

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

- (43) Дата публикации заявки2023.11.29
- (22) Дата подачи заявки 2022.02.28

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

- (54) АНТИТЕЛА, СВЯЗЫВАЮЩИЕ CD123 И ГАММА-ДЕЛЬТА Т-КЛЕТОЧНЫЕ РЕПЕПТОРЫ
- (31) 21159698.6; 63/166,339; 63/274,709; 21211114.0
- (32) 2021.02.26; 2021.03.26; 2021.11.02; 2021.11.29
- (33) EP; US; US; EP
- (86) PCT/EP2022/054993
- (87) WO 2022/180271 2022.09.01
- (71) Заявитель: ЛАВА ТЕРАПЬЮТИКС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

Руверс Робертус Корнелис, Ван Дер Влит Йоханнес Йелле, Лютье Хюлсик Давид, Паррен Пол Уиллем Генри Ида, Рюбен Юрьен Маттейс, Мауссет Шарлотте Меретте (NL)

(74) Представитель:

Билык А.В., Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к антителам, способным связывать CD123 человека и способным связывать $V\delta 2$ -цепь человеческого $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеточного рецептора. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по изобретению, и к применению антител по изобретению для терапевтического лечения.

Антитела, связывающие CD123 и гамма-дельта Т-клеточные рецепторы

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к новым полиспецифическим антителам, способным связывать CD123 человека и способным связывать V δ 2-цепь человеческого V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора. Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела по изобретению, и к применению антител по изобретению для терапевтического лечения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

СD123, или альфа-цепь рецептора интерлейкина-3 (IL3), представляет собой мембранный белок, который передает сигналы с помощью IL3, цитокина, участвующего в образовании клеток крови. CD123 образует гетеродимер с общей бета-цепью CD131. CD123 обычно экспрессируется на некоторых типах клеток крови, таких как плазмацитоидные дендритные клетки или моноциты, а также субпопуляцией нормальных миелоидных клеток-предшественников. Однако CD123 сильно сверхэкспрессируется на лейкозных стволовых клетках пациентов с острым миелоидным лейкозом. Таким образом, CD123 является потенциальной терапевтической мишенью при некоторых гематологических злокачественных новообразованиях, включая острый миелолейкоз.

Описано несколько биспецифических антител, привлекающих и активирующих CD123-CD3 Т-клетки (Kuo et al. (2012) Protein Eng Des Set 10:561; Al-Hussaini et al. (2016) Blood 127:122). Биспецифические антитела, привлекающие и активирующие Т-клетки, обладают специфичностью связывания с опухолевой мишенью и специфичностью связывания Т-клеток и, таким образом, повышают эффективность путем перенаправления цитотоксичности Т-клеток на злокачественные клетки, см., например, Huehls et al. (2015) Immunol Cell Biol 93:290; Ellerman (2019) Methods, 154:102; de Bruin et al. (2017) Oncoimmunology 7(1):e1375641 и WO2015156673. Однако результаты существенно различаются. Например, в одном исследовании, в котором фрагмент, связывающий CD3, объединяли со связывающими фрагментами против 8 различных В-клеточных мишеней (CD20, CD22, CD24, CD37, CD70, CD79b, CD138 и HLA-DR), обнаружили, что биспецифические антитела, нацеленные на различные мишени опухоли, показали сильные различия в своей способности индуцировать цитотоксичность в отношении клетокмишеней, и что цитотоксичность не коррелировала с уровнями экспрессии антигена. Например, биспецифические антитела к CD3, нацеленные на HLA-DR или CD138, не были

способны индуцировать цитотоксичность, несмотря на средние и высокие уровни экспрессии HLA-DR и CD138 (Engelberts et al. (2020) Ebiomedicine 52:102625). Лишь немногие методы перенаправления Т-клеток достигли поздней стадии клинической разработки, возможно, из-за значительной токсичности, производственных проблем, иммуногенности, узких терапевтических окон и низкого ответа. В частности, токсичность может возникнуть, когда привлекающий Т-клеток активатор включает плечо, связывающее CD3, и может привести к неконтролируемой, чрезмерной активации иммунитета и высвобождению цитокинов.

Таким образом, несмотря на значительный прогресс, все еще существует потребность в новых антителах, нацеленных на CD123, которые являются терапевтически эффективными, но имеют приемлемую токсичность, а также стабильность и технологичность.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предлагает новые антитела для терапии на основе CD123. Были сконструированы биспецифические антитела, в которых однодоменные CD123-связывающие области были объединены со связывающими областями, способными связывать V δ 2-цепь человеческого V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора и, таким образом, рекрутировать $\gamma \delta$ Т-клетки. Удивительно, но биспецифические антитела оказались исключительно эффективными в обеспечении активации V γ 9V δ 2 Т-клеток и индукции уничтожения линий клеток, экспрессирующих CD123, а также опухолевых клеток, полученных от пациента, в присутствии V γ 9V δ 2 Т-клеток.

Соответственно, в первом аспекте изобретение относится к полиспецифическому антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область, способную связывать CD123 человека, и вторую антигенсвязывающую область, способную связывать V δ 2-цепь человеческого V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора.

В дополнительном основном аспекте изобретение предлагает антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, способную связывать CD123 человека, причем первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, содержащее:

(i) последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 4, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID

- NO:1, 25–34, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 25–34, или
- (ii) последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 12, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления изобретения описаны ниже.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: ELISA, показывающий связывание всех различных биспецифических VHH с CD123, TCR V γ 9V δ 2 (GDT) и BSA (в качестве отрицательного контроля). Приведены значения ОП; значения представляют собой средние значения повторяющихся измерений; планки погрешностей указывают стандартные ошибки среднего значения. Моновалентное VHH к V δ 2 использовали в качестве контроля окрашивания TCR («контроль TCR»), а коммерчески доступное антитело к CD123 («анти-CD123») использовали в качестве контроля для покрытия антигеном CD123. «Отсутствие AT» означает отрицательный контроль без первичного антитела.

Фиг. 2: Специфичность связывания биспецифического VHH с использованием проточной цитометрии. Среднее геометрическое сигнала флуоресценции представлено на графике в виде функции используемого антитела и типа клеток. VHH, распознающее EGFR, который эндогенно экспрессируется клетками 293F, было включено в качестве положительного контроля. Моновалентное VHH к Vδ2 использовали в качестве отрицательного контроля VHH.

Фиг. 3: Определение кажущейся аффинности связывания 1D2-5C8var1 с CD123 с помощью проточной цитометрии. Серию разведений очищенного 1D2-5C8var1 тестировали на связывание с клетками 293F, транзиентно экспрессирующими либо CD123, либо CD131, либо CD123 и -131. Среднее геометрическое значение интенсивности флуоресценции представлено на графике в виде функции концентрации используемого антитела. Значение

ЕС50 определяли путем аппроксимации кривой.

Фиг. 4: Репрезентативный анализ связывания 1D2-5C8var1 с CD123 на основе BLI. Изменение отражения света (измеренный в нм), которое является репрезентативным для связанной массы белка, изображен в виде функции времени. 0–300 секунд: фаза ассоциации; 300–900 секунд: фаза диссоциации.

Фиг. 5: Зависимая от клеток-мишеней C1R-neo 1D2-5C8var1-опосредованная активация Vγ9Vδ2 Т-клеток. Процент CD3+-Vγ9+ Т-клеток, демонстрирующих экспрессию CD107A (дегрануляция), представлен на графике в виде функции используемой концентрации антитела. Изображены эксперименты с использованием двух разных доноров.

Фиг. 6: 1D2-5C8var1-индуцированная цитотоксичность в отношении клеток-мишеней C1R-neo, опосредованная $V\gamma9V\delta2$ Т-клетками. Процент живых клеток-мишеней C1R-neo представлен на графике в виде функции концентрации используемого биспецифического VHH. Изображены данные, полученные для двух разных доноров $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток.

Фиг. 7: Индуцированная биспецифическим VHH цитотоксичность в отношении клеток-мишеней THP-1, опосредованная $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетками. Процент живых клеток-мишеней THP-1 представлен на графике в виде функции концентрации используемого биспецифического VHH.

Фиг. 8: Опосредованная биспецифическим VHH активация V γ 9V δ 2 Т-клеток и опосредованный биспецифическим VHH Т-клеточный лизис образца первичного AML, полученного от пациента. Верхняя панель: активация Т-клеток, измеренная по экспрессии CD107A. Нижняя панель: лизис бластов AML Т-клетками в сочетании с биспецифическим VHH.

Фиг. 9: Профиль HP-SEC очищенного биспецифического антитела к CD123 x V γ 9V δ 2 TCR 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc.

Фиг. 10: 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc индуцирует активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток. Показан иллюстративный эксперимент. Процент положительных по CD107a (ассоциированному с лизосомой белку-1 или LAMP-1) Vγ9Vδ2 клеток представлен в виде функции концентрации используемого соединения. Значения EC50 (в пМ, определенные путем аппроксимации кривой) изображены под графиком. Точки данных представляют собой средние значения для трех измерений; планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения.

Фиг. 11: 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc индуцировало лизис Т-клеток-мишеней. Показан иллюстративный эксперимент. На графике показан процент убитых клеток-мишеней после 24 часов совместного культивирования в зависимости от концентрации используемого соединения. Значения EC50 (в пМ, определенные путем аппроксимации кривой)

изображены под графиком. Точки данных представляют собой средние значения для трех измерений; планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения.

Фиг. 12: Уровни экспрессии CD123 на плазмоцитоидных дендритных клетках (верхняя панель) и на линии клеток THP-1 (нижняя панель). Показано типичное окрашивание. Изображены гистограммы, изображающие неокрашенные клетки, окрашивание изотипического контроля (перекрывающиеся гистограммы слева) и окрашивание на CD123 (пики справа). Количество событий (ось Y) показано в виде функции интенсивности флуоресценции (ось X).

Фиг. 13: 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc индуцирует преимущественное уничтожение клеток THP-1 по сравнению с pDC. Показан репрезентативный результат. Процент убитых клеток-мишеней показан в виде функции используемой концентрации соединения на популяцию клеток-мишеней (т. е. THP-1 или pDC). Значения EC50 (в пМ, определенные путем аппроксимации кривой) изображены под графиком. Точки данных представляют собой средние значения для трех измерений; планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения.

Фиг. 14: Первичная аминокислотная последовательность полноразмерного человеческого CD123 (номер доступа в GenBank NM_002183.4) (SEQ ID NO:23). Остатки, которые были обнаружены перекрестно связанными с антителом 1D2, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Выделенные курсивом остатки (по бокам обнаруженные реактивные остатки) также могут быть частью распознаваемого эпитопа.

Фиг. 15: Структурная модель CD123 (альфа-цепь рецептора IL-3: Broughton *et al.*, 2018 2018 Nat Commun. 9: 386); указаны остатки, которые были обнаружены поперечно связанными с антителом. Трансмембранная спираль будет расположена слева от фигуры.

Фиг. 16: Изменения, вызванные стрессом, определенные путем измерения агрегатов и фрагментов с помощью (A) эксклюзионной хроматографии, обнаруженной с помощью ультрафиолетового поглощения (SEC-UV) и (B) электрофореза в капиллярном геле в денатурирующих (SDS) условиях (CE-SDS) и после восстановления.

Фиг. 17: (А) Анализ дегрануляции через 4 часа путем измерения процентного содержания положительных по CD107a (ассоциированному с лизосомой белку-1 или LAMP-1) клеток с помощью проточной цитометрии. (В) Активацию Т-клеток анализируют путем измерения процента CD25-положительных клеток. (С) цитотоксичность анализируют путем определения процентного содержания живых клеток-мишеней через 24 часа с помощью проточной цитометрии.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

В контексте данного документа термин «CD123 человека» относится к человеческому белку CD123, также называемому альфа-цепью рецептора интерлейкина-3 (номер доступа GenBank NM_002183.4, эталонная последовательность NCBI: NP_002174.1). Последовательность CD123 человека представлена в SEQ ID NO:23. Рецептор IL3 представляет собой гетеродимер CD123 с CD131, общей бета-цепью (эталонная последовательность NCBI: NP_000386.1). CD131 указан в SEQ ID NO:24.

В контексте данного документа термин «V δ 2 человека» относится к реаранжированной δ 2-цепи V γ 9V δ 2-Т-клеточного рецептора (TCR) (SEQ ID NO:48). В UniProtKB — A0JD36 (A0JD36_HUMAN) приводится пример вариабельной последовательности TRDV2.

В контексте данного документа термин «Vγ9 человека» относится к реаранжированной у9-цепи Vγ9Vδ2-Т-клеточного рецептора (TCR). В UniProtKB – Q99603 HUMAN приводится пример вариабельной последовательности TRGV9.

Термин «антитело» предназначен для обозначения молекулы иммуноглобулина, фрагмента молекулы иммуноглобулина или производного любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях с периодом полужизни в течение значительного времени, например, по меньшей мере около 30 минут, по меньшей мере около одного часа, по меньшей мере около двух часов, по меньшей мере около 8 часов, по меньшей мере около 12 часов, около 24 часов или более, около 48 часов или более, около 3, 4, 5, 6, 7 или более дней и т. д. или любого другого соответствующего функционально определенного периода (например, достаточного для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, связанного со связыванием антитела с антигеном, и/или времени, достаточного для проявления антителом эффекторной активности). Антигенсвязывающие области, которые взаимодействуют с антигеном, могут включать вариабельные области как тяжелой, так и легкой цепей молекулы иммуноглобулина или могут содержать или состоять из однодоменных антигенсвязывающих областей, например, только вариабельной области тяжелой цепи. Константные области антитела, если они присутствуют, могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки и Т-клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации комплемента. Однако в некоторых вариантах осуществления область Fc антитела была модифицирована, чтобы стать инертной, «инертная» означает область Fc, которая, по меньшей мере, не способна связывать какие-либо Fcγ-рецепторы, индуцировать Fc-опосредованное перекрестное сшивание FcR или индуцировать FcR-опосредованное перекрестное сшивание целевых антигенов через две области Fc отдельных антител. В дополнительном варианте осуществления инертная область Fc, кроме того, не способна связывать C1q. В одном варианте осуществления антитело содержит мутации в положениях 234 и 235 (Canfield and Morrison (1991) J Exp Med 173:1483), например мутация Leu в Phe в положении 234 и мутация Leu в Glu в положении 235 (в соответствии с нумерацией EU, см. ниже). В еще одном варианте осуществления антитело содержит мутацию Leu на Ala в положении 234, мутацию Leu на Ala в положении 235 и мутацию Pro на Gly в положении 329. В еще одном варианте осуществления антитело содержит мутацию Leu на Phe в положении 234, мутацию Leu на Glu в положении 235 и мутацию Asp на Ala в положении 265.

Область Fc иммуноглобулина определяется как фрагмент антитела, который, как правило, образуется после расщепления антитела папаином и включает в себя две области CH2-CH3 иммуноглобулина и соединяющую область, например шарнирную область. Константный домен тяжелой цепи антитела определяет изотип антитела, например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM, IgD или IgE. Область Fc опосредует эффекторные функции антител с рецепторами клеточной поверхности, называемыми Fc-рецепторами, и белками системы комплемента.

В контексте данного документа термин «шарнирная область» предназначен для обозначения шарнирной области тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, шарнирная область человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 216–230 согласно нумерации EU.

В контексте данного документа термин «область CH2» или «домен CH2» предназначен для обозначения области CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область CH2 человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 231–340 согласно нумерации EU. Однако область CH2 также может относиться к любому из других подтипов, как описано в данном документе.

В контексте данного документа термин «область СНЗ» или «домен СНЗ» предназначен для обозначения области СНЗ тяжелой цепи иммуноглобулина. Так, например, область СНЗ человеческого антитела IgG1 соответствует аминокислотам 341-447 согласно нумерации EU. Однако область СНЗ также может относиться к любому из других подтипов, как описано в данном документе.

Ссылки на положения аминокислот в области Fc/домене Fc в настоящем изобретении соответствуют нумерации EU (Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91–3242).

Как указано выше, в контексте данного документа термин «антитело», если не указано иное или явно не противоречит контексту, включает фрагменты антитела, которые способность специфически Было сохраняют связываться \mathbf{c} антигеном. продемонстрировано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться антитела. Примеры фрагментами полноразмерного связывающих охватываемых термином «антитело», включают (i) фрагмент Fab' или Fab, т. е. моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1, или моновалентное антитело, как описано в WO2007059782; (ii) фрагменты F(ab')2, т. е. двухвалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий по существу из доменов VH и CH1; и (iv) фрагмент Fv, состоящий по существу из доменов VL и VH одного плеча антитела. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных методов синтетическим линкером, который позволяет создавать из них единую белковую цепь, в которой области VL и VH соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), см., например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) and Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела включены в термин «антитело», если иное не указано в контексте. Термин «антитело», если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (мкАт), химерные антитела и гуманизированные антитела, а также фрагменты антител, полученные любым известным методом, таким как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы.

