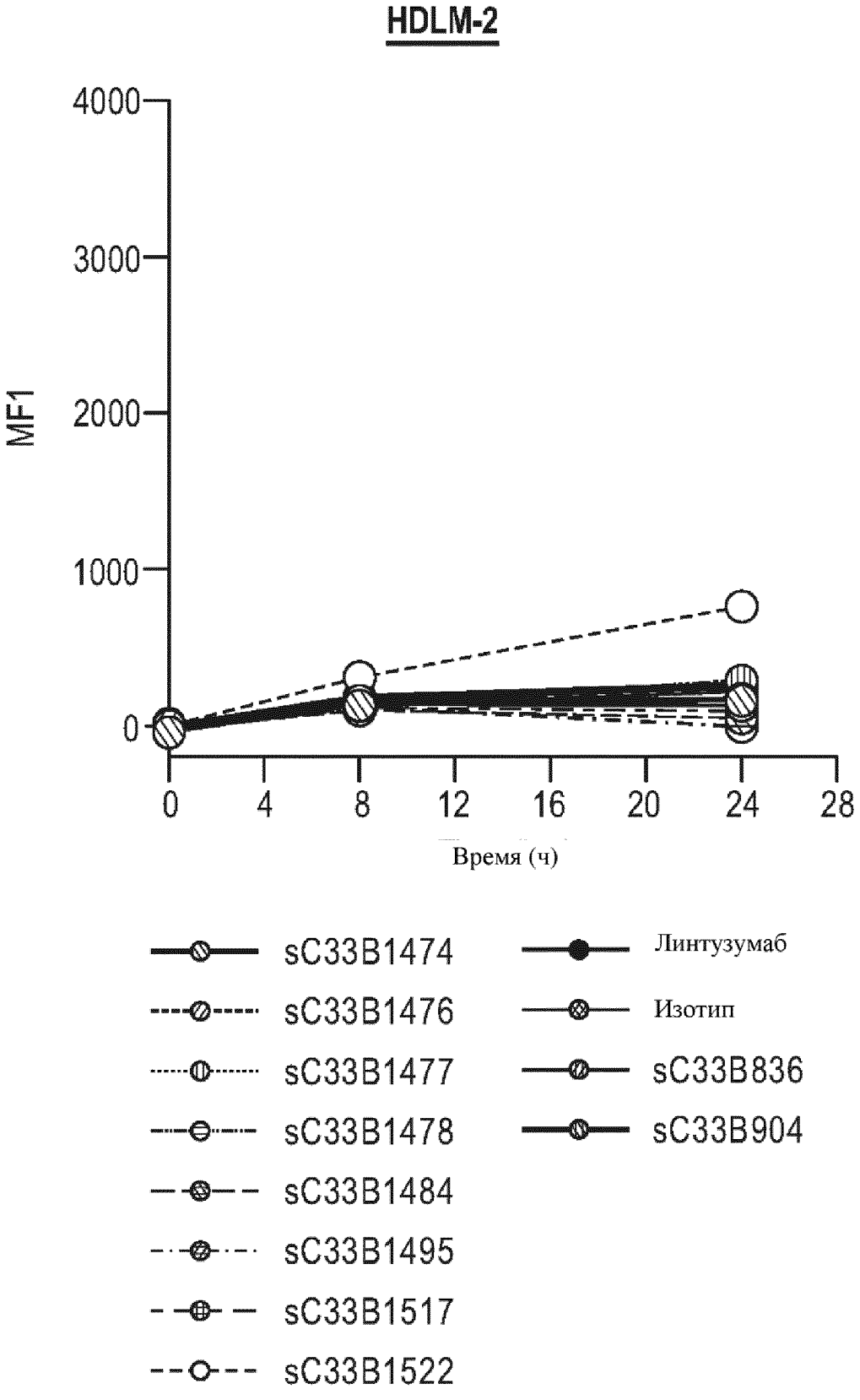
ФИГ. 8А (прод.)


OCI-AML-3
4000
3000
2000
1000
0
MF1
0
4
8
12
16
20
24
28
Время (ч)
sC33B1474
sC33B1476
sC33B1477
sC33B1478
sC33B1484
sC33B1495
sC33B1517
sC33B1522
Линтузумаб
Изотип
sC33B836.006
sC33B904.018

ФИГ. 8B


HDLM-2
25000
20000
15000
10000
5000
0
MF1
0
10
20
30
Время (ч)
C33B836.006
C33B806.006
C33B782.015
C33B937.003
C33B904.018
Линтузумаб

ФИГ. 8В (прод.)


HDLM-2
4000
3000
2000
1000
0
MF1
0
4
8
12
16
20
24
28
Время (ч)
sC33B1474
sC33B1476
sC33B1477
sC33B1478
sC33B1484
sC33B1495
sC33B1517
sC33B1522
Линтузумаб
Изотип
sC33B836
sC33B904

