

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044237**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.08.03

(21) Номер заявки
201792581

(22) Дата подачи заявки
2016.05.26

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ОСТРОГО МИЕЛОГЕННОГО ЛЕЙКОЗА

(31) 62/168,641; 62/266,438

(32) 2015.05.29; 2015.12.11

(33) US

(43) 2018.07.31

(86) PCT/US2016/034479

(87) WO 2016/196230 2016.12.08

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АНДЖИ БРУНО, ЭлЭлСи (US)

(72) Изобретатель:
Евнин Люк, Гуно Жанмари, Кункель
Лори (US)

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

(56) US-A1-20120251554

FRIEDRICH et al. "Preclinical Characterization of AMG 330, a CD3/CD33-Bispecific T-Cell-Engaging Antibody with Potential for Treatment of Acute Myelogenous Leukemia", Molecular Cancer Therapeutics, 27 March 2014 (27.03.2014), Vol. 13, Iss. 6, Pgs. 1549-1557, entire document

WO-A2-2015036583

WO-A1-2013026837

REUSCH et al. "Characterization of CD33/CD3 Tetravalent Bispecific Tandem Diabodies (TandAbs) for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia", Clinical Cancer Research, 17 May 2016 (17.05.2016), Pgs. 1-30, entire document

US-B1-9212225

(57) Изобретение относится к способу лечения острого миелогенного лейкоза (AML) у пациента, перенесшего трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, который включает введение терапевтически эффективного количества гомодимерного тандемного диатела, связывающегося с человеческим CD33 и человеческим CD3.

B1

044237

**044237
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По заявке на данное изобретение испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США под номером 62/168641, поданной 29 мая 2015 г., и предварительной патентной заявки США под номером 62/266438, поданной 1 декабря 2015 г., полное содержание которых, таким образом, приведено в настоящем документе в качестве отсылки.

Список последовательностей

Заявка на данное изобретение содержит список последовательностей, который подан в электронном формате ASCII и полное содержание которого, таким образом, приведено в настоящем документе в качестве ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 25 мая 2016 г., названа 45375_705_601_SeqList.txt и имеет размер 250173 байт.

Предпосылки создания изобретения

Острый миелоидный лейкоз (AML) представляет собой острый лейкоз у взрослых и детей. CD33 экспрессируется на большинстве миелобластов при AML. В некоторых публикациях утверждается, что экспрессия CD33 в основном ограничивается ранними мультилинейными миелоидными предшественниками и отсутствует на нормальных плюрипотентных гемопоэтических стволовых клетках.

Краткое описание изобретения

В настоящем документе предлагаются связывающие белки, которые специфически связываются с человеческим CD33, и биспецифические связывающие белки, которые специфически связываются с человеческим CD33 и человеческим CD3. Также в настоящем документе предлагаются вариабельные домены анти-CD33 и вариабельные домены анти-CD3 для создания ряда биспецифических CD33/CD3-связывающих белков, таких как, например, тандемные диатела. Также в настоящем документе, кроме того, предлагаются биспецифические тандемные диатела, которые связываются с CD33 и CD3, и их применение для иммунотерапии острого миелоидного лейкоза (AML) и других гематологических злокачественных опухолей, нарушений или патологических состояний.

В частности, предлагаются связывающие белки, которые показывают связывание как с человеческим CD33, так и CD33 макак-крабоедов. В примерах продемонстрировано, что эти CD33/CD3 тандемные диатела могут перенаправлять поликлональные CD3⁺ Т-клетки от здоровых доноров, а также аутологичные Т-клетки от пациентов с AML на эффективный лизис CD33⁺ клеток AML при низких соотношениях эффектор:мишень (Е:Т). В этом процессе, который зависит от присутствия как CD33⁺ клеток-мишеней, так и Т-клеток, перенаправленные Т-клетки активируются, на что указывает индукция CD25 и CD69, и стимулируются на пролиферацию. Было показано, что эффект этих тандемных диател против AML зависит от концентрации используемых антител, а также соотношения эффектор:мишень (Е:Т). Тандемное диатело является четырехвалентным и имеет два участка связывания для CD33 и два участка связывания для CD3. Особой отличительной особенностью CD33/CD3 тандемных диател, описанных здесь, является то, что они содействуют сильному и эффективному апоптозу, возникающему в результате бивалентного связывания, которое наделяет авидностью в отношении каждого антигена, а именно CD33 и CD3.