В некоторых вариантах осуществления антител по изобретению первая антигенсвязывающая область или вторая антигенсвязывающая область, или обе, представляют собой однодоменное антитело. Однодоменные антитела (sdAb, также называемые Nanobody® или VHH) хорошо известны специалисту в данной области техники, см., например, Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446, Roovers et al. (2007) Curr Opin Mol Ther 9:327 and Krah et al. (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38:21. Однодоменные антитела содержат одну CDR1, одну CDR2 и одну CDR3. Примерами однодоменных антител являются вариабельные фрагменты антител, содержащих только

тяжелые цепи, антитела, которые в природе не содержат легких цепей, однодоменные антитела, полученные из обычных антител, и сконструированные антитела. Однодоменные антитела могут быть получены от любого вида, включая мышь, человека, верблюда, ламу, акулу, козу, кролика и корову. Например, природные молекулы VHH могут быть получены из антител, вырабатываемых у представителей вида Camelidae, например, у верблюда, одногорбого верблюда, ламы, альпаки и гуанако. Как и целое антитело, однодоменное антитело способно селективно связываться со специфическим антигеном. Однодоменные антитела могут содержать только вариабельный домен цепи иммуноглобулина, т. е. CDR1, CDR2 и CDR3, и каркасные области.

В контексте данного документа термин «иммуноглобулин» предназначен для обозначения класса структурно родственных гликопротеинов, как правило, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре потенциально соединены между собой дисульфидными связями, хотя некоторые виды млекопитающих не производят легкую цепь, а производят только антитела, содержащие только тяжелые цепи. В контексте данного документа термины «тяжелая цепь иммуноглобулина», «тяжелая цепь из иммуноглобулина» или «тяжелая цепь» предназначены для обозначения одной из цепей иммуноглобулина. Тяжелая цепь, как правило, состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как СН), которая определяет изотип иммуноглобулина. Константная область тяжелой цепи, как правило, состоит из трех доменов: СН1, СН2 и СН3. Константная область тяжелой цепи дополнительно содержит шарнирную область. В структуре иммуноглобулина (например, IgG) две тяжелые цепи соединены между собой дисульфидными связями в шарнирной области. Как и тяжелые цепи, каждая легкая цепь, как правило, состоит из нескольких областей; вариабельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Кроме того, области VH и VL могут быть подразделены на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образовывать структурно определенные петли), также называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающимися с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Последовательности CDR могут быть определены с использованием различных методов, например, методов, предложенных в Choitia and Lesk

(1987) J. Mol. Biol. 196:901 или Kabat et al. (1991) Sequence of protein of immunological interest, fifth edition. NIH publication. Различные способы определения CDR и нумерации аминокислот можно сравнить на сайте www.abysis.org (UCL).

В контексте данного документа термин «изотип» относится к (под)классу иммуноглобулина (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM) или любому его аллотипу, такому как IgG1m(za) и IgG1m(f), который кодируется генами константной области тяжелой цепи. Каждый изотип тяжелой цепи можно комбинировать с легкой цепью каппа (к) или лямбда (λ). Антитело по изобретению может иметь любой изотип.

Термин «исходное антитело» следует понимать как антитело, которое идентично антителу по изобретению, но при этом исходное антитело не имеет одну или более указанных мутаций. «Вариант» или «вариант антитела» или «вариант исходного антитела» по настоящему изобретению представляет собой молекулу антитела, которая содержит одну или более мутаций по сравнению с «исходным антителом». Аминокислотные замены могут заменять нативную аминокислоту на другую аминокислоту природного происхождения или на производное аминокислоты неприродного происхождения. Аминокислотная замена может быть консервативной или неконсервативной. В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут определяться заменами внутри классов аминокислот, отраженных в одной или более из следующих трех таблиц:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислотные остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R), и His (H)
Гидрофильные незаряженные	Ser (S), Thr (T), Asn (N), и
остатки	Gln (Q)
Алифатические незаряженные	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), и
остатки	Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M), и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y), и Trp (W)

Альтернативные консервативные классы замены аминокислотных остатков

1	A	S	Т
2	D	Е	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

Альтернативные физические и функциональные классификации аминокислотных остатков

Остатки, содержащие спиртовые	SиT	
группы		
Алифатические остатки	I, L, V и M	
Циклоалкенил-ассоциированные	F, H, W и Y	
остатки		
Гидрофобные остатки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W и Y	
Отрицательно заряженные остатки	DиE	
Полярные остатки	С, D, E, H, K, N, Q, R, S и Т	
Положительно заряженные остатки	Н, К и R	
Небольшие остатки	A, C, D, G, N, P, S, T и V	
Очень маленькие остатки	А, G и S	
Остатки, участвующие в	А, С, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, РиТ	
формировании изгиба		
Гибкие остатки	Q, T, K, S, G, N, D, E и R	

В контексте настоящего изобретения замена в варианте обозначается как:

Исходная аминокислота – положение – замещенная аминокислота;

Используют трехбуквенный код или однобуквенный код, включая коды Хаа и Х для обозначения аминокислотного остатка. Соответственно, обозначение «Т366W» означает, что вариант включает замену треонина на триптофан в аминокислотном положении варианта, соответствующем аминокислоте в положении 366 в исходном антителе.

Кроме того, термин «замена» включает замену на любую из девятнадцати других природных аминокислот или на другие аминокислоты, такие как неприродные аминокислоты. Например, замена аминокислоты Т в положении 366 включает каждую из следующих замен: 366A, 366C, 366D, 366G, 366H, 366F, 366I, 366K, 366L, 366M, 366N, 366P, 366Q, 366R, 366S, 366E, 366V, 366W, и 366Y.

В контексте данного документа термин «полноразмерное антитело» относится к антителу, которое содержит все константные и вариабельные домены тяжелой и легкой цепи, соответствующие тем, которые, как правило, обнаруживаются в антителе дикого типа этого изотипа.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором вариабельная область получена из организма вида, отличного от человека (например, полученного от грызунов), а константная область получена из организма другого вида, такого как человек. Химерные

антитела могут быть получены с помощью генной инженерии. Химерные моноклональные антитела для терапевтического применения разрабатываются для снижения иммуногенности антител.

Термин «гуманизированное антитело» относится к генетически сконструированному нечеловеческому антителу, которое содержит константные домены человеческого антитела и нечеловеческие вариабельные домены, модифицированные так, чтобы иметь высокий уровень гомологии последовательности с человеческими вариабельными доменами. Этого можно достичь путем трансплантации шести определяющих комплементарность областей (CDR) нечеловеческого антитела, которые вместе образуют антигенсвязывающий сайт, в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность исходного антитела, может быть необходима замена остатков каркасной области из исходного антитела (т. е. нечеловеческого антитела) на человеческие каркасные области (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать нечеловеческие последовательности CDR, преимущественно человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или более аминокислотных обратных мутаций на нечеловеческую аминокислотную последовательность, и, необязательно, полностью человеческие константные области. Необязательно, могут быть введены дополнительные аминокислотные модификации, которые обязательно являются обратными мутациями, чтобы получить гуманизированное антитело с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность биохимические свойства. Гуманизацию терапевтических антител нечеловеческого происхождения проводят для минимизации их иммуногенности у человека, в то время как такие гуманизированные антитела в то же время сохраняют специфичность и аффинность связывания антитела нечеловеческого происхождения.

Термин «полиспецифическое антитело» относится к антителу, обладающему специфичностью по меньшей мере к двум различным, таким как по меньшей мере трем, как правило, неперекрывающимся, эпитопам, благодаря наличию двух или более антигенсвязывающих областей. Такие эпитопы могут находиться на одном или разных антигенах-мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут находиться в одной и той же клетке или в разных клетках или типах клеток.

Термин «биспецифическое антитело» относится к антителу, обладающему специфичностью к двум различным, как правило, неперекрывающимся эпитопам,

благодаря наличию двух антигенсвязывающих областей. Такие эпитопы могут находиться на одной или разных мишенях. Если эпитопы находятся на разных мишенях, такие мишени могут находиться в одной и той же клетке или в разных клетках или типах клеток.

Примеры различных классов биспецифических антител включают, помимо прочего, (i) IgG-подобные молекулы с комплементарными доменами СН3 для ускорения гетеродимеризации; (ii) рекомбинантные IgG-подобные молекулы двойного нацеливания, в которых каждая из двух сторон молекулы содержит фрагмент Fab или часть фрагмента Fab по меньшей мере двух разных антител; (iii) слитые молекулы IgG, в которых полноразмерные антитела IgG слиты с дополнительным фрагментом Fab или частями фрагмента Fab; (iv) слитые молекулы Fc, в которых одноцепочечные молекулы Fv или стабилизированные диатела слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; (v) слитые молекулы Fab, в которых различные фрагменты Fab слиты вместе, слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями; и (vi) антитела на основе scFv и диател и антитела, содержащие только тяжелые цепи, (например, доменные антитела, Nanobodies®), в которых разные одноцепочечные молекулы Fv или разные диатела или разные антитела, содержащие только тяжелые цепи, (например, доменные антитела, Nanobodies®) слиты друг с другом или с другим белком или молекулойносителем, которые слиты с константными доменами тяжелой цепи, областями Fc или их частями.

Примеры IgG-подобных молекул с комплементарными молекулами доменов СН3 включают, помимо прочего, Triomab® (Trion Pharma/Fresenius Biotech), «выступы-вовпадины» (Genentech), CrossMAb (Roche) и электростатически спариваемые конструкции (Amgen, Чугай, Oncomed), LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52): 43331-9, doi: 10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1), DIG-тело и PIG-тело (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202), сконструированное посредством обмена цепей доменное антитело (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonics (Merus, WO2013157953), Fc Adp (Regeneron), биспецифические IgG1 И IgG2 (Pfizer/Rinat), каркас Azymetric (Zymeworks/Merck,), mAb-Fv (Xencor), двухвалентные биспецифические антитела (Roche, WO2009080254) и молекулы DuoBody® (Genmab).

Примеры рекомбинантных IgG-подобных молекул с двойным нацеливанием включают, помимо прочего, Ig с двойным нацеливанием (DT) (GSK/Domantis, WO2009058383), антитело «два в одном» (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610–1614), сшитые мкАт (Онкологический центр Карманос), mAb2 (F-Star), ZybodyTM (Zyngenia, LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr;5(2):208-18), подходы с общей легкой цепью, кλ-тела

(NovImmune, WO2012023053) и CovX-тело® (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17,501–506).

Примеры слитых молекул IgG включают, помимо прочего, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig (Abbott), двухголовчатые антитела с двойным доменом (Unilever; Sanofi Aventis), IgG-подобные биспецифические молекулы (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8), Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30;393(3):672-92) и бсАт (Zymogenetics, WO2010111625), HERCULES (Biogen Idec), scFv-слитую молекулу (Novartis), scFv-слитую молекулу (Changzhou Adam Biotech Inc) и TvAb (Roche).

Примеры Fc-слитых молекул включают, помимо прочего, слитые молекулы scFv/Fc (Academic Institution, Pearce et al Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep;42(6):1179), SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract #5465); Zymogenetics/BMS, WO2010111625), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (Fc-DARTTM) (MacroGenics) и двойной (ScFv)2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine – Китай).

Примеры биспецифических антител слияния Fab включают, помимо прочего, F(ab)2 (Medarex/AMGEN), Fab двойного действия или бис-Fab (Genentech), DOCK-AND-LOCK® (DNL) (ImmunoMedics), двухвалентные биспецифические агенты (Biotecnol) и Fab-Fv (UCB-Celltech).

Примеры антител на основе scFv, диател и доменных антител включают, помимо прочего, привлекающий биспецифический активатор Т-клеток (BiTE®) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed), перенацеливающиеся антитела с двойной аффинностью (DARTTM) (MacroGenics), одноцепочечное диатело (Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3;425(3):479-84), TCR-подобные антитела (AIT, ReceptorLogics), гибриды ScFv и человеческого сывороточного альбумина (Merrimack, WO2010059315) и молекулы COMBODY (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug;88(6):667-75), наноантитела с двойным нацеливанием ® (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010), доменные антитела с двойным нацеливанием, содержащие только тяжелые цепи. В некоторых вариантах осуществления полиспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет формат VHH-Fc, т. е. антитело содержит две или более однодоменные антигенсвязывающие области, которые связаны друг с другом через димер области Fc человека. В этом формате каждая однодоменная антигенсвязывающая область слита с полипептидом области Fc, и два слитых полипептида образуют димерное биспецифическое антитело через дисульфидные мостики в шарнирной области. Такие конструкции, как правило, не содержат полные или

какие-либо последовательности СН1 или легкой цепи. На Фиг. 12В в WO 06064136 показан пример этого варианта осуществления.

В контексте связывания антитела с антигеном термины «связывается» или «специфически связывается» относятся к связыванию антитела с заранее определенным антигеном или мишенью (например, CD123 человека или $V\delta 2$), с которым связывание, как правило, происходит с аффинностью, соответствующей K_D около 10⁻⁶ М или менее, например 10^{-7} М или менее, например, около 10^{-8} М или менее, например, около 10^{-9} М или менее, около 10^{-10} M или менее, или около 10^{-11} M или даже меньше, например при определении с помощью проточной цитометрии, как описано в приведенных в данном документе Примерах. Альтернативно, значения K_D можно определить, используя, например, технологию поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в BIAcore T200 или биослойную интерферометрию (BLI) в приборе Octet RED96, используя антиген в качестве лиганда и связывающий фрагмент или связывающую молекулу в качестве аналита. Специфическое связывание означает, что антитело связывается с заранее определенным антигеном со аффинностью, соответствующей Кр, которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, по меньшей мере в 100 раз ниже, например, по меньшей мере в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере в 10000 раз ниже, например, по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем его аффинность в отношении связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), отличным от заданного антигена или близкородственного антигена. Степень снижения аффинности зависит от KD связывающего фрагмента или связывающей молекулы, так что если K_D связывающего фрагмента или связывающей молекулы очень низкая (т. е. связывающий фрагмент или связывающая молекула высокоспецифична), то степень снижения аффинности к антигену по сравнению с аффинностью к неспецифическому антигену может быть не менее 10000 раз. В контексте данного документа термин «K_D» (M) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия между антигеном и связывающим фрагментом или связывающей молекулой.

В контексте настоящего изобретения термины «конкуренция» или «способность конкурировать» или «конкурировать» относятся к любому заметно значительному снижению склонности конкретной связывающей молекулы (например, антитела к CD123) связываться с конкретным партнером по связыванию (например, CD123) в присутствии другой молекулы (например, другого антитела к CD123), которая связывает партнера по связыванию. Как правило, конкуренция означает снижение на по меньшей мере около 25 процентов, например, по меньшей мере около 50 процентов, например, по меньшей мере

около 75 процентов, например, снижение на по меньшей мере 90 процентов связывания, вызванное присутствием другой молекулы, такой как антитело, что определяется, например, анализом на основе ELISA или проточной цитометрией с использованием достаточных количеств двух или более конкурирующих молекул, например, антител. Дополнительные способы определения специфичности связывания путем конкурентного ингибирования можно найти, например, в Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N. Y., (1992, 1993), и Muller, Meth. Enzymol. 92, 589-601 (1983)). В одном варианте антитело по настоящему изобретению связывается с тем же эпитопом на CD123, что и антитело 1D2 или 1A3, и/или с тем же эпитопом на V82, что и антитело 5С8, 6Н4, 6С1, 5D3 (WO2015156673) или 5С8var1 (WO2020060405). Было определено, что эпитоп 5C8 включает остатки S33, S43 и K45 (SEQ ID NO:48). Было определено, что эпитоп 6H4 включает остатки R139, K152, S189 и S191 (SEQ ID NO:48). Существует несколько способов, доступных для картирования эпитопов антител на антигенах-мишенях, известных в данной области техники, включая, помимо прочего: масс-спектрометрию со сшивкой, позволяющую идентифицировать пептиды, которые рентгеновскую кристаллографию, являются частью эпитопа, И идентифицирующую отдельные остатки на антигене, которые образуют эпитоп. Эпитопные остатки могут быть определены как все аминокислотные остатки, у которых по меньшей мере один атом находится на расстоянии менее или равном 5 Å от антитела. Расстояние 5 Å было выбрано в качестве предельного расстояния от эпитопа, чтобы учесть атомы в пределах ван-дер-ваальсова радиуса и возможную водородную связь, опосредованную водой. Далее остатки эпитопа могут быть определены как все аминокислотные остатки, у которых по меньшей мере один атом находится на расстоянии меньше или равном 8 Å. В качестве предельного расстояния эпитопа выбрано менее или равное 8 Å, чтобы учесть длину удлиненной аминокислоты аргинина. Масс-спектрометрия со сшивкой начинается со связывания антитела и антигена с помощью химического сшивателя, меченного с помощью массовой метки. Затем наличие комплекса подтверждается с помощью обнаружения высокомолекулярных молекул методом МАЛДИ. Поскольку после химического сшивания комплекс Ат/Аг чрезвычайно стабилен, к комплексу можно применять множество различных ферментов и условий расщепления для получения множества различных перекрывающихся пептидов. Идентификацию этих пептидов проводят с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения и методов МС/МС. Идентификацию сшитых пептидов определяют с использованием массовой метки, связанной с сшивающими

реагентами. После фрагментации MC/MC и анализа данных сшитые пептиды, полученные из антигена, являются частью эпитопа, тогда как пептиды, полученные из антитела, являются частью паратопа. Все остатки между наиболее N- и C-концевыми сшитыми остатками отдельных обнаруженных сшитых пептидов считаются частью эпитопа или паратопа.