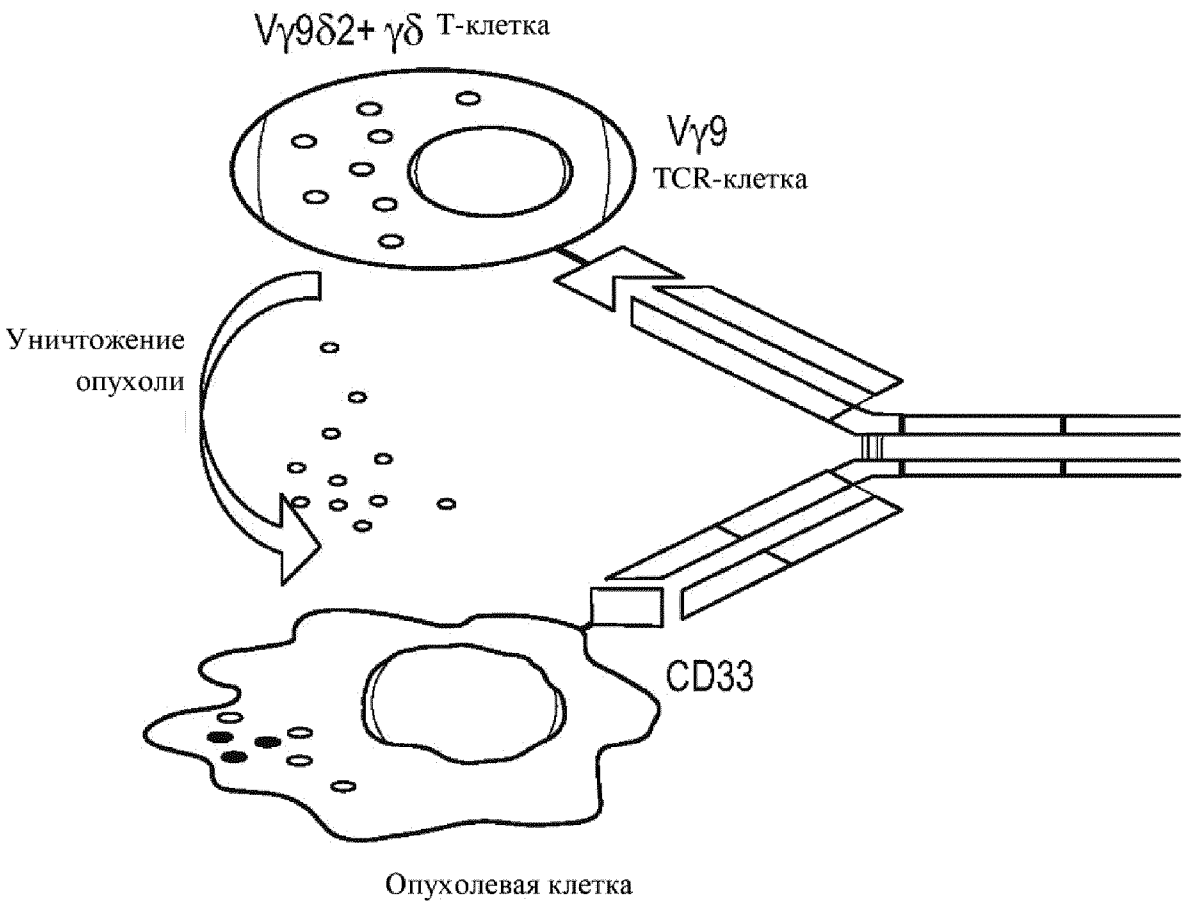
ФИГ. 9

Антитело	MOLM-13 (высокая) EC_{50} (нМ)	Kasumi-1 (сред.) EC_{50} (нМ)	OCI-AML-3 (низкая) EC_{50} (нМ)
C33B836.006	0,5	17,06	0,46
C33B806.006	35,6	0,13	15,3
C33B904.018	ND	ND	ND
C33B937.003	ND	ND	ND
C33B782.015	ND	ND	ND
C33B1517	10,6	ND	1,4
C33B1522	32,66	73,4	ND
C33B1477	56	ND	0,6
C33B1474	78,4	ND	1,26
C33B1478	ND	ND	ND
C33B1476	ND	ND	0,8
C33B1495	ND	ND	ND
C33B1484	ND	ND	ND
Линтузумаб	0,31	0,34	0,9

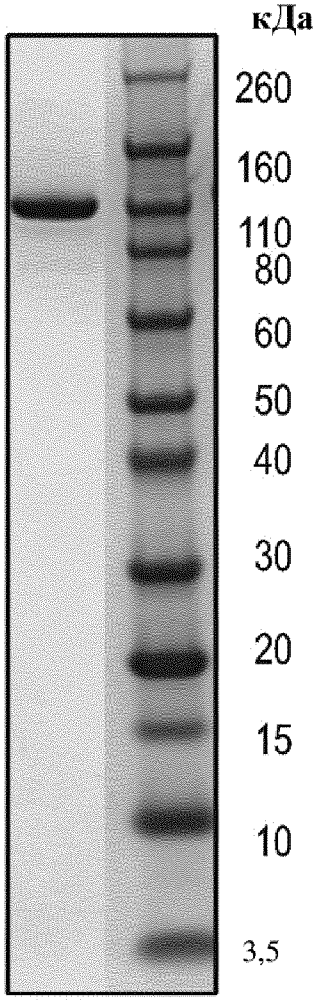
ФИГ. 10

	MOLM-13 (высокая)	Kasumi-1 (сред.)	OCI-AML-3 (низкая)
Антитело	EC_{50} (нМ)	% жизнеспособности	EC_{50} (нМ)
C33B836.006	***~0,002***	Не тестировали	Не тестировали
C33B806.006	0,106	Не тестировали	Не тестировали
C33B904.018	0,744	Не тестировали	Не тестировали
C33B937.003	0,840	Не тестировали	Не тестировали
C33B782.015	1,062	Не тестировали	Не тестировали
C33B1517	***0,09***	106	0,45
C33B1522	0,9	73,4	0,24
C33B1476	1,09	48,1	0,27
C33B1477	1,76	60,9	0,24
C33B1478	2,5	64,6	0,34
C33B1484	3,5	85,01	0,39
C33B1474	5,93	78,1	1,18
C33B1495	14,44	77,4	0,30
Линтузумаб	0,04	63,5	0,9