Вкратце, предлагаемые CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, в частности тандемные диатела, индуцируют сильный цитолиз CD33⁺ лейкозных клеток и клеток первичного AML *in vitro*. Примеры биспецифических CD33/CD3-связывающих белков в формате антител, называемых тандемными диателами, демонстрируют цитолитическую активность *in vivo* в клеточных линиях, клетках первичного AML и в *in vivo* моделях с клеточными линиями AML и с клетками первичного AML, полученными от пациентов. Это указывает на высокую *in vivo* активность, особенно заметную в строгой модели PDX AML. Кроме того, примеры биспецифических CD33/CD3-связывающих белков в формате антител, называемых тандемными диателами, демонстрируют цитолитическую активность *ex vivo* в образцах, полученных от пациентов на всех стадиях AML, включая впервые диагностированных, рецидивирующих и рефракторных пациентов.

Кроме того, эти CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, способны достигать значительного лизиса CD33-экспрессирующих клеток в течение примерно 4 ч. CD33/CD3-связывающие белки, соответственно, проявляют высокую цитотоксичность при низких плотностях CD33 на клеточной поверхности, а также высокую цитотоксичность при низких соотношениях эффектор:мишень (Е:Т). Кроме того, CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, проявляют не только высокие аффинности связывания CD33 и CD3 с человеческими белками, но также показывают великолепную кросс-реактивность с соответствующими белками макак-крабоедов, например, с соотношениями K_D человек:макак-крабоед в диапазоне 5-0,2. Кроме того, CD33/CD3-связывающие белки, описанные здесь, не показывают значительной индукции высвобождения цитокина в отсутствие CD33⁺ клеток-мишеней, что является важным компонентом профиля безопасности этих молекул. Более того, CD33/CD3 тандемные диатела, описанные здесь, принадлежат к классу молекул, которые имеют периоды полувыведения в интервале примерно 8-24 ч, что должно обеспечить удобное дозирование.

В одном аспекте в настоящем документе предлагаются CD33-связывающие белки, которые специфически связываются с эпитопом человеческого CD33. В некоторых вариантах осуществления связывающие белки содержат вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, проис-

ходящие от человека.

В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит по меньшей мере один участок связывания, содержащий вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, при этом вариабельный домен легкой цепи содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-27, CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28-34, и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-41.

В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок имеет по меньшей мере один участок связывания, содержащий вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи, при этом вариабельный домен тяжелой цепи содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48, CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-55, и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-63.

В определенных случаях участки CDR1, CDR2 и CDR3 вариабельного домена легкой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 28 и 35; SEQ ID NO: 22, 29 и 36; SEQ ID NO: 23, 30 и 37; SEQ ID NO: 24, 31 и 38; SEQ ID NO: 25, 32 и 39; SEQ ID NO: 26, 33 и 40; и SEQ ID NO: 27, 34 и 41.

В определенных случаях участки CDR1, CDR2 и CD3 вариабельного домена тяжелой цепи выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 49 и 56; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 58; SEQ ID NO: 43, 50 и 59; SEQ ID NO: 43, 50 и 60; SEQ ID NO: 44, 51 и 61; SEQ ID NO: 45, 52 и 62; SEQ ID NO: 46, 53 и 63; SEQ ID NO: 47, 54 и 63 и SEQ ID NO: 48, 55 и 63.

В определенных случаях участок связывания с человеческим CD33 вариабельного домена тяжелой цепи и вариабельного домена легкой цепи выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления эпитоп CD33 находится в пределах ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) аминокислотных остатков 62-70 SEQ ID NO: 93 человеческого CD33.

В любом из указанных выше вариантов осуществления CD33-связывающий белок содержит по меньшей мере один дополнительный функциональный домен. В некоторых случаях функциональный домен представляет собой эффекторный домен, который связывается с эффекторной клеткой. В определенных случаях эффекторный домен представляет собой CD3-связывающий участок, содержащий по меньшей мере один вариабельный домен тяжелой цепи антитела и по меньшей мере один вариабельный домен легкой цепи антитела, образуя антигенсвязывающий участок для человеческого CD3.

В определенных случаях CD3-связывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность CDR1 STYAMN (SEQ ID NO: 72), последовательность CDR2 RIR-SKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73) и последовательность CDR3 HGNGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74).

В других случаях CD3-связывающий участок содержит вариабельный домен легкой цепи, имеющий последовательность CDR1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), последовательность CDR2 GTNKRAP и последовательность CDR3 ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

В определенных случаях CD3-связывающий участок содержит вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 64 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 68; вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 65 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 69; вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 66 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 70 или вариабельный домен тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 67 и вариабельный домен легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 71.

В любом из указанных выше вариантов осуществления CD33-связывающий белок представляет собой димерный белок. В любом из указанных выше вариантов осуществления CD33-связывающий белок является мультифункциональным.