В контексте данного документа термины «первая» и «вторая» антигенсвязывающие области не относятся к их ориентации/положению в антителе, т. е. они не имеют никакого значения в отношении N- или C-конца. Термины «первая» и «вторая» служат только для правильного и последовательного обозначения двух разных антигенсвязывающих областей в формуле изобретения и описании.

«Способно связывать CD123 человека» означает, что антитело может связывать CD123 человека как отдельную молекулу и/или как часть комплекса CD123/CD131. Однако антитело не будет связывать CD131 как отдельную молекулу.

«Способно связывать V δ 2-цепь V γ 9V δ 2-TCR» означает, что антитело может связывать V δ 2-цепь как отдельную молекулу и/или как часть V γ 9V δ 2-TCR. Однако антитело не будет связывать V γ 9-цепь как отдельную молекулу.

В контексте данного документа «% идентичности последовательностей» относится к количеству идентичных положений нуклеотидов или аминокислот, общих для разных последовательностей (т. е. % идентичности = количество идентичных положений/общее количество положений х 100), принимая во внимание количество гэпов и длину каждого гэпа, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания. Процент идентичности двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может, например, определяться с помощью алгоритма, описанного в Е. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Віоsсі 4, 11-17 (1988), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продолжение гэпа 12 и штрафа за гэп 4.

Дополнительные аспекты и варианты осуществления изобретения

Как описано выше в первом главном аспекте изобретение относится к полиспецифическому антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область, способную связывать CD123 человека, и вторую антигенсвязывающую область, способную связывать $V\delta2$ -цепь человеческого $V\gamma9V\delta2$ Т-клеточного рецептора.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело. В еще одном варианте осуществления полиспецифическое

антитело представляет собой триспецифическое антитело. В другом варианте осуществления первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, например, однодоменное антитело, которое состоит из вариабельной области тяжелой цепи. В другом варианте осуществления вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, например, однодоменное антитело, которое состоит из вариабельной области тяжелой цепи. В дополнительном варианте осуществления как первая антигенсвязывающая область, так и вторая антигенсвязывающая область представляют собой однодоменные антитела, например однодоменные антитела, каждое из которых состоит из вариабельной области тяжелой цепи.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, где первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, а вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело. Указанное биспецифическое антитело может необязательно содержать дополнительные последовательности, такие как линкер и/или область Fc иммуноглобулина.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело конкурирует (т. е. способно конкурировать) за связывание с CD123 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, предпочтительно где полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на CD123 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:1. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с эпитопом, содержащим один или более остатков в области от S203 до R273, таким как эпитоп, который полностью расположен в области от S203 до R273, определенный, как описано в Примере 11 в данном документе.

В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с эпитопом CD123 человека, который содержит один или более остатков в области от S203 до T214 и один или более остатков в области от H221 до K227 и один или более остатков в области от Y238 до K244 и один или более остатков в области от Y268 до R273 (Фиг. 14).

В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с эпитопом CD123 человека, который содержит один или более остатков S203, T209, T214, H221, H225, K227, Y238, K244, Y268, T269 и R273 (Фиг. 14).

В одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:4.

В одном варианте осуществления в SEQ ID NO:2 X₁ представляет собой G. В еще

одном варианте осуществления X₁ представляет собой S.

В одном варианте осуществления в SEQ ID NO:3 X_2 представляет собой A. В еще одном варианте осуществления X_2 представляет собой T.

В одном варианте осуществления в SEQ ID NO:4 X_3 представляет собой Y. В еще одном варианте осуществления X_3 представляет собой F.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой G, X_2 представляет собой A и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $G,\ X_2$ представляет собой A и X_3 представляет собой F.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $G,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $G,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой F.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой S, X_2 представляет собой A и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $S,\ X_2$ представляет собой A и X_3 представляет собой F.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $S,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $S,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой F.

В одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:1.

В еще одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 25–34, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 25–34.

В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело конкурирует за

связывание с CD123 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:9, предпочтительно при этом полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на CD123 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:9.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с эпитопом, содержащим один или более остатков в области от H225 до T267, таким как эпитоп, который полностью расположен в области от H225 до T267, определенный, как описано в Примере 11 в данном документе.

В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с эпитопом CD123 человека, который содержит один или более остатков в области H225 и R234 и один или более остатков в области от T251 до T267.

В еще одном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с эпитопом CD123 человека, который содержит один или более остатков H225, H231, R234, T251, R255 и T267.

В одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:12.

В одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9.

Как описано выше, полиспецифическое антитело по изобретению содержит вторую антигенсвязывающую область, способную связывать Vδ2-цепь человеческого Vγ9Vδ2-Тклеточного рецептора. Vδ2 является частью дельта-цепи Vγ9Vδ2-TCR. Антитело, способное связываться с Vδ2 человека, может связывать эпитоп, который полностью расположен в пределах области Vδ2, или связывать эпитоп, который представляет собой комбинацию остатков в области Vδ2 и константной области дельта-цепи. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело способно активировать человеческие Vγ9Vδ2 Т-клетки. Активацию Vγ9Vδ2 Т-клеток может быть определена по профилям экспрессии генов и/или экспрессии (поверхностных) маркеров (например, маркеров активации, таких как CD25, CD69 или CD107а) и/или профилям секреторных белков (например, цитокинов или хемокинов). В предпочтительном варианте осуществления полиспецифическое антитело способно индуцировать активацию (например, усиление экспрессии CD69 и/или

СD25), приводящую к дегрануляции, характеризующейся повышением экспрессии CD107а (см. примеры в данном документе) и/или продукции цитокинов (например, TNFα, IFNγ) Vγ9Vδ2 Т-клетками. Предпочтительно полиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно увеличивать количество клеток, положительных по CD107а, по меньшей мере в 2 раза, например, по меньшей мере в 5 раз, при тестировании, как описано в примерах в данном документе. В еще одном предпочтительном варианте осуществления полиспецифическое антитело по изобретению имеет значение EC50 для увеличения процентного содержания CD107a-положительных клеток 50 пМ или менее, например, 25 пМ или менее, например, 20 пМ или менее, например 15 пМ или менее, например 10 пМ или менее при тестировании с использованием Vγ9Vδ2 T-клеток и клеток-мишеней C1r-пео, как описано в данном документе в примерах.

Несколько антител, которые связываются с $V\delta2$, описаны в WO2015156673, и их антигенсвязывающие области или, по меньшей мере, их последовательности CDR могут быть включены в полиспецифическое антитело по изобретению.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta 2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, где X_4 представляет собой Y.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом $V\delta 2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:17.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta 2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, предпочтительно полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на $V\delta 2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:36.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta 2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, предпочтительно полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на $V\delta 2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:37.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, предпочтительно полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на $V\delta2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:38.

В одном варианте осуществления полиспецифического антитела по изобретению вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 20. В одном варианте осуществления X_4 в SEQ ID NO:20 представляет собой Y. В еще одном варианте осуществления X_4 в SEQ ID NO:20 представляет собой F. В еще одном варианте осуществления X_4 в SEQ ID NO:20 представляет собой S.

В одном варианте осуществления полиспецифического антитела по изобретению вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 40, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 41, предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:36,

В одном варианте осуществления полиспецифического антитела по изобретению вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 42, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 43, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 44, предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 37, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:37,

В одном варианте осуществления полиспецифического антитела по изобретению вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 45, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 46, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 47, предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 38, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:38.

В одном варианте осуществления полиспецифического антитела по изобретению вторая антигенсвязывающая область гуманизирована.

В дополнительном варианте осуществления вторая антигенсвязывающая область

содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:17. В одном варианте осуществления X₄ в SEQ ID NO:17 представляет собой Y. В еще одном варианте осуществления X₄ в SEQ ID NO:17 представляет собой F. В еще одном варианте осуществления X₄ в SEQ ID NO:17 представляет собой S.

- В предпочтительном варианте осуществления полиспецифического антитела по изобретению
- (i) первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:4, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 20, или
- (ii) первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 12, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:20.
- В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления полиспецифического антитела по изобретению
- (i) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (ii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (iii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:25, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из

- последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X_4 представляет собой Y, или
- (iv) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (v) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (vi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:28, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (vii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:29, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (viii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (ix) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:31, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (x) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:32, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или
- (хі) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:33, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y, или

- (хіі) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:34, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где необязательно X₄ представляет собой Y.
- В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления полиспецифического антитела по изобретению
- (i) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (ii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (iii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:25, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (iv) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (v) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (vi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:28, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (vii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:29, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (viii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (ix) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:31, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (х) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности,

- указанной в SEQ ID NO:32, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (xi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:33, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36, или
- (хіі) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:34, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:36.
- В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления полиспецифического антитела по изобретению
- (i) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (ii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (iii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:25, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (iv) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (v) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (vi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:28, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (vii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:29, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (viii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из

последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или

- (ix) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:31, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (x) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:32, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (xi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:33, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37, или
- (xii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:34, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:37.
- В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления полиспецифического антитела по изобретению
- (i) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:1, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (ii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (iii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:25, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (iv) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:26, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (v) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:27, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (vi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:28, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или

- (vii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:29, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (viii) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:30, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (ix) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:31, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (x) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:32, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (xi) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:33, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38, или
- (хіі) первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:34, а вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO:38.

Первая и вторая антигенсвязывающие области в полиспецифическом антителе могут быть расположены различными способами. В одном варианте антигенсвязывающие области соединены друг с другом посредством линкера, такого как ковалентный линкер. В одном варианте осуществления первая антигенсвязывающая область и вторая антигенсвязывающая область ковалентно связаны друг с другом через пептидный линкер, например, линкер, имеющий длину от 1 до 20 аминокислот, например, от 1 до 10 аминокислот, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 10 аминокислот. В одном варианте осуществления пептидный линкер содержит или состоит из последовательности из 4 глицинов, за которой следует серин.

В некоторых вариантах осуществления первая антигенсвязывающая область, способная связывать СD123 человека, расположена на N-конце второй антигенсвязывающей области, способной связывать человеческую V δ 2-цепь. В другом варианте осуществления первая антигенсвязывающая область, способная связывать CD123 человека, расположена на C-конце второй антигенсвязывающей области, способной связывать человеческую V δ 2-цепь.

Полиспецифические антитела по изобретению, такие как биспецифические антитела, могут содержать дополнительные молекулы, домены или полипептидные последовательности за пределами первой и второй антигенсвязывающих областей. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело дополнительно содержит домен продления периода полужизни, т. е. домен, который продлевает период полужизни молекул в системе кровообращения пациента-человека. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело имеет конечный период полужизни, который превышает примерно 168 часов при введении человеку. Наиболее предпочтительно конечный период полужизни составляет 336 часов или более. «Конечный период полужизни» антитела при использовании в данном документе относится к времени, необходимому для снижения концентрации полипептида в сыворотке на 50% in vivo в конечной фазе элиминации.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело содержит область Fc, предпочтительно область Fc человека. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело имеет формат VHH-Fc, т. е. антитело содержит две или более однодоменные антигенсвязывающие области, которые связаны друг с другом посредством димера человеческой области Fc, где каждая однодоменная антигенсвязывающая область слита с полипептидом области Fc (без последовательностей CH1 или легкой цепи), и два слитых полипептида образуют димерное биспецифическое антитело через дисульфидные мостики в шарнирной области.

В данной области техники описаны различные способы получения биспецифических антител, например, описанные в работах Brinkmann and Kontermann (2017) MAbs 9:182 и Labrijn et al (2019) Nature Reviews Drug Discovery 18: 585. В одном варианте осуществления настоящего изобретения область Гс представляет собой гетеродимер, содержащий два полипентида Fc, при этом первая антигенсвязывающая область слита с первым полипептидом Fc, а вторая антигенсвязывающая область слита со вторым полипептидом Fc, и при этом первый и второй полипептиды Гс содержат асимметричные аминокислотные мутации, которые способствуют образованию гетеродимеров по сравнению с образованием гомодимеров (см., например, Ridgway et al. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617). В дополнительном области СН3 осуществления полипептидов Гс содержат варианте указанные асимметричные аминокислотные мутации, предпочтительно первый полипептид Fc содержит замену Т366W, а второй полипептид Fc содержит замены Т366S, L368A и Y407V, или наоборот, причем положения аминокислот соответствуют человеческому IgG1 в соответствии с системой нумерации EU. В дополнительном варианте осуществления

цистеиновые остатки в положении 220 в первом и втором полипептидах Fc удалены или заменены, при этом аминокислотное положение соответствует человеческому IgG1 согласно системе нумерации EU. В дополнительном варианте осуществления указанная область содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:35.

В некоторых вариантах осуществления первый и/или второй полипептиды Fc содержат мутации, которые делают область Fc инертной, т. е. неспособной опосредовать эффекторные функции. В одном варианте осуществления первый и второй полипептиды Fc содержат мутацию в положении 234 и/или 235, предпочтительно первый и второй полипептид Fc содержат замену L234F и L235E, причем положения аминокислот соответствуют человеческому IgG1 в соответствии с системой нумерации EU.

В предпочтительном варианте осуществления

- первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:4, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 20, и
- первый полипептид Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, а второй полипептид Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или наоборот.

В еще одном предпочтительном варианте осуществления

- первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:12, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 20, и
- первый полипептид Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:21, а второй полипептид Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO:22, или наоборот.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело по изобретению состоит из:

(i) первой полипептидной цепи, состоящей из: первой антигенсвязывающей области, состоящей из последовательности, выбранной из группы, состоящей из

последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1, 9 и 25–34, последовательности, указанной в SEQ ID NO:35, и последовательности, указанной в SEQ ID NO:21, и

(i) второй полипептидной цепи, состоящей из: второй антигенсвязывающей области, состоящей из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 17, где X₄ представляет собой Y, последовательности, указанной в SEQ ID NO: 35, и последовательности, указанной в SEQ ID NO: 22.

В дополнительном предпочтительном варианте осуществления антитело по изобретению состоит из:

- (i) первой полипептидной цепи, состоящей из: первой антигенсвязывающей области, состоящей из последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1, 9 и 25–34, последовательности, указанной в SEQ ID NO:25, и последовательности, указанной в SEQ ID NO:22, и
- (i) второй полипептидной цепи, состоящей из: второй антигенсвязывающей области, состоящей из последовательности, указанной в SEQ ID NO:17, где X₄ представляет собой Y, последовательности, указанной в SEQ ID NO: 35, и последовательности, указанной в SEQ ID NO:21.

В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно опосредовать уничтожение клеток, экспрессирующих CD123, таких как клетки C1R-neo или клетки THP-1, $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетками.

Предпочтительно антитело способно индуцировать уничтожение клеток C1R-neo посредством активации $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток со значением EC50 50 пМ или менее, например, 25 пМ или менее, например 20 пМ или менее, например, 15 пМ или менее, например, 10 пМ или менее или даже 5 пМ или менее, например, 2 пМ или менее при тестировании, как описано в Примере 5 в данном документе.

В еще одном варианте осуществления антитело способно индуцировать уничтожение клеток ТНР-1 посредством активации $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток со значением EC50 100 пМ или менее, например, 50 пМ или менее, например, 25 пМ или менее, например 20 пМ или менее, например 15 пМ или менее, например 10 пМ или менее или даже 5 пМ или менее, например, 2 пМ или менее при тестировании, как описано в Примере 5 в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело способно опосредовать уничтожение опухолевых клеток AML костномозгового происхождения, полученных от пациента-человека и экспрессирующих CD123. Такое уничтожение можно,

например, определять, как описано в Примере 6 в данном документе. В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело по изобретению способно опосредовать специфическую гибель клеток более чем на 25%, например, более чем на 50%, при концентрации 100 фМ, как определено в анализе, описанном в Примере 6 в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело не способно опосредовать уничтожение CD123-отрицательных клеток, таких как CD123-отрицательные клетки человека.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно связываться с транзиентно экспрессирующими CD123 клетками 293F с EC50 50 нМ или менее, например, 20 нМ или менее, например 10 нМ или менее, например, 5 нМ или менее, при тестировании, как описано в Примере 3 в данном документе.

В дополнительном варианте осуществления полиспецифическое антитело по настоящему изобретению способно связываться с рекомбинантным слитым белком CD123- Fc с EC50 50 нМ или менее, например, 20 нМ или менее, например, 10 нМ или менее, например, 5 нМ или менее, при тестировании, как описано в Примере 4 в данном документе.

В дополнительном основном аспекте изобретение относится к антителу, содержащему первую антигенсвязывающую область, способную связывать CD123 человека, причем первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, содержащее:

- (i) последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 4, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1, 25–34, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 25–34, или
- (ii) последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 12, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из:

последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9.

В одном варианте осуществления в SEQ ID NO:2 X_1 представляет собой G. В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой S.

В одном варианте осуществления в SEQ ID NO:3 X_2 представляет собой A. В еще одном варианте осуществления X_2 представляет собой T.