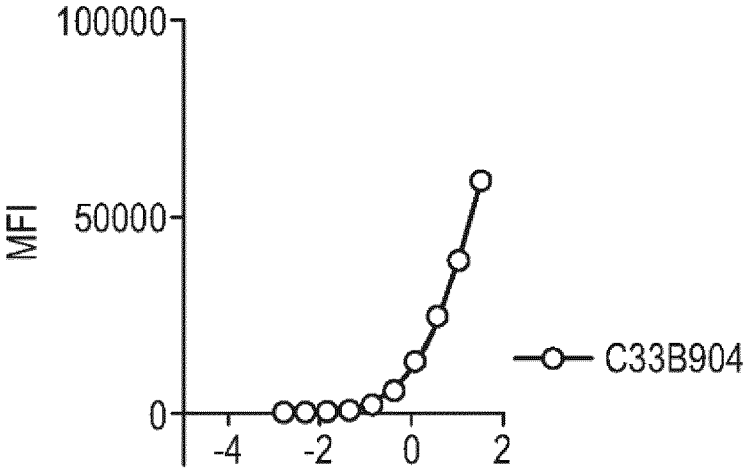
ФИГ. 11


Vγ9δ2+ γδ Т-клетка
Vγ9
TCR-клетка
Уничтожение
опухоли
CD33
Опухолевая клетка

ФИГ. 12


кДа
260
160
110
80
60
50
40
30
20
15
10
3,5

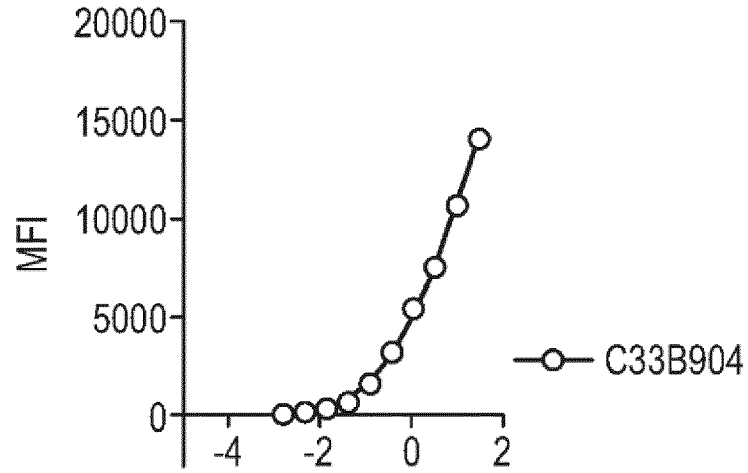
ФИГ. 13
MOLM-13
(высокая)



Log [антитело] (мкг/мл)

Антитело	EC_{50} (нМ)	EC_{90} (нМ)
C33B904	~134,33	3748

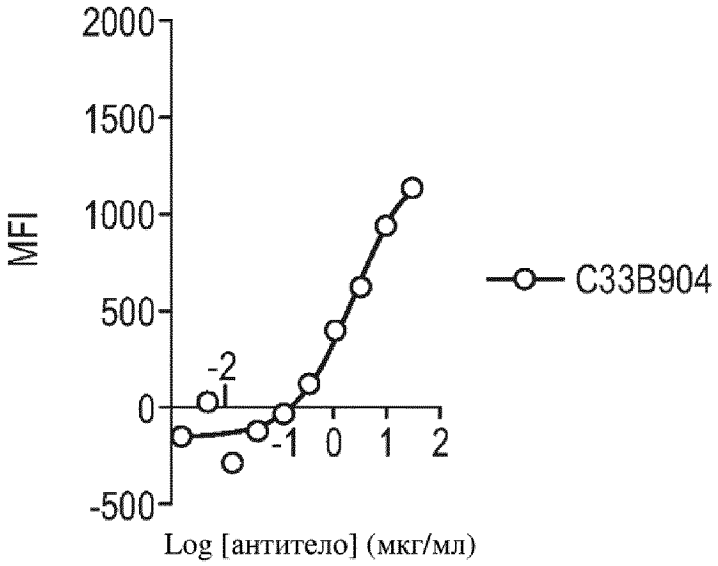
ФИГ. 14
Kasumi-1
(сред.)



Лог. конц. антитела (мкг/мл)

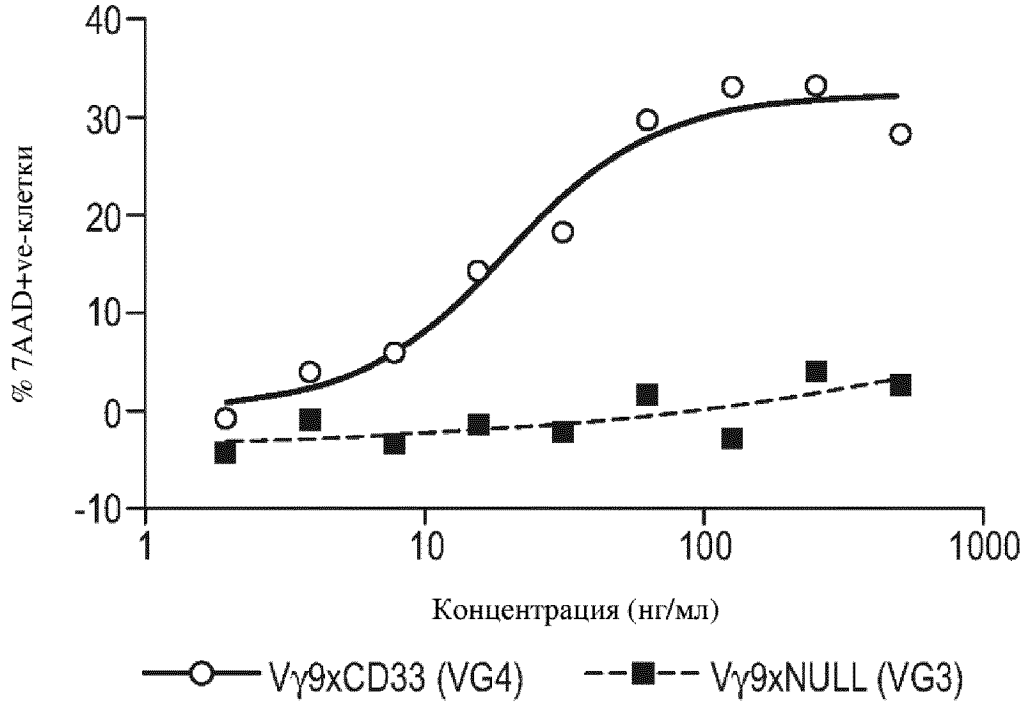
Антитело	EC_{50} (нМ)	EC_{90} (нМ)
C33B904	82,2	6660