В одном варианте осуществления в SEQ ID NO:4 X_3 представляет собой Y. В еще одном варианте осуществления X_3 представляет собой F.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой G, X_2 представляет собой A и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $G,\ X_2$ представляет собой A и X_3 представляет собой F.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $G,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $G,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой F.

В одном варианте осуществления X_1 представляет собой S, X_2 представляет собой A и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $S,\ X_2$ представляет собой A и X_3 представляет собой F.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $S,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой Y.

В еще одном варианте осуществления X_1 представляет собой $S,\ X_2$ представляет собой T и X_3 представляет собой F.

В дополнительном основном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело, такое как полиспецифическое антитело, согласно изобретению, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Антитела могут быть составлены с фармацевтически приемлемыми эксципиентами в соответствии с традиционными методами, например, описанными в (Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2012 June, ISBN 9780857110275). Фармацевтически

приемлемый эксципиент, а также любые другие носители, разбавители или адъюванты должны быть пригодны для антител и выбранного способа введения. Пригодность эксципиентов и других компонентов фармацевтических композиций определяют на основании отсутствия значительного негативного воздействия на желаемые биологические свойства выбранного антитела или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (например, менее существенного воздействия (10% или менее относительного ингибирования, 5% или менее относительного ингибирования и т.д.) на связывание антигена).

Фармацевтическая композиция может включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионогенный детергент, такой как Твин-20 или Твин-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию. Дополнительные фармацевтически приемлемые эксципиенты включают любые и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты, антиоксиданты и агенты, замедляющие абсорбцию, и т. п., которые физиологически совместимы с антителом по настоящему изобретению.

В дополнительном основном аспекте изобретение относится к полиспецифическому антителу по изобретению, как описано в данном документе, для применения в качестве лекарственного препарата.

Полиспецифическое антитело по изобретению позволяет создать микроокружение, благоприятное для уничтожения опухолевых клеток, в частности CD123-положительных опухолевых клеток, $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетками.

Соответственно, в дополнительном основном аспекте изобретение относится к полиспецифическому антителу по изобретению, как описано в данном документе, для применения при лечении злокачественного новообразования. В дополнительном основном аспекте изобретение относится к полиспецифическому антителу по изобретению, как описано в данном документе, для применения при лечении острого миелоидного лейкоза, острого В-клеточного лимфобластного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Ходжкина, бластного новообразования из плазмацитоидных дендритных клеток, хронического миелолейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваний или миелодиспластического синдрома.

Аналогичным образом, изобретение относится к способу лечения заболевания, включающему введение полиспецифического антитела по изобретению, как описано в

данном документе, субъекту-человеку, нуждающемуся в этом. В одном варианте заболевание представляет собой злокачественное новообразование, такое как острый миелоидный лейкоз.

В некоторых вариантах осуществления антитело применяют в виде монотерапии. Однако антитела по настоящему изобретению также можно применять в комбинированной терапии, т. е. в сочетании с другими терапевтическими агентами, подходящими для заболевания или патологического состояния, которые подлежат лечению.

«Лечение» или «процесс лечения» относится к введению эффективного количества антитела по настоящему изобретению с целью ослабления, облегчения, купирования, искоренения (излечения) или предотвращения симптомов или болезненных состояний. «Эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Эффективное количество полипептида, такого как антитело, варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивида, а также способность антитела вызывать желаемый ответ у индивида. Эффективным количеством является также такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты антитела перевешиваются терапевтически полезными эффектами. Иллюстративный неограничивающий диапазон эффективного количества антитела по настоящему изобретению составляет от около 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, например, от около 1 мг/кг до 50 мг/кг, например, от около 0.01 до 20 мг/кг, например, от около 0.1 до10 мг/кг, например, около 0,5, около 0,3, около 1, около 3, около 5 или около 8 мг/кг. Введение можно осуществлять любым подходящим путем, но обычно оно будет парентеральным, например, внутривенным, внутримышечным или подкожным.

Полиспецифические антитела по изобретению, как правило, получают рекомбинантным способом, т. е. путем экспрессии конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих антитела, в подходящих клетках-хозяевах с последующей очисткой полученного рекомбинантного антитела из культуры клеток. Конструкции нуклеиновых кислот могут быть получены стандартными молекулярно-биологическими методами, хорошо известными в данной области техники. Конструкции обычно вводят в клетку-хозяина с использованием вектора экспрессии. Подходящие конструкции нуклеиновой кислоты и векторы экспрессии известны в данной области техники. Клетки-хозяева, подходящие для рекомбинантной экспрессии антител, хорошо известны в данной области техники и включают клетки СНО, НЕК-293, Expi293F, PER-C6, NS/0 и Sp2/0.

Соответственно, в следующем аспекте изобретение относится к конструкции

нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело по изобретению, такое как полиспецифическое антитело по изобретению. В одном варианте осуществления конструкция представляет собой конструкцию ДНК. В другом варианте осуществления конструкция представляет собой конструкцию РНК.

В дополнительном аспекте изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую полиспецифическое антитело по изобретению.

В дополнительном аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующих полиспецифическое антитело по изобретению, или вектор экспрессии, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую полиспецифическое антитело по изобретению.

Таблица 1: ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ.

SEQ ID	код	Описание	Последовательность	
1	1D2	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT	
			ASSYVMGWFRQAPGKEREFVAVINWNG	
			DSTYYTDSVKGRFAISRDNAKNTVYLQM	
			NSLKPEDTAVYYCAADTRREWYRDGYW	
			GPPARYEYDYRGQGTQVTVSS	
2	1D2	CDR1	GRTASSYVMX ₁ , где X ₁ представляет собой	
			G или S	
3	1D2	CDR2	VINWNGDSTYYX2DSVKG, где X2	
			представляет собой А или Т	
4	1D2	CDR3	DTRREWYRDGX ₃ WGPPARYEYDY, где X ₃	
			представляет собой Y или F	
5	1D2	FR1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS	
6	1D2	FR2	WFRQAPGKEREFVA	
7	1D2	FR3	RFAISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY	
			YCAA	
8	1D2	FR4	RGQGTQVTVSS	
9	1A3	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRA	
			INTYAMAWFRQAPGKERDFVATISYSGG	
			TTDYAGSVKGRFTISRDNAENTVYLQMN	

			SLKPEDTAVYYCAARDRYNPLARNYNY
			WGQGTQVTVSS
10	1A3	CDR1	GRAINTYAMA
11	1A3	CDR2	TISYSGGTTDYAGSVKG
12	1A3	CDR3	RDRYNPLARNYNY
13	1A3	FR1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
14	1A3	FR2	WFRQAPGKERDFVA
15	1A3	FR3	RFTISRDNAENTVYLQMNSLKPEDTAVY
			YCAA
16	1A3	FR4	WGQGTQVTVSS
17	5C8var	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPF
			SNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGS
			TSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
			RAEDTAVYYCAAQFSGADX4GFGRLGIR
			GYEYDYWGQGTQVTVSS, где X4
			представляет собой Y, F или S
18	5C8var	CDR1	NYAMS
19	5C8var	CDR2	AISWSGGSTSYADSVKG
20	5C8var	CDR3	QFSGADX ₄ GFGRLGIRGYEYDY, где X ₄
			представляет собой Y, F или S
21	KiH	Fc	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
	(hole)		CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
	LFLE		KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
			GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFY
			PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
			SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
			ALHNHYTQKSLSLSPGK
22	KiH	Fc	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
	(выступ)		CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
	LFLE		KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
			GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
			EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFY
			PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
	<u> </u>	<u> </u>	

GKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVG PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA			SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE
целовека LRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDA DYSMPAVNNSYCQF GAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENS GKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVG PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRTTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			ALHNHYTQKSLSLSPGK
DYSMPAVNNSYCQF GAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENS GKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVG PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRTTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA	23	CD123	MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITN
GAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENS GKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVG PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRTTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA		человека	LRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKDA
GKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVG PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			DYSMPAVNNSYCQF
PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			GAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENS
KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			GKPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVG
RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			PGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHY
PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			KTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILV
YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			RGRSAAFGIPCTDKFVVFSQIEILTP
TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRKFR
EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			YELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPG
CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			TYTVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECDQ
NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			EEGANTRAWRTSLLIALGTLLALVCVFVI
T 24 CD131 MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			CRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ
24 CD131			NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQK
РІQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			Т
VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA	24	CD131	MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETI
ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA		человека	PLQTLRCYNDYTSHITCRWADTQDAQRL
QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			VNVTLIRRVNEDLLEPVSCDLSDDMPWS
DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			ACPHPRCVPRRCVIPCQSFVVTDVDYFSF
VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			QPDRPLGTRLTVTLTQHVQPPEPRDLQIST
HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			DQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGDLEFE
SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			VVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPE
LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			HLMPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKW
EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			SPEVCWDSQPGDEAQPQNLECFFDGAAV
GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			LSCSWEVRKEVASSVSFGLFYKPSPDAGE
NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			EECSPVLREGLGSLHTRHHCQIPVPDPATH
IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			GQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNIQMAPPSL
LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			NVTKDGDSYSLRWETMKMRYEHIDHTFE
ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA			IQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPA
			LEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSE
LRFCGIYGYRLRRKWEEKIPNPSKSHLFQ			ARSWDTESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLA
			LRFCGIYGYRLRRKWEEKIPNPSKSHLFQ

RFPELEGVFPVGFGDSEVSPI DPPSGPDTTPAASDLPTEQPF SHTPEKQASSFDFNGPYLGP GQPEPPQEGGSQKSPPPGSLI QVQLVPLAQAMGPGQAVEV GSPSLESGGGPAPPALGPRVC VAIPMSSGDTEDPGVASGYV NSGASSVSLVPSLGLPSDQTF PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	PSPQPGPPAA PHSRSLPDIL EYLCLPAGG ERRPSQGAA GGQDQKDSP SSADLVFTP PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
SHTPEKQASSFDFNGPYLGP GQPEPPQEGGSQKSPPPGSLI QVQLVPLAQAMGPGQAVEV GSPSLESGGGPAPPALGPRVO VAIPMSSGDTEDPGVASGYV NSGASSVSLVPSLGLPSDQTE PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	PHSRSLPDIL EYLCLPAGG ERRPSQGAA GGQDQKDSP SSADLVFTP PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
GQPEPPQEGGSQKSPPPGSLI QVQLVPLAQAMGPGQAVEV GSPSLESGGGPAPPALGPRVO VAIPMSSGDTEDPGVASGYV NSGASSVSLVPSLGLPSDQTE PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	EYLCLPAGG ERRPSQGAA GGQDQKDSP SSADLVFTP PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
QVQLVPLAQAMGPGQAVEV GSPSLESGGGPAPPALGPRVO VAIPMSSGDTEDPGVASGYV NSGASSVSLVPSLGLPSDQTF PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	ERRPSQGAA GGQDQKDSP SSADLVFTP PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
GSPSLESGGGPAPPALGPRVO VAIPMSSGDTEDPGVASGYV NSGASSVSLVPSLGLPSDQTF PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	GGQDQKDSP SSADLVFTP PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
VAIPMSSGDTEDPGVASGYV NSGASSVSLVPSLGLPSDQTF PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	SSADLVFTP PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
NSGASSVSLVPSLGLPSDQTF PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	PSLCPGLASG IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
PPGAPGPVKSGFEGYVELPP NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	IEGRSPRSPR DVSPTSPQPE
NNPVPPEAKSPVLNPGERPA	DVSPTSPQPE
GLLVLQQVGDYCFLPGLGPC	3PLSLRSKPS
SPGPGPEIKNLDQAFQVKKP	PGQAVPQVP
VIQLFKALKQQDYLSLPPWE	VNKPGEVC
25 1D2 var1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRL	SCAASGRTA
SSYVMGWFRQAPGKEREFV	SVINWNGDS
TYYADSVKGRFTISRDNSKN	TLYLQMNSL
RAEDTAVYYCAADTRREWY	RDGYWGPP
ARYEYDYRGQGTQVTVSS	
26 1D2 var2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRI	SCAASGRTA
SSYVMGWVRQAPGKEREW	VSVINWNGD
STYYADSVKGRFTISRDNSK	NTLYLQMNS
LRAEDTAVYYCAADTRREW	YRDGYWGP
PARYEYDYRGQGTLVTVSS	
27 1D2 var3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRI	SCAASGRTA
SSYVMSWFRQAPGKEREWV	'AVINWNGD
STYYADSVKGRFTISRDNSK	NTVYLQMN
SLRAEDTAVYYCAADTRREV	VYRDGYWG
PPARYEYDYRGQGTLVTVSS	
28 1D2 var4 EVQLVESGGGVVQPGGSLRI	SCAASGRT
ASSYVMSWFRQAPGKEREW	'VAVINWNG
DSTYYADSVKGRFTISRDNS	KNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAADTRRI	EWYRDGYW
GPPARYEYDYRGQGTTVTVS	SS

29	1D2 var5		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTA
			SSYVMSWFRQAPGKEREFVAVINWNGDS
			TYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNS
			LRAEDTAVYYCAADTRREWYRDGYWGP
			PARYEYDYRGQGTLVTVSS
30	1D2 var6		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTA
			SSYVMGWVRQAPGKGLEWVSVINWNG
			DSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM
			NSLRAEDTAVYYCAADTRREWYRDGYW
			GPPARYEYDYRGQGTLVTVSS
31	1D2 var7		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTA
			SSYVMSWVRQAPGKGLEWVSVINWNGD
			STYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNS
			LRAEDTAVYYCAADTRREWYRDGYWGP
			PARYEYDYRGQGTLVTVSS
32	1D2 var8		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTA
			SSYVMSWFRQAPGKGLEWVAVINWNGD
			STYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN
			SLRAEDTAVYYCAADTRREWYRDGYWG
			PPARYEYDYRGQGTLVTVSS
33	1D2 var9		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT
			ASSYVMGWFRQAPGKEREWVAVINWNG
			DSTYYTDSVKGRFAISRDNAKNTVYLQM
			NSLRAEDTAVYYCAADTRREWYRDGYW
			GPPARYEYDYRGQGTQVTVSS
34	1D2		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTA
	var10		SSYVMGWFRQAPGKEREFVSVINWNGDS
			TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
			RAEDTAVYYCAADTRREWYRDGFWGPP
			ARYEYDYRGQGTQVTVSS
35		Модифицир	AAASDKTHTCPPCP
		ованный	
		шарнир	

36	6H4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF	
			SNYGMGWFRQAPGKKREFVAGISWSGGS	
			TDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS	
			LKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDY	
			DYWGQGTQVTVSS	
37	6C1	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF	
			SNYGMGWFRQAPGKKRESVAGISWSGGS	
			TDYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS	
			LKPEDTAVYYCAAVFSGAETAYYPSDDY	
			DYWGQGTQVTVSS	
38	5D3	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPF	
			SNYAMGWFRQAPGKEREFVTVISWSGGS	
			TYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNS	
			LKPEDTAVYYCAAQFSGASTVVAGTALD	
			YDYWGQGTRVTVSS	
39	6H4	CDR1	GRPFSNYGMG	
40	6H4	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG	
41	6H4	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY	
42	6C1	CDR1	GRPFSNYGMG	
43	6C1	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG	
44	6C1	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY	
45	5D3	CDR1	GRPFSNYAMG	
46	5D3	CDR2	VISWSGGSTYYADSVKG	
47	5D3	CDR3	QFSGASTVVAGTALDYDY	
48	Vδ2		MQRISSLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQT	
			VPVSIGVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYR	
			KTQGNTMTFIYREKDIYGPGFKDNFQGDI	
			DIAKNLAVLKILAPSERDEGSYYCACDTL	
			GMGGEYTDKLIFGKGTRVTVEPRSQPHT	
			KPSVFVMKNGTNVACLVKEFYPKDIRINL	
			VSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYE	
			DSNSVTCSVQHDNKTVHSTDFEVKTDST	
			DHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTE	
			KVNMMSLT	

49	5C8var1	VHH-Fc	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPF
	(Y105F)		SNYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGS
			TSYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
			RAEDTAVYYCAAQFSGADFGFGRLGIRG
			YEYDYWGQGTQVTVSSAAASDKTHTCP
			PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
			VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
			NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
			LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
			PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKG
			FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
			DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
			HEALHNHYTQKSLSLSPGK
50	1D2	VHH-Fc	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRT
			ASSYVMGWFRQAPGKEREFVAVINWNG
			DSTYYTDSVKGRFAISRDNAKNTVYLQM
			NSLKPEDTAVYYCAADTRREWYRDGYW
			GPPARYEYDYRGQGTQVTVSSAAASDKT
			HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMI
			SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
			VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
			HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
			KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLS
			CAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
			PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS
			CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	7A5	Тяжелая	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFT
		цепь	FTDHYINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGNG
			NTYYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSS
			LTSEDSAVYFCAPNYGDYTLDFWGQGTS
			VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
			GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
			AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
			VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
	1	<u> </u>	

			PAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
			TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
			AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
			NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
			REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGF
			YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD
			GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
			EALHNHYTQKSLSLSPGKAAAEPEA
52	7A5	Легкая цепь	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSL
			LYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWA
			STRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAE
			DLAVYYCQQYYRYHTFGTGTKLEIKRTV
			AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY
			PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
			SKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
			THQGLSSPVTKSFNRGEC
53	C-		AAAEPEA
	концевая		
	метка		

Все ссылки, статьи, публикации, патенты, патентные публикации и патентные заявки, цитируемые в данном документе, в полном объеме и во всех целях включены посредством ссылки. Однако упоминание любых ссылок, статей, публикаций, патентов, патентных публикаций и патентных заявок в данном документе не является и не должно восприниматься как признание или любая форма предположения, что они составляют действительный уровень техники или образуют часть общедоступных сведений в любой стране мира.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Селекция и идентификация VHH к CD123 из библиотек фагового дисплея, полученных от животных, иммунизированных клетками C1R-CD1d

Lama glama (2 животных) иммунизировали клетками C1R-CD1d, экспрессирующими CD123, после чего создавали «иммунные» библиотеки фаговых антител VHH, как описано (Lameris et al., 2016 Immunology 149:111). Эти библиотеки использовали для селекции фагов на захваченном рекомбинантном человеческом CD123 или непосредственно покрытом

антигене CD123 (внеклеточный домен, Sino Biological). Проводили один или два последовательных раунда селекции. После одного и двух раундов селекции фагов отдельные фаговые клоны проверяли на связывание с помощью ELISA с рекомбинантным захваченным антигеном. Те клоны, которые показали положительный результат связывания, секвенировали, и все клоны, имеющие другую последовательность, затем тестировали на связывание с линией клеток, используемой для иммунизации, с помощью проточной цитометрии. Клоны VHH, демонстрирующие связывание в FACS, затем отбирали для дальнейшей характеристики. Было выделено восемь различных клонов, которые были названы: 1E2, 1B4, 1A3, 2D11, 1D2, 1E4, 1H1 и 1F1.

Последовательности антител с доменом VHH, специфичным для CD123, затем переформатировали в биспецифическое VHH с VHH, специфичным для Vδ2 (5C8var1; SEQ ID NO:17, где X4 представляет собой Y) в ориентации: N-конец-VHH к CD123-линкер-VHH к Vδ2-C-метка. Используемое VHH, специфичное для Vδ2, представлен в SEQ ID NO:17 (где X4 представляет собой Y). Линкером между двумя доменами VHH был участок из глицина (G)-серина (S) с последовательностью G4S. кДНК, кодирующие эти белки, были получены путем синтеза синтетических генов в Genscript, а затем клонированы в эукариотический вектор экспрессии pCDNA3.1+ (Thermofisher Scientific) путем направленного клонирования. Белки экспрессировали путем транзиентной трансфекции в клетках Hek293E, а затем (после 5 дней экспрессии) очищали от кондиционированного

Пример 2. Синтез синтетических генов, получение и очистка биспецифического VHH

Сарture Select (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом поставщика. Очищенное биспецифическое VHH всегда имело чистоту >95%, что определяли с помощью анализа на основе ДСН-ПААГ-электрофореза с использованием окрашивания Кумасси, и содержало очень низкие уровни эндотоксина (<0,5 EU/мг).

супернатанта культуры клеток с использованием аффинной матрицы с С-концевой меткой

Пример 3. Специфичность связывания биспецифического VHH к CD123 x Vδ2 в ELISA

Рекомбинантный очищенный антиген CD123 (внеклеточный домен; Sino Biological) или Fc-слитый антиген CD123 (Bio-Techne/R&D Systems) наносили на лунки планшета для ELISA (Greiner) в PBS в концентрации 2 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля лунки покрывали 1% (мас/об) BSA. Самостоятельно разработанную, полученную и очищенную рекомбинантную форму внеклеточных доменов человеческих $V\gamma$ 9- и $V\delta$ 2-цепей TCR,

слитую с человеческим Fc, также покрыли в качестве антигена в концентрации 2 мкг/мл. После покрытия и блокировки лунок 2% (мас/об) BSA биспецифические белки VHH тестировали на связывание при насыщающей концентрации 50 нМ, и связанное VHH обнаруживали с использованием меченного HRP антитела к VHH (Genscript) и окрашивания с использованием 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB)/H2O2.

На Фиг. 1 показано, что в ELISA только 1A3-5C8var1 и 1D2-5C8var1 продемонстрировали сильное и специфическое связывание как с CD123, так и с $\gamma\delta$ -TCR (гамма-дельта-Т-клеточный рецептор). Остальные биспецифические молекулы слабо связывались или не связывались с CD123.

Пример 4. Специфичность связывания биспецифического VHH к CD123 x Vδ2 с использованием проточной цитометрии

Конструкции экспрессии человеческого CD123 и общей β-цепи рецептора (CD131) приобретали у Invivogen. Плазмиды трансформировали в химически компетентные бактерии DH5α, и одну колонию, растущую на селективной среде, использовали для инокуляции 50 мл культуры для амплификации обеих конструкций. Очищенную ДНК затем трансфицировали в клетки Freestyle 293F с использованием полиэтиленимина (PEI). Для трансфекции использовали либо одну плазмиду, либо смесь двух плазмид. В качестве отрицательного проточной цитометрии контроля ДЛЯ также использовали нетрансфицированные клетки. Через день после трансфекции клетки использовали для проверки связывания биспецифического VHH с использованием окрашивания в FACS. Вкратце, связывание насыщающей концентрации 100 нМ биспецифического VHH с трансфицированными клетками детектировали с помощью меченного АF647 антитела к VHH (Genscript), а окрашивание визуализировали с использованием FACS Celesta (Becton and Dickinson).

На Фиг. 2 показано, что как 1A3-5C8var1, так и 1D2-5C8var1 сильно и специфически распознают CD123, когда антиген экспрессируется отдельно или когда экспрессируется в сочетании с CD131. 1D2-5C8var1 давало самые сильные сигналы в проточной цитометрии.

Чтобы определить кажущуюся аффинность 1D2-5C8var1 к CD123 с использованием проточной цитометрии, диапазон концентраций этого биспецифического VHH тестировали на предмет связывания с транзиентно трансфицированными клетками 293F, экспрессирующими CD123, CD131 или как CD123, так и CD131. Исходные клетки (экспрессирующие CD131) использовали в качестве отрицательного контроля.

На Фиг. 3 снова показано, что 1D2-5C8var1 было исключительно специфично к

CD123, поскольку распознавались только клетки, (транзиентно) экспрессирующие CD123, но не CD131. Кроме того, данные демонстрирует, что кажущаяся аффинность связывания 1D2-5C8var1 с CD123, определенная с помощью проточной цитометрии, составляла около 3 нМ. Это значение было сопоставимо для связывания только с CD123 или с совместно экспрессируемыми CD123 и CD131.

Пример 5. Определение аффинности 1D2-5C8var1 к связыванию CD123 с использованием биослойной интерферометрии (BLI)

Для определения кинетики связывания 1D2-5C8var1 с CD123 рекомбинантный очищенный слитый белок CD123-Fc (Bio-Techne/R&D Systems) загружали до плотности 1 нм на сенсоры для захвата Fc IgG человека (используя концентрацию 5 мкг/мл) для прибора Octet Red96e (Sartorius). Затем разные сенсоры погружали в разные концентрации 1D2-5C8var1; разведения были сделаны в 10х буфере для кинетических исследований (10хКВ), предоставленном поставщиком. По полученным сенсограммам методом аппроксимации кривых определяли кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации.

На Фиг. 4 показаны фактические сенсограммы, которые использовались для аппроксимации кривой. Последний на фигуре изображен прямыми линиями. Это использовали для определения кинетических констант скорости ассоциации и диссоциации и, следовательно, аффинности VHH к CD123 1D2. Измерения проводили дважды, и аффинность 1D2-5C8var1 к CD123 составило от 3 до 5 нМ.

Пример 6. CD123-зависимая, 1D2-5C8var1-опосредованная активация Vγ9Vδ2 Тклеток и опосредованная Т-клетками цитотоксичность клеток-мишеней

Лейкоцитарные пленки получали от Sanquin (Амстердам, Нидерланды). РВМС выделяли из этих лейкоцитов путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла с использованием описанных процедур. Vγ9Vδ2 Т-клетки высокой чистоты были получены с помощью MACS с использованием Vδ2-специфического антитела и размножены с использованием опубликованных способов (de Bruin et al., 2016 Clin Immunol. 169:128). CD123-положительные В-лимфобласты, EBV-трансформированную линию клеток C1R пео (CRL-2369) и CD123-положительную линию клеток THP-1, полученную из AML (TIB-202), получали из американской коллекции типовых культур и культивировали в соответствии с инструкциями поставщика. Клетки-мишени метили фиолетовым клеточным следом (CTV) в течение 20 минут при 37°C. Для измерения активации Т-клеток клетки окрашивали на маркер активации CD107а (или LAMP-1, ассоциированный с лизосомой мембранный белок-

1), который обнажается на клеточной поверхности после дегрануляции клеток. Биспецифическое антитело в диапазоне концентраций инкубировали в течение 4 часов со смесью 1:1 клеток-мишеней и размноженных Vγ9Vδ2 Т-клеток (по 50000 клеток) в конечном объеме 100 мкл в присутствии меченного РЕ антитела к CD107A. После инкубации клетки промывали и окрашивали смесью флуоресцентно меченных антител к CD3 и к Vγ9 для идентификации Т-клеток и красителем для оценки жизнеспособности клеток (7-AAD). Образцы анализировали с использованием FACS Celesta (Becton and Dickinson). Для оценки цитотоксичности клеток-мишеней, опосредованной Т-клетками, по существу использовали ту же самую схему, только не добавляли антитело к CD107A, а меченные CTV клетки-мишени и Vγ9Vδ2 Т-клетки инкубировали в течение 24 часов в присутствии биспецифического VHH. В конце анализа клетки снова окрашивали на CD3 и Vγ9 и анализировали с помощью проточной цитометрии в присутствии красителя для оценки жизнеспособности клеток (7-AAD).

На Фиг. 5 показано, что 1D2-5C8var1 вызывало мощную активацию Т-клеток с EC50 в диапазоне пМ. В отсутствие клеток-мишеней высокая концентрация 1D2-5C8var1 вызывала только фоновую активацию (данные не показаны). Способность 1D2-5C8var1 индуцировать активацию Т-клеток незначительно зависела от используемого донора Т-клеток; Значения EC50 находились в диапазоне от 3 до 13 пМ.

Чтобы определить, приведет ли наблюдаемая активация Т-клеток к лизису клеток-мишеней, проводили анализ цитотоксичности с использованием соотношения эффектора к мишени (E:T) 1:1 в течение 24 часов. На Фиг. 6 показано, что 1D2-5C8var1 мощно индуцирует лизис клеток-мишеней C1R-neo в присутствии размноженных $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток. EC50 для цитотоксичности определяли путем аппроксимации кривой и составляли от 1 до 2 пМ в зависимости от используемого донора Т-клеток (изображены данные для двух доноров).

Тот же анализ цитотоксичности повторяли с CD123-положительной линией клеток AML: THP-1. Способность 1D2-5C8var1 индуцировать лизис клеток-мишеней THP-1 была весьма сопоставимой: измеренная EC50 составляла 1 пМ. Напротив: способность 1A3-5C8var1 индуцировать лизис клеток-мишеней составила около 50 пМ: Фиг. 7.

Пример 7. Активация опосредованная биспецифическим VHH Vγ9Vδ2 Т-клеток и индуцированный Т-клетками лизис первичных клеток AML

25000 мононуклеарных клеток, полученных из костного мозга пациента с АМL, культивировали в течение ночи в соотношении 1:1 с размноженными Vγ9Vδ2 Т-клетками,

полученными от здорового донора. Клетки культивировали в присутствии меченного РЕ антитела к CD107а и диапазона концентрации 1D2-5C8var1 (от 10 нМ до 100 нМ). Клетки собирали, промывали и метили в течение 30" при 4 °C смесью антител, содержащей флуоресцентно меченные антитела к CD45, CD117, CD34, CD33 и CD2. После промывки клетки ресуспендировали в смеси красителя для оценки жизнеспособности клеток (7AAD) и 123 частиц для подсчета клеток и затем анализировали с использованием проточного цитометра LSRFortessa.

На Фиг. 8 показано, что оба биспецифических соединения VHH были способны индуцировать мощную активацию Т-клеток, зависимую от CD123-положительных первичных бластов AML. Кроме того, эти соединения вызывали высокий уровень лизиса опухолевых клеток, и оба показали значительную цитотоксичность. Значения EC50 не могли быть однозначно определены по полученным кривым, но находились в диапазоне фМ (ниже 1 пМ).

Пример 8. Гуманизация VHH к CD123 1D2 с использованием трансплантации CDR

VHHФрагмент антитела 1D2 гуманизировали с использованием технологии трансплантации CDR (см., например, патент США № 5225539 и Williams, D.G. et al., 2010, Antibody Engineering, volume 1, Chapter 21). Сначала последовательности зародышевой линии человека были идентифицированы с помощью IgBLAST (Ye J. et al., 2013, Nucleic Acids Res. 41:W34-40). В качестве ближайшей последовательности зародышевой линии человека был идентифицирован V-ген IGVH3-23*04 (идентичность 78,4%). Эту последовательность зародышевой линии использовали непосредственной для трансплантации CDR ламы (91,8% идентичности с зародышевой линией человека IGVH3-23*04), в результате чего была получена следующая конструкция кДНК: SEQ ID NO: 31. Затем к базе данных NCBI NR (загруженной 27 сентября 2020 г.) был выполнен запрос с использованием **BLASTP** (версия 2.10.0+)ДЛЯ идентификации последовательностей человека, которые продемонстрировали наибольшую идентичность последовательностей 1D2. Были идентифицированы две последовательности VH, которые продемонстрировали показатель сходства 70% или выше и имели схожие длины CDR, предпочтительно идентичные таковым в CDR1, CDR2, CDR3 1D2, соответственно. Каркасы, описанные GenBank (Benson, D.A. et al., 2013, Nucleic Acids Res. 41(D1):D36-42) под номерами доступа CAD60357.1 и AKU38567.1, отбирали в качестве матриц для трансплантации CDR 1D2, в результате чего в следующих конструкциях кДНК: SEQ ID NO: 28 и 32, соответственно. Определение каркаса и CDR было таким, как определено Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., US Department of Health and Human Services, (1983)). Для понимания влияния гуманизированных каркасных остатков на структуру VHH была построена модель гомологии VHH 1D2 с помощью инструмента «Antibody Prediction» (параметры по умолчанию) в программе BioLuminate 4.2.156 (Schrödinger). Модель гомологии была построена на основе PDB ID 6GKU. CDR трансплантировали in silico для изучения влияния человеческих остатков на такие характеристики, как петлевая конформация CDR, гидрофобность поверхности и структурная целостность (например, повышенная жесткость). Полученные конструкции проверяли на наличие этих особенностей, в результате чего были разработаны дополнительные конструкции: SEQ ID NO: 25, 26, 27, 29, 30, 33 и 34. Последовательности этих гуманизированных 1D2-VHH затем переформатировали в биспецифическое VHH с $V\delta 2$ -специфическим VHH (5C8var1; SEQ ID NO:17, где X_4 представляет собой Y) в ориентации: N-конец-гуманизированный-VHH 1D2-линкер-VHH к Vδ2-C-концевая метка. Затем кДНК, кодирующие эти молекулы, синтезировали и клонировали в вектор экспрессии для экспрессии в клетках НЕК293Е. Белок получали путем транзиентной трансфекции клеток и очищали от культурального супернатанта с помощью аффинной хроматографии с С-концевой меткой с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией.

Пример 9. Определение аффинности гуманизированных вариантов 1D2-5C8var1(Y105F) к связыванию CD123 с использованием биослойной интерферометрии (BLI)

Для определения кинетики связывания гуманизированного вариантов 1D2-5C8var1 с CD123 рекомбинантный очищенный слитый белок CD123-Fc (Bio-Techne/R&D Systems) загружали до плотности 1 нм на сенсоры для захвата Fc IgG человека (используя концентрацию 5 мкг/мл) для прибора Octet Red96e (Sartorius). Затем различные сенсоры погружали в разные концентрации гуманизированных вариантов 1D2-5C8var1, начиная с 50 нМ и их двукратных разбавлений; разведения были сделаны в 10х буфере для кинетических исследований (10хКВ), предоставленном поставщиком. По полученным сенсограммам методом аппроксимации кривых определяли кинетические константы скорости ассоциации и диссоциации. Константы скорости ассоциации и диссоциации, если аппроксимация была возможна, использовались для расчета аффинности гуманизированных вариантов 1D2-5C8var1 в отношении связывания с CD123. Измерения проводили дважды, и аффинность различных гуманизированных вариантов 1D2-5C8var1 к CD123 варьировалась от 2,6 нМ, что аналогично исходному 1D2, до аффинность несвязывающих вариантов, как показано в

Таблице 2. Для сравнения в эти эксперименты было включено негуманизированное (исходное) 1D2.