ФИГ. 15
OCI-AML-3
(низкая)

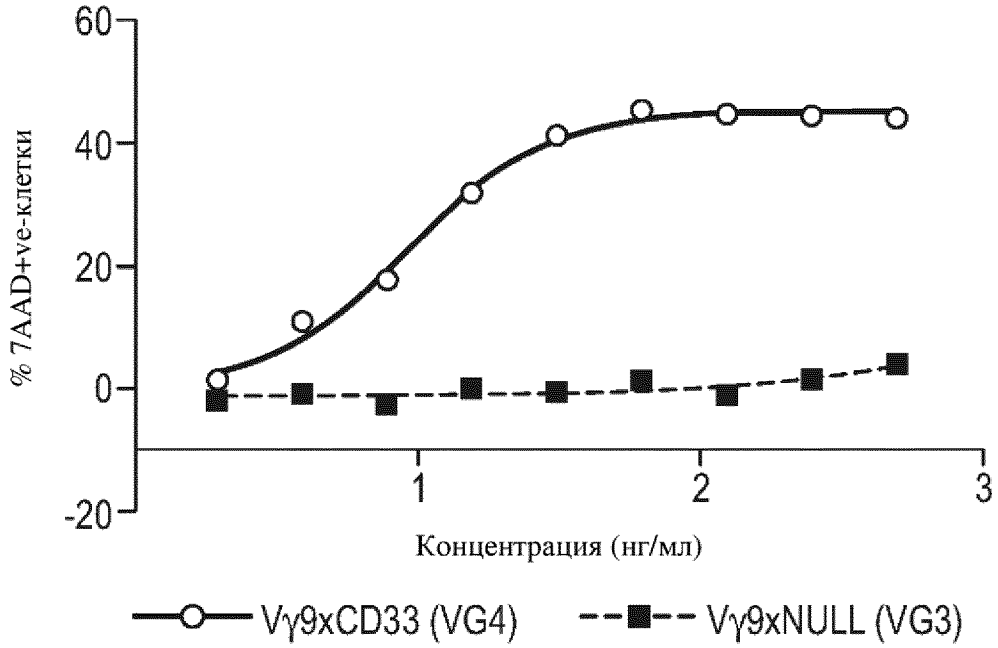


Антитело	EC_{50} (нМ)	EC_{90} (нМ)
C33B904	16,4	274

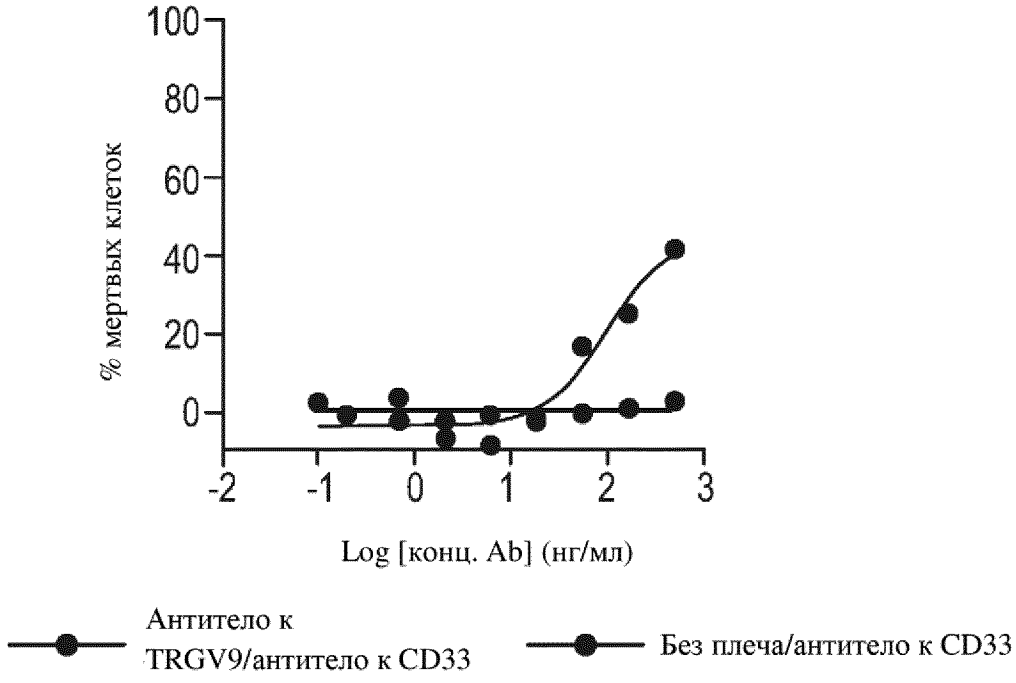
ФИГ. 16
Соотношение ЕТ 1:1



ФИГ. 17
Соотношение ЕТ 5:1



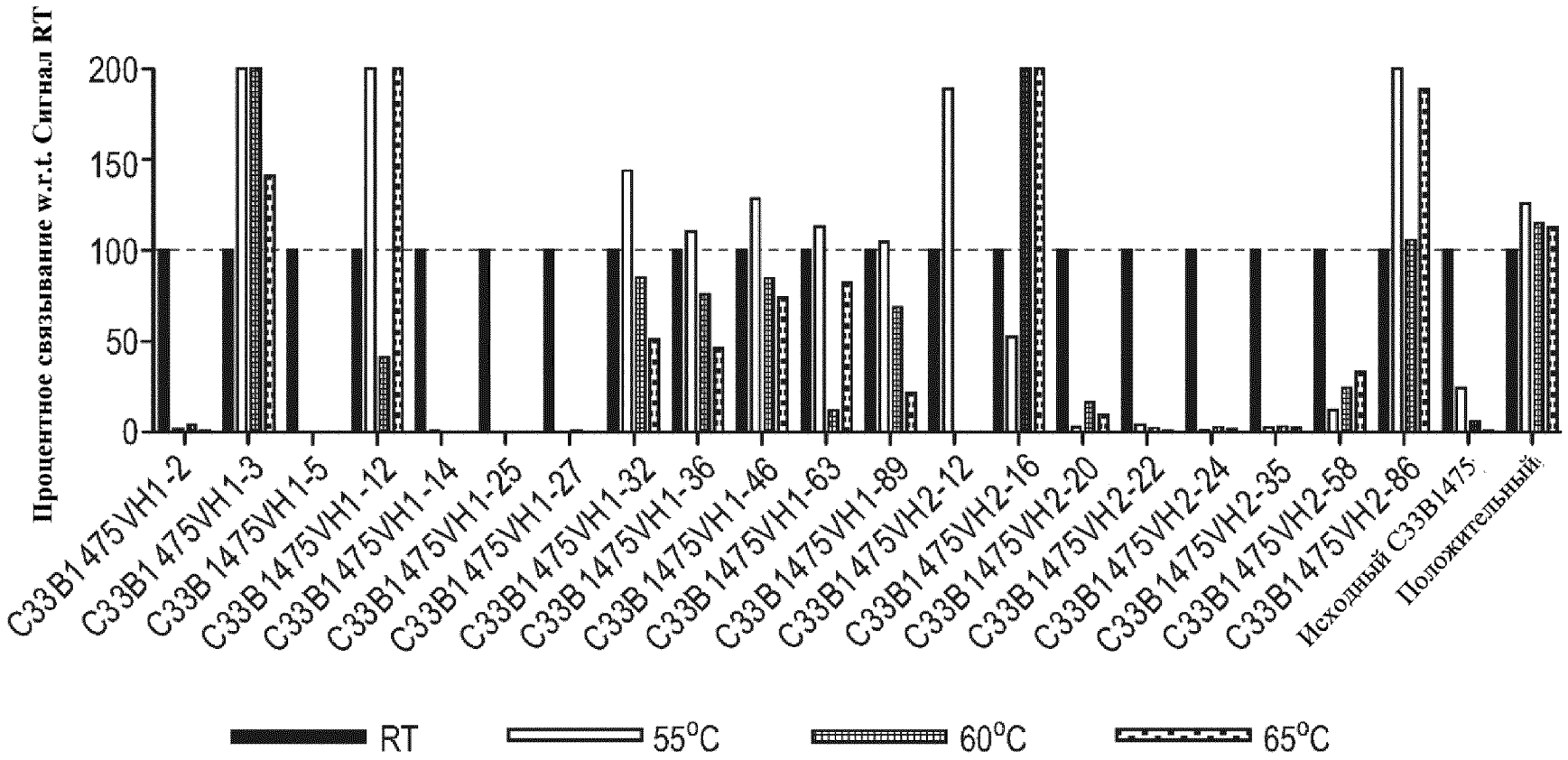
ФИГ. 18



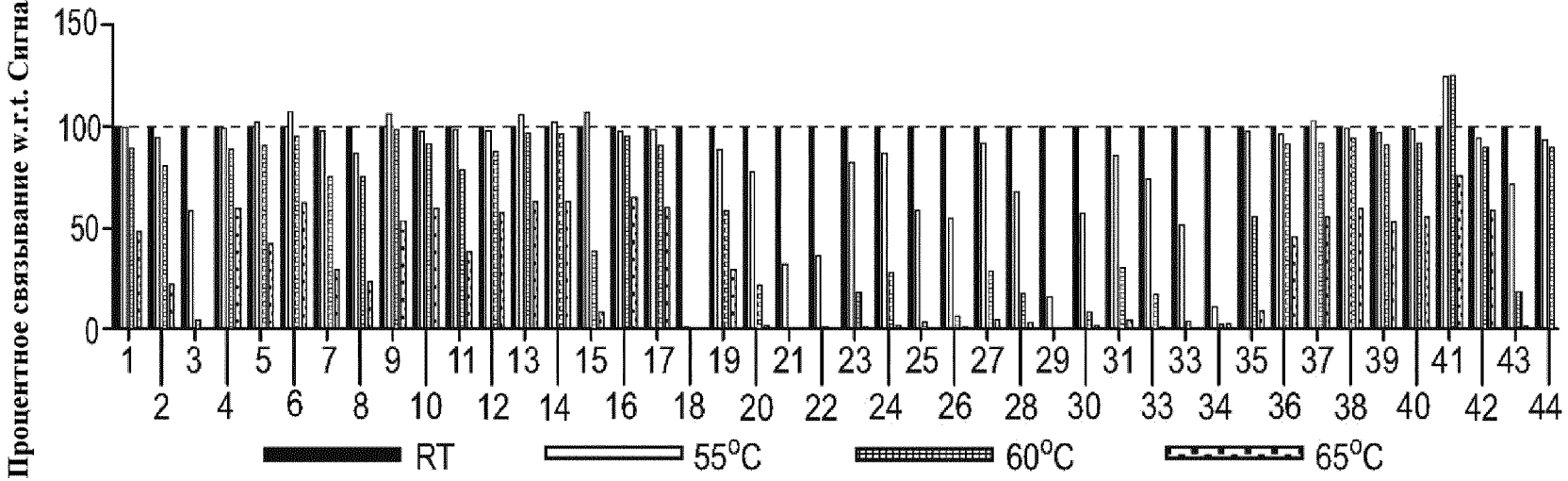
ФИГ. 19

	Значимые библиотеки HC							Значимые библиотеки LC						