Таблица 2: Аффинность гуманизированных вариантов 1D2 к рекомбинантному CD123

SEQ ID NO:		Станд	
	К D (нМ)	откл.	
1	3,1	0,7	
25	7,2	0,4	
26	24,5*		
27	14,9	4,3	
28	20,0	7,5	
29	7,7	1,5	
30	29,1*		
31	O/C		
32	44,1*		
33	2,6	0,5	
34	10,4	7,5	

^{*}низкое связывание (>20 нМ), только одно измерение, О/С: связывания не обнаружено

Пример 10. Биспецифические конструкции с увеличенным периодом полужизни (содержащие Fc)

Биспецифическое VHH 1D2-5C8var1 было переформатировано в формат терапевтического антитела, который содержит домен Fc человека. Оба домена VHH были связаны с доменом Fc человеческого IgG1 (т. е. CH2 и CH3) со следующими характеристиками: VHH было связано с модифицированным шарниром (AAA, за которым следовал SDКТНТСРРСР) и человеческими доменами CH2 и CH3. Пара мутаций LFLE (L234F, L235E) в домене CH2 приводила к сайленсингу Fc, а домены CH3 подвергали мутациям по типу «выступы-вовпадины» (выступ: T366W и впадина: T366S, L368A и Y407V), которые усиливают гетеродимеризацию при совместной экспрессии двух цепей в одной клетке. Эта пара мутаций была описана в научной литературе (Ridgway et al. (1996) Protein Eng 9:617). К Сконцу тяжелой цепи антитела к Vγ9Vδ2 добавляли С-концевую метку для целей очистки (АААЕРЕА (SEQ ID NO:53)). Последовательности конструкций представлены в SEQ ID NO:49 и SEQ ID NO:50. Полученную конструкцию антитела назвали 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc.

Белок получали путем совместной трансфекции кодирующих двух векторов экспрессии в клетки НЕК293E и очистки от культурного супернатанта с помощью аффинной хроматографии с С-концевой меткой с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией. В результате был получен высокомономерный белковый

препарат 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc: Фиг. 9.

Пример 11. 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc индуцирует зависимую от мишени активацию Т-клеток и вызывает опосредованную Т-клетками цитотоксичность клеток-мишеней с такой же активностью, как и у биспецифического VHH

Затем 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc тестировали на его способность индуцировать мишеньзависимую активацию $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток в совместной культуре $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток и опухолевых клеток THP-1 (в соотношении 1:1). $V\gamma9V\delta2$ Т-клетки размножали из крови здорового донора с использованием процедур, известных в данной области техники. Линию клеток THP-1 (кат. номер ATCC TIB-202) культивировали в соответствии с рекомендациями поставщика. При совместном культивировании обоих типов клеток в течение 4 часов активацию $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток измеряли путем окрашивания на CD107a и измерения процента CD107a-положительных клеток с помощью проточной цитометрии. На Фиг. 10 показано, что 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc индуцирует мишень-зависимую активацию Т-клеток (в совместной культуре $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток и опухолевых клеток в отсутствие соединения активацию не наблюдали; данные не показаны). EC50, как правило, находилась в диапазоне пМ от 4 до 16 пМ (в зависимости от донора).

Примечательно, что эффективность Fc-содержащей молекулы в индукции активации Vγ9Vδ2 Т-клеток существенно не отличалась от эффективности биспецифического VHH. Это наблюдали для трех разных независимых доноров Т-клеток. Чтобы определить, привела ли эта активация Т-клеток также к лизису клеток-мишеней, жизнеспособность клеток-мишеней THP-1 измеряли после 24 часов совместного культивирования (соотношение 1:1) с Vγ9Vδ2 Т-клетками в присутствии антитела. Vγ9Vδ2 Т-клетки были выделены из крови здоровых доноров и размножены с использованием стандартизированных протоколов. За день до анализа линию клеток-мишеней THP-1 метили Cell Trace Violet (CTV), чтобы можно было отличить ее от популяции эффекторных клеток с помощью проточной цитометрии. Через 24 часа совместного культивирования в присутствии возрастающих концентраций соединения определяли процент живых клеток-мишеней: Фиг. 11.

На Фиг. 11 показано, что биспецифическое VHH и Fc-содержащий аналог индуцируют сильную цитотоксичность клеток-мишеней, опосредованную Т-клетками, и что эффективность обеих молекул в обеспечении лизиса клеток-мишеней существенно не различается. Значения EC50 находились в диапазоне от 1 до 3 пМ, в зависимости от донора. В совместной культуре в отсутствие соединения лизиса клеток-мишеней не наблюдали (данные не показаны). Через 24 часа все клетки-мишени в анализе были уничтожены.

Пример 12. 1D2-5C8var1(Y105F)-Fc вызывает преимущественное уничтожение опухолевых клеток по сравнению с мишень-положительными нормальными клетками

Чтобы определить, в какой степени антитело индуцирует уничтожение CD123-положительных нормальных клеток, плазмацитоидные дендритные клетки (pDC), которые, как известно, экспрессируют CD123 (Collin *et al.*, 2013 Immunology 140, 1:22-30), обогащали из фракции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), выделенной из крови двух здоровых доноров с помощью сортировки MACS (Miltenyi Biotech, кат. номер 130-097-415). Линию клеток THP-1 использовали в качестве линии опухолевых клеток, экспрессирующей CD123. С помощью окрашивания на CD123 и анализа методом проточной цитометрии было показано, что уровень экспрессии CD123 был примерно в десять раз выше на pDC, чем на линии клеток THP-1: Фиг. 12.

Цитотоксические эффекты соединения, нацеленного на CD123, в сочетании с Vγ9Vδ2 Т-клетками на смесь клеток-мишеней затем определяли в совместной культуре линии клеток ТНР-1, рDC и Vу9V82 Т-клеток в соотношении 1:1:2. Vу9V82 Т-клетки выделяли из крови здоровых доноров И размножали c использованием стандартизированных протоколов. За день до анализа линию клеток-мишеней ТНР-1 метили Cell Trace Violet (CTV), чтобы можно было отличить ее от популяции эффекторных клеток и других клеток-мишеней с помощью проточной цитометрии. Через 24 часа совместного культивирования в присутствии возрастающих концентраций соединения определяли процент живых клеток-мишеней путем окрашивания на V₇9 (Т-клеток), CD303 (pDC), CTV (THP-1) и CD123 (THP-1 и pDC) и анализировали с помощью проточной цитометрии.

На Фиг. 13 показано, что биспецифическое антитело индуцировало ожидаемый лизис клеток-мишеней ТНР-1 (Фиг. 11) с активностью (ЕС50), которая составляла около 1 пМ. Примечательно, однако, что, несмотря на десятикратно более высокий уровень экспрессии целевой молекулы СD123 на pDC (Фиг. 12), эти клетки были поражены гораздо меньше. Максимальный наблюдаемый лизис был ниже, а ЕС50, обнаруженная в анализе, была почти в 10 раз выше, чем обнаруженная для лизиса клеток ТНР-1. Результаты для донора № 2 были схожими (значения ЕС50 1 и 11 пМ для ТНР-1 и pDC, соответственно; данные не показаны). Эти данные свидетельствуют о преимущественной индукции лизиса опухолевых клеток по сравнению с нормальными клетками-мишенями под действием соединения и Vγ9Vδ2 Т-клеток.

Пример 13. Картирование эпитопов демонстрирует, что VHH 1D2 связывается с эпитопом, проксимальным к мембране

Чтобы определить, какой эпитоп на CD123 распознавался VHH 1D2 к CD123, этот эпитоп картировали с использованием метода, основанного на масс-спектрометрии (Pimenova *et al.*, 2008 J Mass Spectrom. 43(2): 185-95). Было обнаружено, что ряд остатков в молекуле CD123 перекрестно связан с антителом: Фиг. 14.

На Фиг. 14 идентифицируется эпитоп 1D2, который должен присутствовать в области аминокислот 203–273 человеческого CD123. Если выделять эти остатки в кристаллической структуре молекулы (PDB ID 5UV8: Broughton $et\ al.$, 2018 Nat Commun. 9: 386), то они сопоставляются со вторым доменом, который находится наиболее проксимально к мембране и занимает площадь 1011 ${\rm \AA}^2$.

На Фиг. 15 показано, что эпитоп, распознаваемый перспективным антителом к CD123, расположен близко к мембране. При этом расстояние между ними составляет около 40 Å, что не является редкостью для эпитопа. Было обнаружено, что все области CDR VHH 1D2 перекрестно связаны с антигеном, с особенно сильным сигналом для CDR3.

Аналогичный эксперимент был проведен для определения того, какой эпитоп на CD123 распознается VHH 1A3 к CD123. Было обнаружено, что остатки H225, H231, R234, T251, R255 и T267 CD123 сшиты с антителом 1A3.

Пример 14. 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc демонстрирует благоприятный профиль стабильности

Термостабильность 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc анализировали методом нанодифференциальной сканирующей флуориметрии (нано-ДСФ). Белок показал высокую термостабильность при температуре разворачивания >60°C (таблица 3). Дополнительно 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc подвергали ускоренным стресс-тестированиям. инкубировали в течение 1 недели при повышенной температуре (40°C) и в кислых (50 мМ ацетатный буфер, рН 5,0) и основных (100 мМ фосфатный буфер, рН 8,5) условиях, а также 6 и 24 часов в окислительных условиях (фосфатный буфер, рН 7,4 и 0,05% Н₂О₂). Любые изменения, вызванные стрессом, анализировали путем измерения агрегатов и фрагментов с (A) хроматографии, обнаруженной помощью эксклюзионной помощью ультрафиолетового поглощения (SEC-UV) и (В) электрофореза в капиллярном геле в денатурирующих (SDS) условиях (CE-SDS) и после восстановления (Фиг. 16). Не наблюдали заметной деградации образца белка, подвергшегося стрессу, по сравнению с

эталонными образцами, не подвергавшимися стрессу; белок оказался очень стабильным. Таблица 3:

	Результаты нано-	-ДСФ	1D2x5C8var1(Y105F)- Fc
		Среднее значение	60,45
Папана	Начало [°С]	Стандартное отклонение	1,71
Переход	Промежуточная точка №1 [°C]	Среднее значение	65,65
разворачивания наблюдается при		Стандартное отклонение	0,01
350 нм/Тпл.	Промежуточная точка №2 [°C]	Среднее значение	71,61
		Стандартное отклонение	0,09
Начало помутнения, Ton		Среднее значение	67,75
		Стандартное отклонение	2,13

Пример 15. Биспецифическое антитело к Vδ2-CD123 1D2x5C8var1(Y105F) более эффективно, чем биспецифическое антитело к Vγ9-CD123 на основе 7A5 в индукции активации Т-клеток и опосредованной Т-клетками цитотоксичности опухолевых клеток

Активность биспецифического антитела Vδ2-CD123 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc сравнивали с биспецифическим антителом Vy9-CD123-Fc на основе Vy9-связывающего антитела Fab 7А5. Последовательность 7А5 была любезно предоставлена профессором Кабелитцем. Антитело было охарактеризовано в Oberg et al. (2014) Cancer Res 74(5):1349. Варианты антитела 7A5 были описаны в Ganesan et al. (2021) Leukemia 35(8):2274-2284 и WO2020/227457. Последовательность Fab 7A5 была слита с последовательностями CH2 и СНЗ человека, включая мутации типа «выступ-во-впадину» в СНЗ и мутации, подвергающие сайленсингу Fc, L234F и L235E. Этот V₇9-связывающий «половинный IgG» (SEQ ID NO:51 и 52) затем совместно экспрессировали со специфичной для CD123 слитой молекулой VHH-Fc в клетках НЕК293E с образованием биспецифического антитела к Vу9хCD123. Белок очищали по С-концевой метке, присутствующей на С-конце СН3 в Vу9связывающем плече, а затем дополнительно очищали посредством препаративной эксклюзионной хроматографии. В результате был получен чистый и по существу свободный от эндотоксинов белок. 1D2xFab 7A5-Fc имеет то же плечо VHH, связывающее CD123, что и 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc. Для анализа 50000 размноженных $V\gamma9V\delta2$ Т-клеток совместно культивировали с 50000 клетками-мишенями Kasumi-3 или THP1 и серией разведений двух соединений. Результаты приведены на Фиг. 17. (А) Дегрануляцию анализировали через 4 CD107a часа путем измерения процентного содержания положительных

(ассоциированному с лизосомой белку-1 или LAMP-1) клеток с помощью проточной цитометрии. (В) Активацию $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток анализировали путем измерения процентного содержания CD25-положительных клеток и (С) цитотоксичность путем анализа процентного содержания живых клеток-мишеней через 24 часа с помощью проточной цитометрии. 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc индуцировало более мощную активацию и дегрануляцию $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клеток, о чем свидетельствует более высокий процент CD107а-положительных клеток, а также CD25-положительных клеток и более низкое значение EC50, чем те, которые наблюдались при использовании соединения, нацеленного на $V\gamma 9$. Более высокая цитотоксичность наблюдалась при использовании 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc по сравнению с 1D2xFab 7A5-Fc, о чем свидетельствует значительно более низкое значение EC50.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1. Полиспецифическое антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, способную связывать CD123 человека, и вторую антигенсвязывающую область, способную связывать V δ 2-цепь человеческого V γ 9V δ 2 Т-клеточного рецептора.
- 2. Полиспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что представляет собой биспецифическое антитело.
- 3. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело и/или вторая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело.
- 4. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что конкурирует за связывание с CD123 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:1, предпочтительно при этом полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на CD123 человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:1.
- 5. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 4, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1, 25–34, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 25–34.
- 6. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–3, отличающееся тем, что конкурирует за связывание с CD123 человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO: 9, предпочтительно при этом полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на CD123 человека, что и антитело, имеющее

последовательность, указанную в SEQ ID NO:9.

- 7. Полиспецифическое антитело по п. 6, отличающееся тем, антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 12, при этом предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 9, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, 98% например, ПО меньшей мере идентичности последовательности последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9.
- 8. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что способно активировать $V\gamma 9V\delta 2$ Т-клетки человека.
- 9. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что конкурирует за связывание с $V\delta2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, где X_4 представляет собой Y, предпочтительно при этом полиспецифическое антитело связывает тот же эпитоп на $V\delta2$ человека, что и антитело, имеющего последовательность, указанную в SEQ ID NO:17, где X_4 представляет собой Y,

или

при этом полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:36, при этом предпочтительно полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на $V\delta2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:36,

или

при этом полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:37, при этом предпочтительно полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на $V\delta2$ человека, что и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:37,

или

при этом полиспецифическое антитело конкурирует за связывание с $V\delta2$ человека с антителом, имеющим последовательность, указанную в SEQ ID NO:38, предпочтительно при этом полиспецифическое антитело связывается с тем же эпитопом на $V\delta2$ человека, что

и антитело, имеющее последовательность, указанную в SEQ ID NO:38.

10. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 20, при этом предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 17, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:17,

или

при этом вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 39, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 40, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 41, при этом предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 36, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:36,

или

при этом вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 42, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 43, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 44, при этом предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 37, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:37,

или

при этом вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 45, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 46, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 47, при этом предпочтительно вторая антигенсвязывающая область содержит или состоит из последовательности, указанной в SEQ ID NO: 38, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%,

например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:38.

- 11. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что
- (i) первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:4, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 20, или
- (ii) первая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 12, и вторая антигенсвязывающая область содержит последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO:18, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO:19, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO:20.
- 12. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первая антигенсвязывающая область, способная связывать CD123 человека, расположена на N-конце второй антигенсвязывающей области, способной связывать Vδ2-цепь человека.
- 13. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что полиспецифическое антитело дополнительно содержит домен продления периода полужизни, такой как область Fc, предпочтительно область Fc человека.
- 14. Полиспецифическое антитело по п. 13, отличающееся тем, что область Fc представляет собой гетеродимер, содержащий два полипептида Fc, причем первая антигенсвязывающая область слита с первым полипептидом Fc, а вторая антигенсвязывающая область слита со вторым полипептидом Fc, и при этом первый и второй полипептиды Fc содержат асимметричные аминокислотные мутации, которые благоприятствуют образованию гетеродимеров по сравнению с образованием гомодимеров, причем предпочтительно первый полипептид Fc содержит замену Т366W, а второй

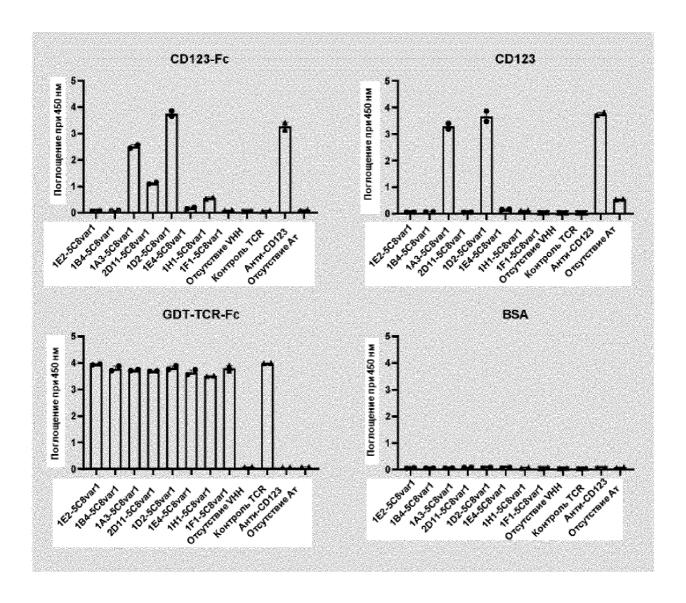
полипептид Fc содержит замены T366S, L368A и Y407V или наоборот, где положения аминокислот соответствуют IgG1 человека в соответствии с системой нумерации EU.

- 15. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 13 или 14, отличающееся тем, что остатки цистеина в положении 220 в первом и втором полипептидах Fc удалены или заменены, причем положение аминокислоты соответствует человеческому IgG1 согласно системе нумерации EU.
- 16. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 13–15, отличающееся тем, что первый и второй полипептиды Fc дополнительно содержат мутацию в положении 234 и/или 235, предпочтительно при этом первый и второй полипептиды Fc содержат замену L234F и L235E, причем положения аминокислот соответствуют человеческому IgG1 в соответствии с системой нумерации EU.
- 17. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 13–16, отличающееся тем, что первый полипептид Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 21, а второй полипептид Fc содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 22, или наоборот.
- 18. Полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что способно опосредовать уничтожение клеток, экспрессирующих CD123, таких как клетки C1r-neo или клетки THP-1, при помощи Vγ9Vδ2 T-клеток.
- 19. Антитело, содержащее первую антигенсвязывающую область, способную связывать CD123 человека, причем первая антигенсвязывающая область представляет собой однодоменное антитело, содержащее:
- (i) последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 2, последовательность CDR2 VH, указанную в SEQ ID NO: 3, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 4, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO:1, 25–34, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 96%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы последовательностей, указанных в SEQ ID NO: 1, 25–34, или
- (ii) последовательность CDR1 VH, указанную в SEQ ID NO: 10, последовательность CDR2

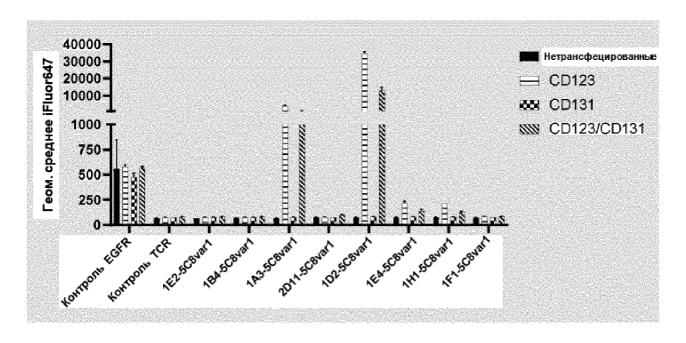
VH, указанную в SEQ ID NO: 11, и последовательность CDR3 VH, указанную в SEQ ID NO: 12, где предпочтительно первая антигенсвязывающая область содержит или состоит из: последовательности, указанной в SEQ ID NO:9, или последовательности, имеющей по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 92%, например, по меньшей мере 94%, например, по меньшей мере 98% идентичности последовательности с последовательностью, указанной в SEQ ID NO:9.

- 20. Фармацевтическая композиция, содержащая полиспецифическое антитело по любому из предшествующих пунктов или антитело по п. 19 и фармацевтически приемлемый эксципиент.
- 21. Полиспецифическое антитело по любому из пп. 1–18 или антитело по п. 19 для применения в качестве лекарственного препарата, предпочтительно для применения в лечении злокачественного новообразования, более предпочтительно для применения в лечении острого миелоидного лейкоза, острого В-клеточного лимфобластного лейкоза, волосатоклеточного лейкоза, лимфомы Ходжкина, бластного новообразования из плазмацитоидных дендритных клеток, хронического миелолейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, В-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваний или миелодиспластического синдрома.
- 22. Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую антитело по любому из пп. 1–19, или клетка-хозяин, содержащая одну или более конструкций нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело по любому из пп. 1–19.

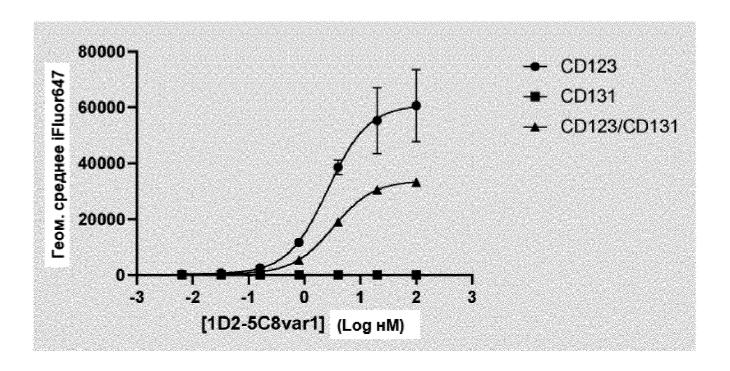
Фиг. 1



Фиг. 2

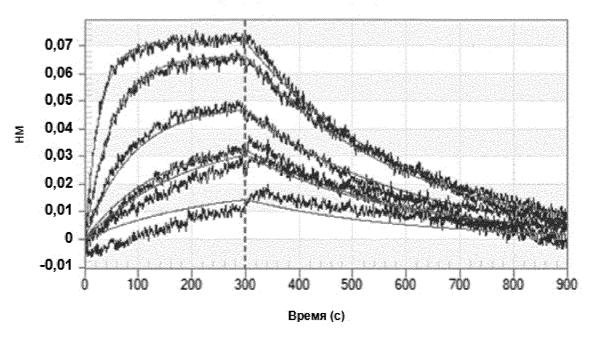


Фиг. 3

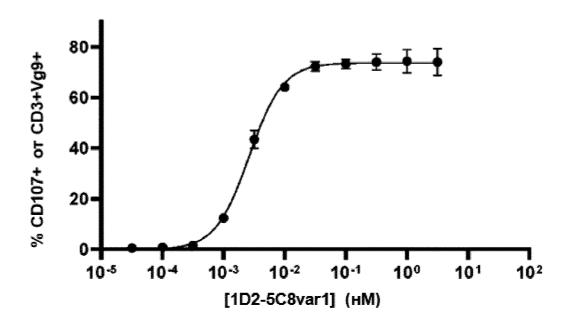


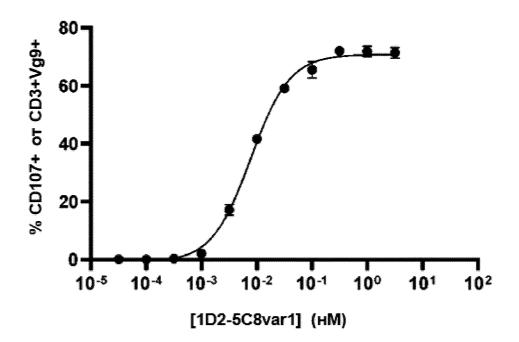
Фиг. 4

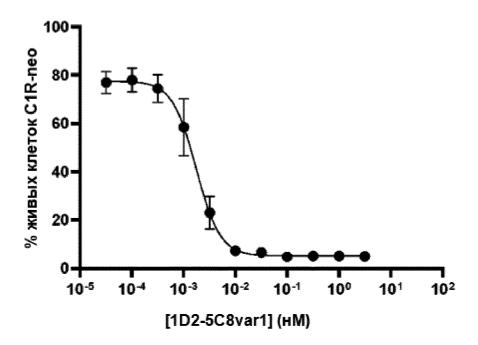
CD 123 c 1D2-5C8var1

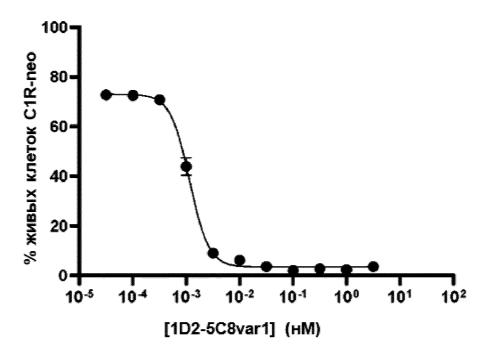


Фиг. 5

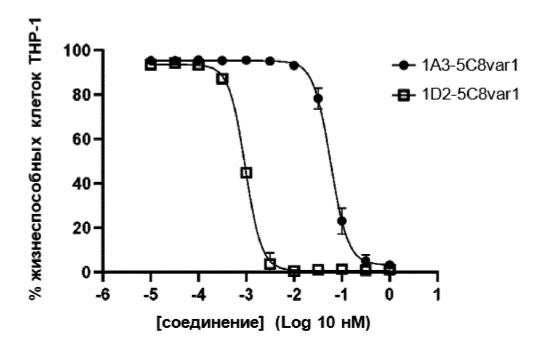




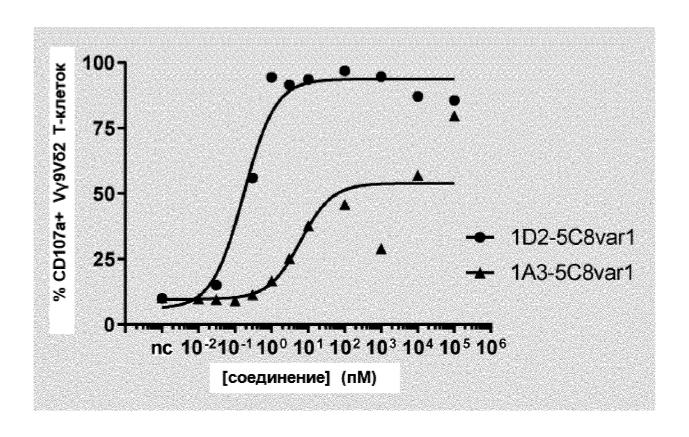


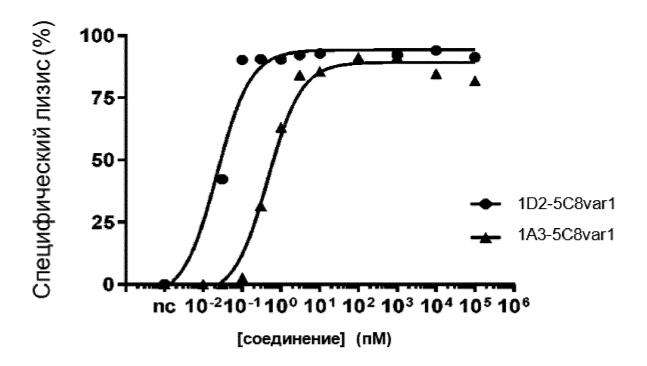


Фиг. 7

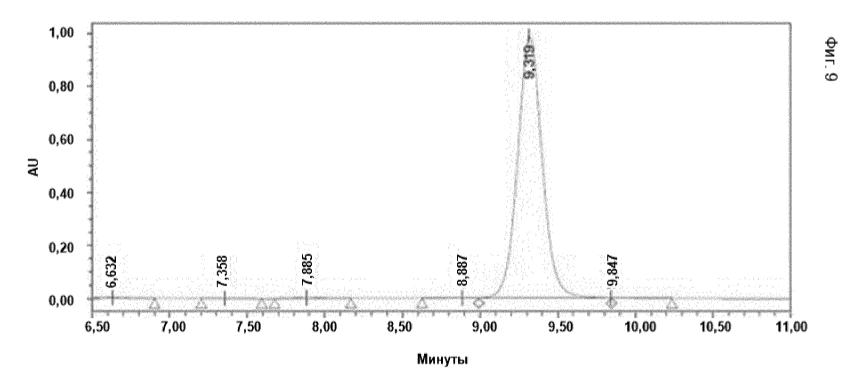


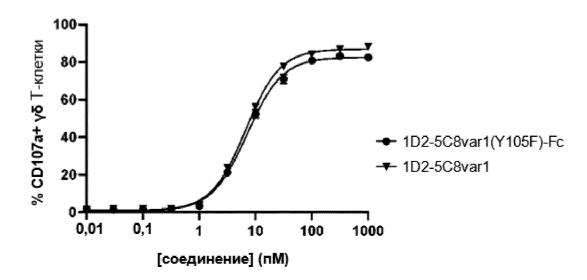
Фиг. 8





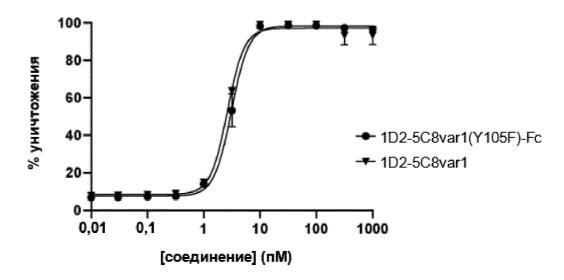






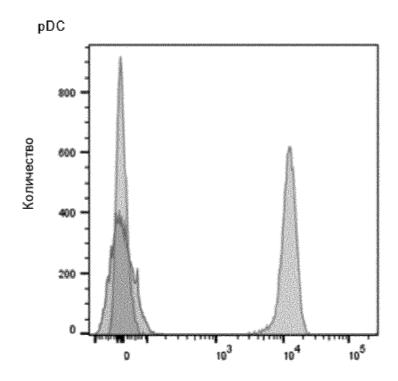
	EC50
1D2-5C8var1(Y105F)-Fc	7,120
1D2-5C8var1	6,728

Фиг. 11

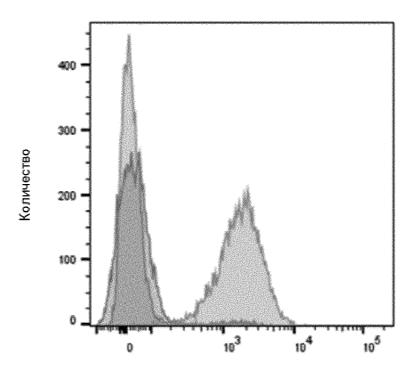


	EC50
1D2-5C8var1(Y105F)-Fc	3,116
1D2-5C8var1	2,636

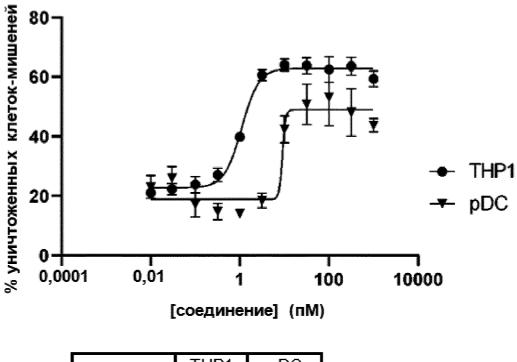
Фиг. 12



THP-1



Фиг. 13



	THP1	pDC
EC50	1,102	9,045

14/28

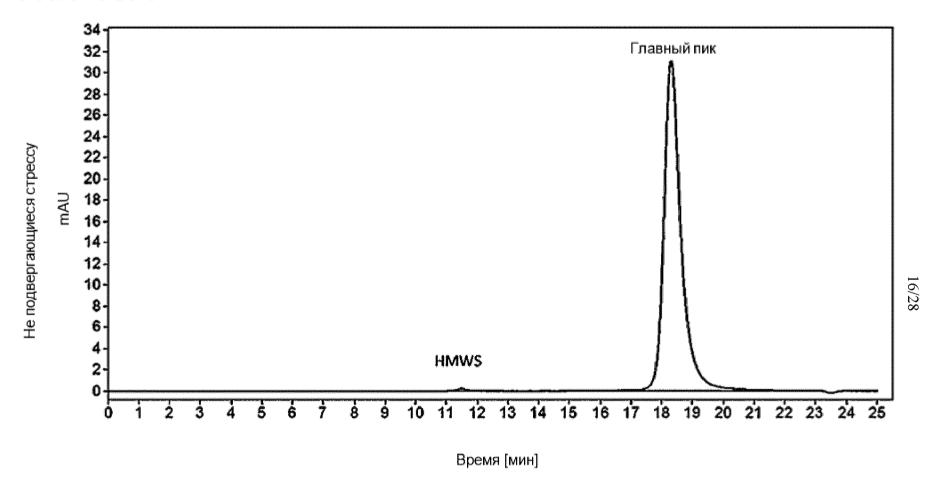
Þ
donn
L
3
4

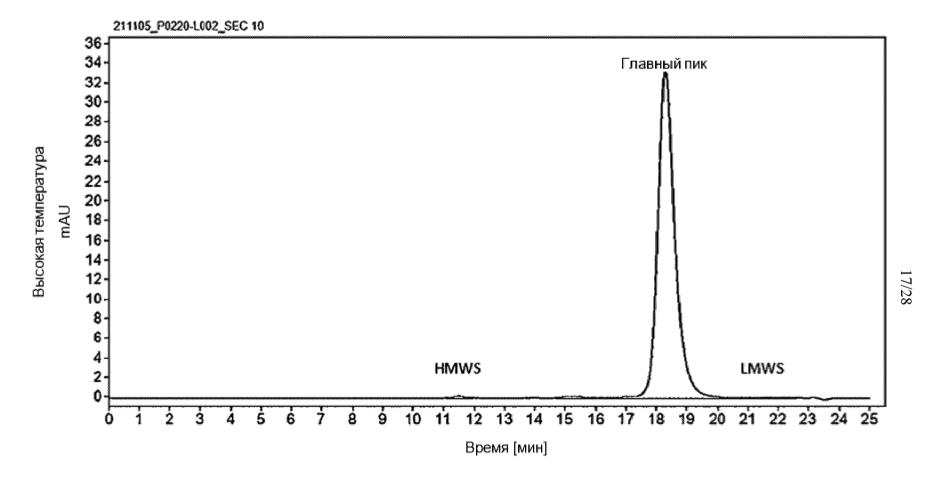
10	20	30	40	50	60	70	80	90
MALTMELTER	IALFCLLQTK	EDPNPPITNL	RMKAKAÇQLT	WDLNRNVTDI	ECVKDADYSM	PAVNNSYCQF	GAISLCEVIN	YTVRVANPPF
100	110	120	130	140	150	160	170	180
STWILFPENS	GKPWAGAENL	TCWIHDVDFL	SCSWAVGPGA	PADVQYDLYL	NVANERQQYE	CLHYKTDAQG	TRIGCREDDI	SRLSSGSQSS
190	200	210	220	230	240	250	260	270
HILVEGESAA	FGIPCTDKFV	VFSQIEILTP	PRMTAKCNKT	H.SPMHWMRS	HENRKFRYEL	QIQKRMQPVI	TEQVEDRTSF	Application and the second sec
280	290	300	310	320	330	340	350	360
QIRARERVYE	FLSAMSTPQR	FECDQEEGAN	TRAWRISLLI	ALGTLLALVC	VFVICRRYLV	MQRLFPRIPH	MKDPIGDSFQ	NDKLVVWEAG
370	378							
KAGLEECLVT	EVOVVOKT							