	HCFW1	HCDR1	HCFW2	HCDR2	HCFW3	HCDR3	HCFW4	LCFW1	LCDR1	LCFW2	LCDR2	LCFW3	LCDR3	LCFW4
JL2	FR1	CDR1	FR2	DG	NSDTDT	CDR3	FR4	FR1	DG	FR2	CDR1	FR3	CDR3	FR4
JL3	FR1	CDR1	FR2	CDR2	NNDTDT	NG	FR4	FR1	CDR1	FR2	CDR1	FR3	NGDS	FR4
JL5	FR1	CDR1	FR2	CDR2	NNDT	NG	FR4	FR1	CDR1	FR2	NN	FR3	NGDS	FR4
JL6	FR1	CDR1	FR2	CDR2	DT	DP	FR4	FR1	CDR1	FR2	NN	FR3	DPDS	FR4

ФИГ. 20

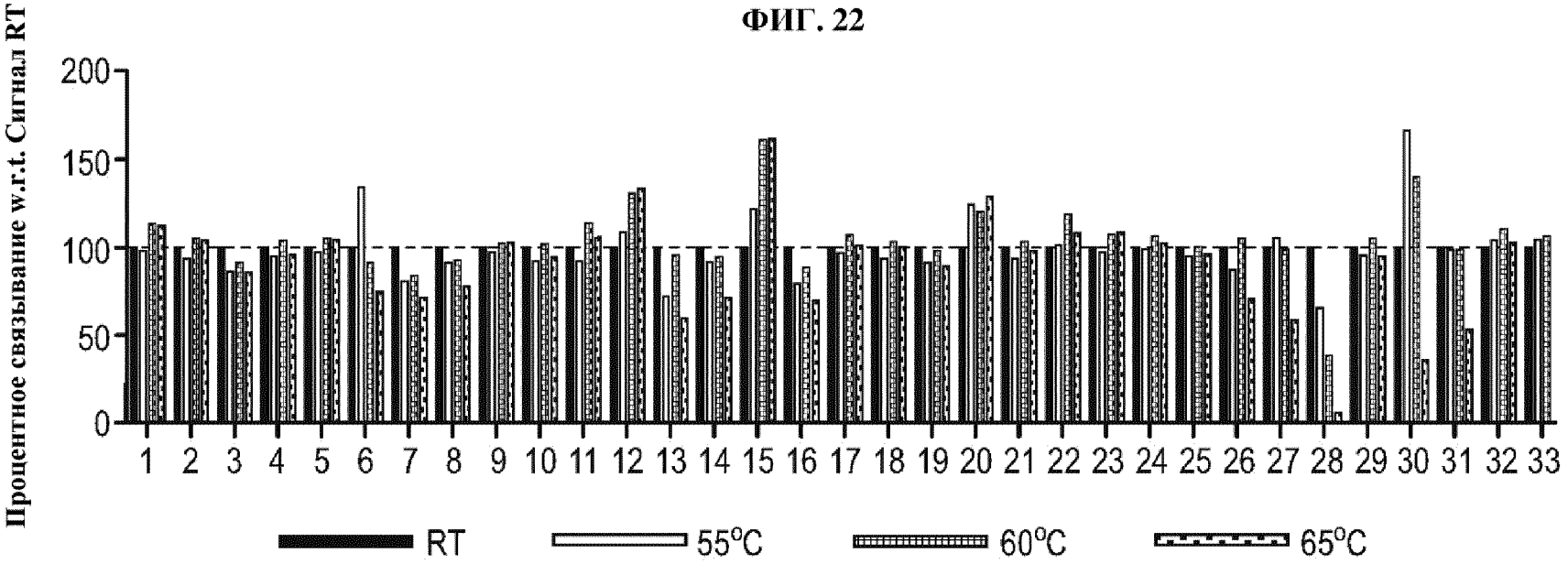

Процентное связывание w.r.t. Сигнал RT
200
150
100
50
0
C33B1475VH1-2
C33B1475VH1-3
C33B1475VH1-5
C33B1475VH1-12
C33B1475VH1-14
C33B1475VH1-25
C33B1475VH1-27
C33B1475VH1-32
C33B1475VH1-36
C33B1475VH1-46
C33B1475VH1-63
C33B1475VH1-89
C33B1475VH2-12
C33B1475VH2-16
C33B1475VH2-20
C33B1475VH2-22
C33B1475VH2-24
C33B1475VH2-35
C33B1475VH2-58
C33B1475VH2-86
Исходный C33B1475
Положительный
RT
55°C
60°C
65°C