Фиг. 15

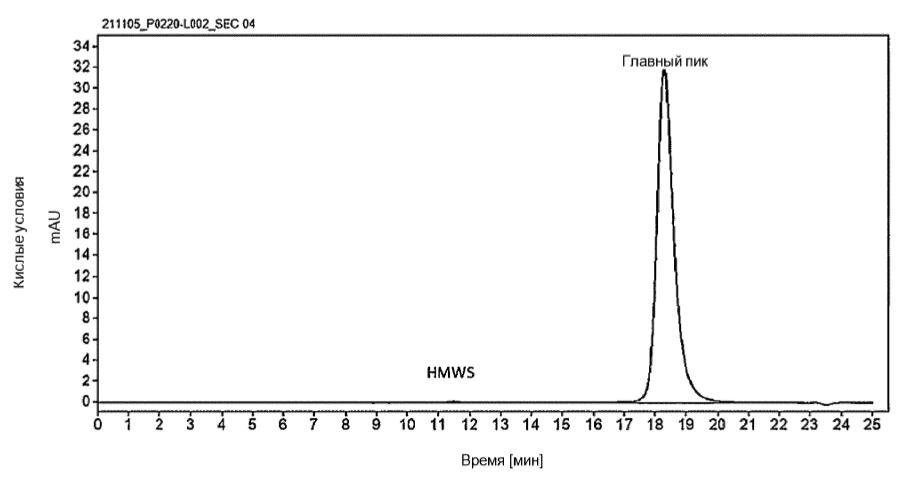


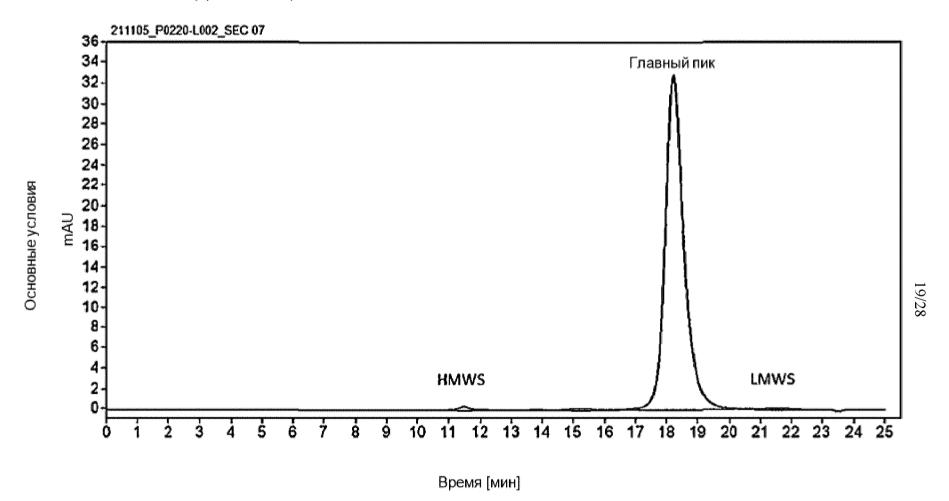
Фиг. 16А



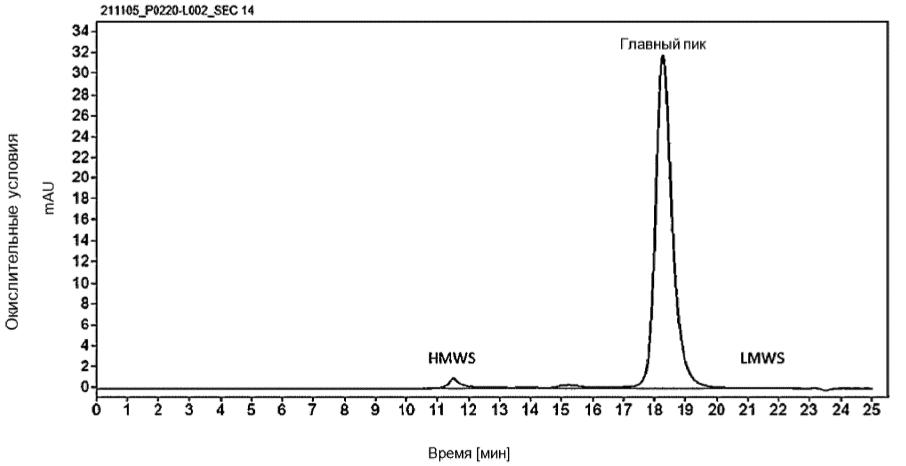


Фиг. 16А (продолжение)

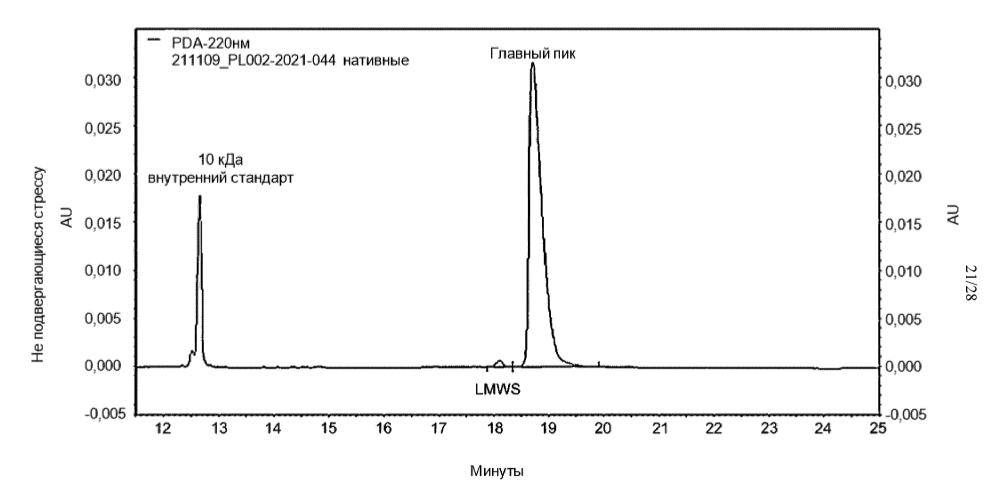




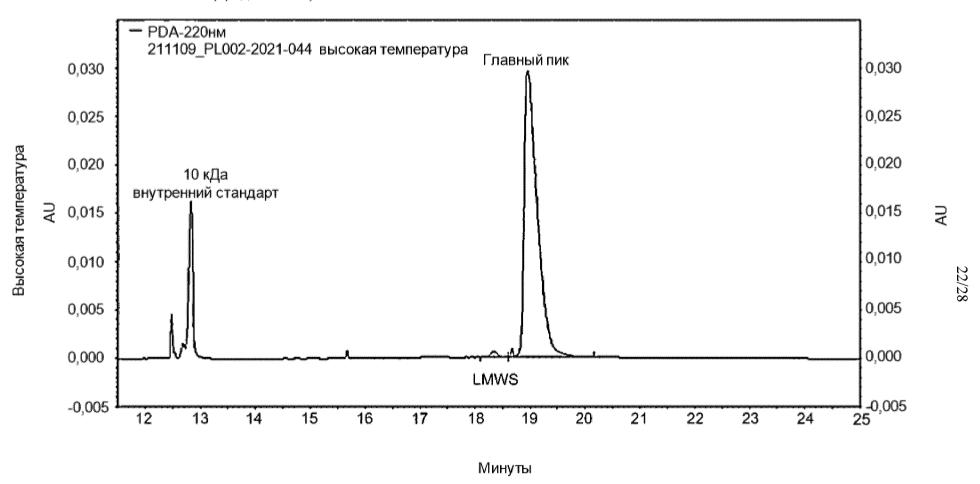
Фиг. 16А (продолжение)



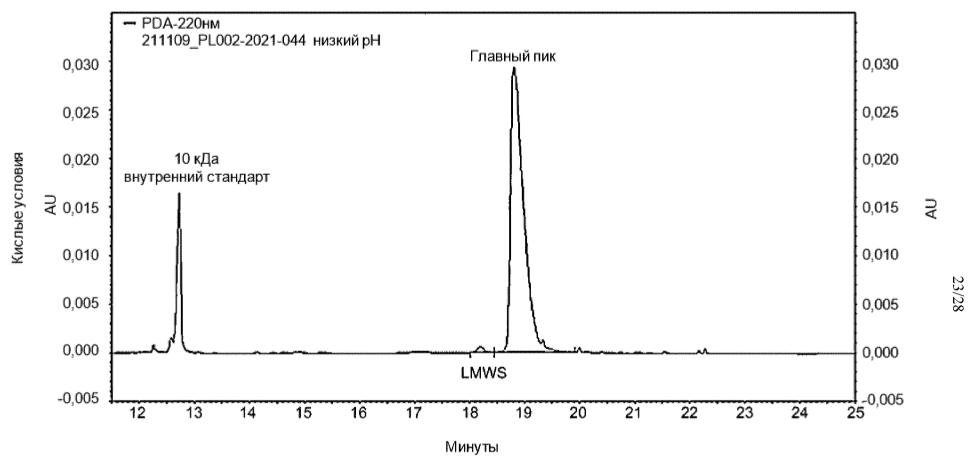
Фиг. 16В



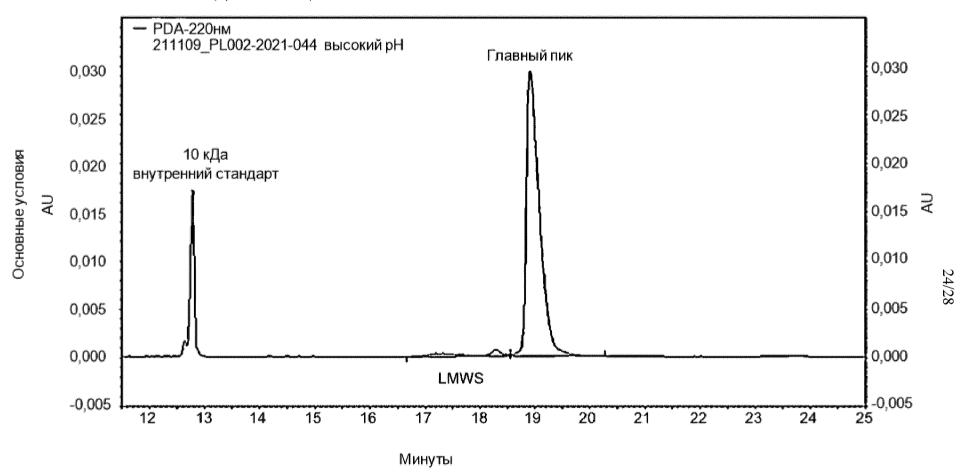
Фиг. 16В (продолжение)



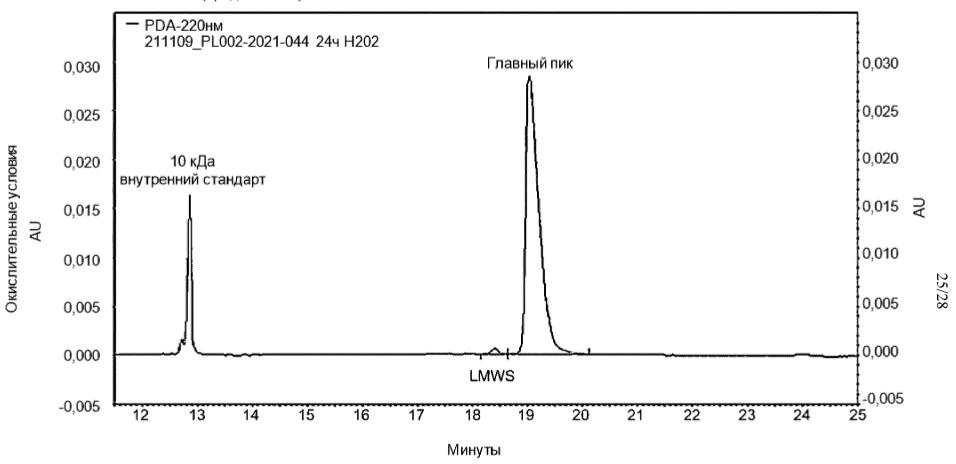
Фиг. 16В (продолжение)



Фиг. 16В (продолжение)

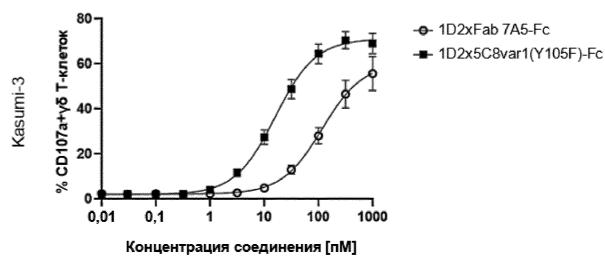


Фиг. 16В (продолжение)

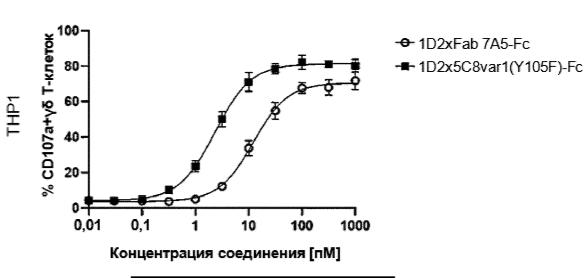


Фиг. 17А

Дегрануляция

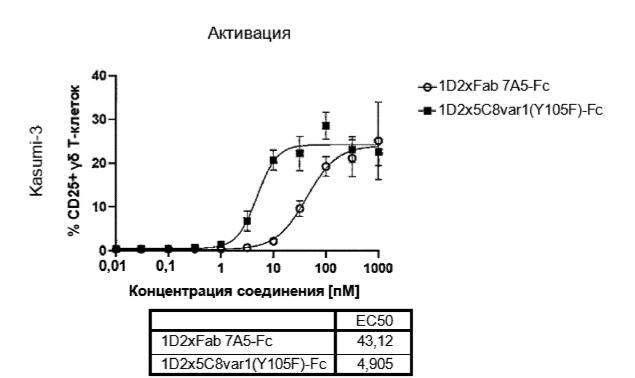


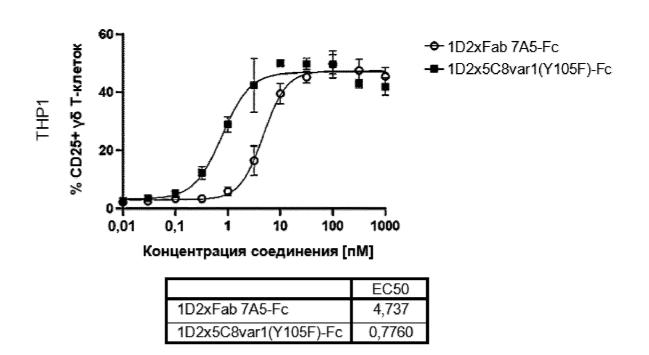
	EC50
1D2xFab 7A5-Fc	117,6
1D2x5C8var1(Y105F)-Fc	16,02



	EC50
1D2xFab 7A5-Fc	12,24
1D2x5C8var1(Y105F)-Fc	2,341

Фиг. 17В

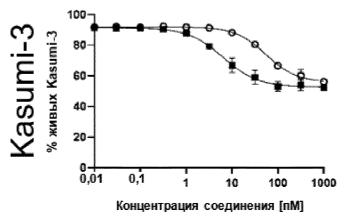




-O- 1D2xFab 7A5-Fc

■ 1D2x5C8var1(Y105F)-Fc

С Цитотоксичность



	EC50
1D2xFab 7A5-FC	55,00
1D2x5C8var1/Y105E\-Ec	6.438