ФИГ. 21



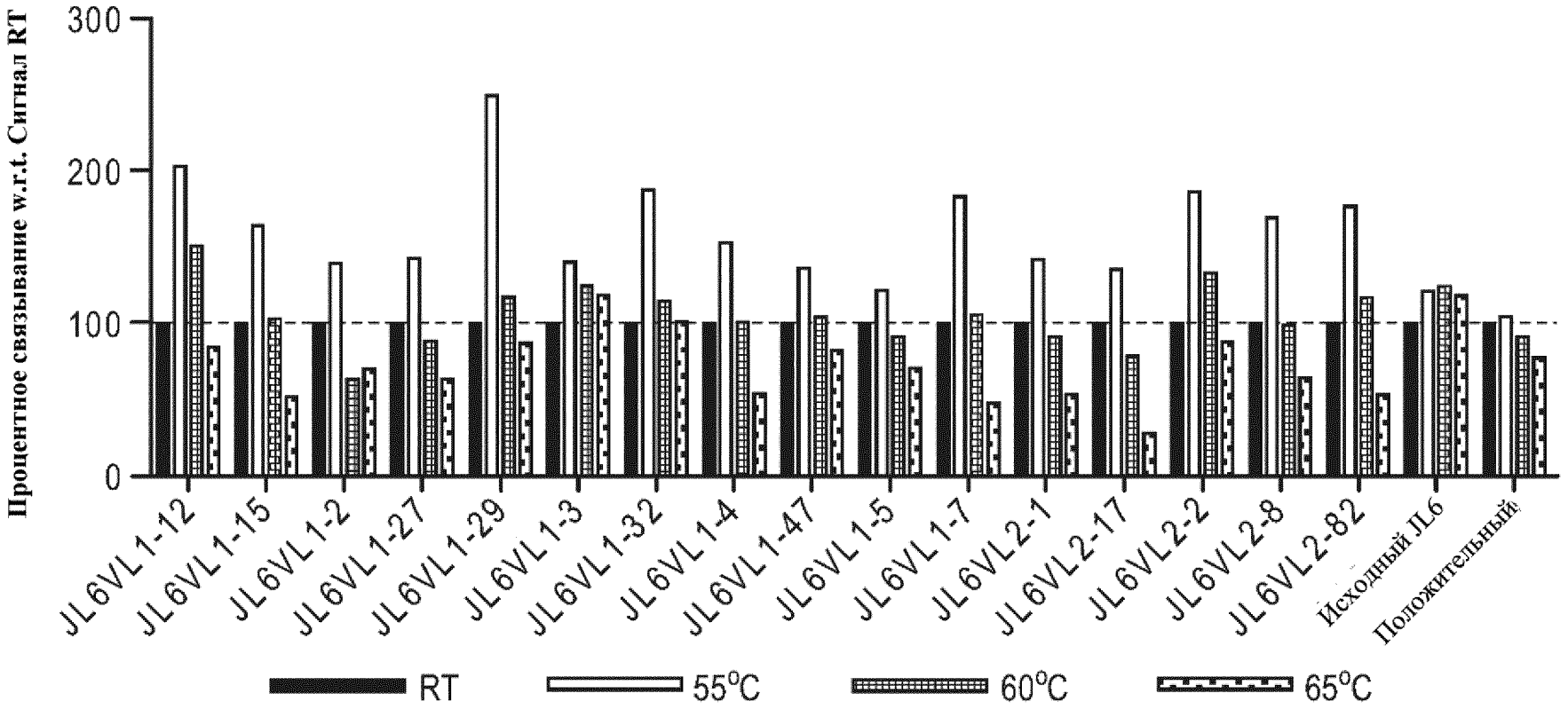
1	C33B1516VL1-1	**2**	3B1516VL1-10	**3**	C33B1516VL1-11	**4**	C33B1516VL1-14	**5**	C33B1516VL1-16
6	C33B1516VL1-2	**7**	C33B1516VL1-20	**8**	C33B1516VL1-22	**9**	C33B1516VL1-23	**10**	C33B1516VL1-30
11	C33B1516VL1-4	**12**	C33B1516VL2-10	**13**	C33B1516VL2-11	**14**	C33B1516VL2-29	**15**	C33B1516VL2-3
16	C33B1516VL2-35	**17**	C33B1516VL2-4	**18**	C33B1516VL2-7	**19**	C33B1516VL2-8	**20**	C33B1516VH1-1
21	C33B1516VH1-10	**22**	C33B1516VH1-13	**23**	C33B1516VH1-17	**24**	C33B1516VH1-20	**25**	C33B1516VH1-21
26	C33B1516VH1-27	**27**	C33B1516VH1-3	**28**	C33B1516VH1-38	**29**	C33B1516VH1-4	**30**	C33B1516VH1-56
31	C33B1516VH1-6	**32**	C33B1516VH1-7	**33**	C33B1516VH1-8	**34**	C33B1516VH2-8	**35**	C33B1516VH2-9
36	C33B1516VL1-39	**37**	C33B1516VL1-41	**38**	C33B1516VL1-63	**39**	C33B1516VL1-90	**40**	C33B1516VL2-37
41	C33B1516VL2-38	**42**	C33B1516VL2-90	**43**	Исходный C33B1516	**44**	Положительный	**KEY**	

ФИГ. 22



1	C33B1517VL1-1	**2**	C33B1517VL1-7	**3**	C33B1517VL1-12	**4**	C33B1517VL1-8	**5**	C33B1517VL1-13
6	C33B1517VL1-16	**7**	C33B1517VL1-22	**8**	C33B1517VL1-35	**9**	C33B1517VL1-24	**10**	C33B1517VL1-27
11	C33B1517VL1-49	**12**	C33B1517VL1-66	**13**	C33B1517VL1-69	**14**	C33B1517VL1-71	**15**	C33B1517VH1-1
16	C33B1517VH1-3	**17**	C33B1517VH1-6	**18**	C33B1517VH1-4	**19**	C33B1517VH1-8	**20**	C33B1517VH1-11
21	C33B1517VH1-17	**22**	C33B1517VH1-27	**23**	C33B1517VH1-33	**24**	C33B1517VH1-60	**25**	C33B1517VH1-71
26	C33B1517VH2-7	**27**	C33B1517VH2-30	**28**	C33B1517VH2-31	**29**	C33B1517VH2-60	**30**	C33B1517VH2-68
31	C33B1517VH2-76	**32**	Положительный	**33**	Исходный C33B1517	**KEY**			

ФИГ. 23


Процентное связывание w.r.t. Сигнал RT
300
200
100
0
JL6VL1-12
JL6VL1-15
JL6VL1-2
JL6VL1-27
JL6VL1-29
JL6VL1-3
JL6VL1-32
JL6VL1-4
JL6VL1-47
JL6VL1-5
JL6VL1-7
JL6VL2-1
JL6VL2-17
JL6VL2-2
JL6VL2-8
JL6VL2-82
Исходный JL6
Положительный
RT
55°C
60°C
65°C

ФИГ. 24

JL2

ID клона	AA
C33B1475VH1-2	G
C33B1475VH1-3	A
C33B1475VH1-5	Y
C33B1475VH1-12	P
C33B1475VH1-14	N
C33B1475VH1-22	S
C33B1475VH1-27	R
C33B1475VH1-32	L
C33B1475VH1-36	V
C33B1475VH1-46	T
C33B1475VH1-63	F
C33B1475VH1-89	W
C33B1475VH2-12	V
C33B1475VH2-16	P
C33B1475VH2-20	R
C33B1475VH2-22	A
C33B1475VH2-24	L
C33B1475VH2-35	Q
C33B1475VH2-58	T
C33B1475VH2-86	H

JL3

ID клона	AA	ID клона	AA
C33B1516 VL1-1	V	C33B1516VH1-1	V
C33B1516 VL1-2	R	C33B1516VH1-3	S
C33B1516 VL1-4	P	C33B1516VH1-4	E
C33B1516 VL1-10	T	C33B1516VH1-6	H
C33B1516 VL1-11	G	C33B1516VH1-7	A
C33B1516 VL1-14	Q	C33B1516VH1-8	G
C33B1516 VL1-16	S	C33B1516VH1-10	K
C33B1516 VL1-20	A	C33B1516VH1-13	T
C33B1516 VL1-22	L	C33B1516VH1-17	F
C33B1516 VL1-23	Y	C33B1516VH1-20	V
C33B1516 VL1-30	E	C33B1516VH1-21	R
C33B1516VL1-39	F	C33B1516VH1-27	L
C33B1516VL1-41	D	C33B1516VH1-38	H
C33B1516VL1-63	I	C33B1516VH1-56	I
C33B1516VL1-90	H	C33B1516VH2-8	S
C33B1516 VL2-3	V	C33B1516VH2-9	A
C33B1516 VL2-4	P		
C33B1516 VL2-7	R		
C33B1516 VL2-8	D		
C33B1516 VL2-10	E		
C33B1516 VL2-11	W		
C33B1516 VL2-29	Y		
C33B1516 VL2-35	A		
C33B1516VL2-37	N		
C33B1516VL2-38	K		
C33B1516VL2-90	L		

ФИГ. 24 (прод.)

JL5

ID клона	AA	ID клона	AA
C33B1517VL1-1	G	C33B1517VH1-1	R
C33B1517VL1-7	D	C33B1517VH1-3	P
C33B1517VL1-8	P	C33B1517VH1-4	G
C33B1517VL1-12	K	C33B1517VH1-6	V
C33B1517VL1-13	E	C33B1517VH1-8	L
C33B1517VL1-16	A	C33B1517VH1-11	D
C33B1517VL1-22	R	C33B1517VH1-17	E
C33B1517VL1-24	Q	C33B1517VH1-33	A
C33B1517VL1-27	I	C33B1517VH1-60	Q
C33B1517VL1-35	V	C33B1517VH1-71	T
C33B1517VL1-49	H	C33B1517VH2-7	S
C33B1517VL1-66	K	C33B1517VH2-30	A
C33B1517VL1-69	W	C33B1517VH2-31	L
C33B1517VL1-71	S	C33B1517VH2-60	P
		C33B1517VH2-68	T
		C33B1517VH2-76	Q

JL6

ID клона	AA
C33B1522VL1-2	S
C33B1522VL1-3	Q
C33B1522VL1-4	V
C33B1522VL1-5	G
C33B1522VL1-7	W
C33B1522VL1-12	T
C33B1522VL1-15	I
C33B1522VL1-27	E
C33B1522VL1-29	A
C33B1522VL1-32	R
C33B1522VL1-47	L
C33B1522VL2-82	V
C33B1522VL2-1	A
C33B1522VL2-2	P
C33B1522VL2-8	L
C33B1522VL2-17	T