В определенных случаях мультифункциональный CD33-связывающий белок обладает биспецифичностью в отношении CD33 и CD3, при этом специфичности связывания обеспечены вариабельным доменом тяжелой цепи и вариабельным доменом легкой цепи для CD33 и CD3, выбранными из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71 и SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются биспецифические антигенсвязывающие тандемные диатела, специфические в отношении человеческого CD3 и человеческого CD33. В некоторых вариантах осуществления тандемные диатела содержат первый полипептид и второй полипептид,

при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре переменных домена цепи, связанных друг с другом, при этом каждый полипептид содержит переменный домен тяжелой цепи, специфический в отношении человеческого CD33; переменный домен легкой цепи, специфический в отношении человеческого CD33; переменный домен тяжелой цепи, специфический в отношении человеческого CD3, и переменный домен легкой цепи, специфический в отношении человеческого CD3, и при этом в каждом полипептиде четыре переменных домена цепи связаны друг с другом пептидными линкерами L1, L2 и L3 в следующем порядке:

VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3); VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); или VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).

В некоторых вариантах осуществления VL-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-27, CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28-34, и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-41.

В некоторых вариантах осуществления VH-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48, CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-55, и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-63.

В некоторых вариантах осуществления участки CDR1, CDR2 и CDR3 VL-домена, специфического в отношении человеческого CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 28 и 35; SEQ ID NO: 22, 29 и 36; SEQ ID NO: 23, 30 и 37; SEQ ID NO: 24, 31 и 38; SEQ ID NO: 25, 32 и 39; SEQ ID NO: 26, 33 и 40 и SEQ ID NO: 27, 34 и 41.

В некоторых вариантах осуществления участки CDR1, CDR2 и CDR3 VH-домена, специфического в отношении человеческого CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 49 и 56; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 58; SEQ ID NO: 43, 50 и 59; SEQ ID NO: 43, 50 и 60; SEQ ID NO: 44, 51 и 61; SEQ ID NO: 45, 52 и 62; SEQ ID NO: 46, 53 и 63; SEQ ID NO: 47, 54 и 63 и SEQ ID NO: 48, 55 и 63.

В некоторых вариантах осуществления VL- и VH-домены, специфические в отношении CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 11; SEQ ID NO: 2 и 12; SEQ ID NO: 3 и 13; SEQ ID NO: 4 и 14; SEQ ID NO: 5 и 15; SEQ ID NO: 6 и 16; SEQ ID NO: 7 и 17; SEQ ID NO: 8 и 18; SEQ ID NO: 9 и 19; SEQ ID NO: 10 и 20.

В некоторых вариантах осуществления VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит последовательность CDR1 STYAMN (SEQ ID NO: 72), последовательность CDR2 (RIR-SKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73), последовательность и последовательность CDR3 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74) или HGNFGNSYVSYFAY (SEQ ID NO: 75).

В некоторых вариантах осуществления VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит последовательность CDR1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), последовательность CDR2 GTNKRAP (SEQ ID NO: 91) и последовательность CDR3 ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

В некоторых вариантах осуществления VL- и VH-домены, специфические в отношении CD3, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 и 68; SEQ ID NO: 65 и 69; SEQ ID NO: 66 и 70 и SEQ ID NO: 67 и 71.

В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид содержит четыре переменных домена цепи, выбранных из группы, состоящей из

SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71 и SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

В некоторых вариантах осуществления линкеры L1, L2 и L3 состоят из около 12 аминокислотных остатков или менее. В определенных случаях линкеры L1, L2 и L3, каждый, независимо представляют собой GGSGGS (SEQ ID NO: 95), GGSG (SEQ ID NO: 96) или GGSGG (SEQ ID NO: 97).

В других случаях линкеры L1 и L3 представляют собой GGSGGS (SEQ ID NO: 95) и линкер L2 представляет собой GGSG (SEQ ID NO: 96) или GGSGG (SEQ ID NO: 97).

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое тандемное диатело, с С-концевой гексистиридиновой (6×His)-меткой, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-121. В других вариантах осуществления биспецифическое тандемное диатело представляет собой тандемное диатело

человеческого CD33.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются полинуклеотиды, кодирующие CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело по любому из указанных выше вариантов осуществления. В другом аспекте в настоящем документе предлагаются векторы, содержащие описанные полинуклеотиды. В другом аспекте в настоящем документе предлагаются клетки-хозяева, трансформированные описанными векторами.

В еще другом аспекте в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело по любому из описанных выше вариантов осуществления и фармацевтически приемлемый носитель.

В еще другом аспекте в настоящем документе предлагаются способы получения CD33-связывающего белка или биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления, включающие введение в клетку-хозяина полинуклеотида, кодирующего CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело по любому из описанных выше вариантов осуществления, или вектора, содержащего описанные полинуклеотиды, культивирование клетки-хозяина в условиях, в которых экспрессируется CD33-связывающий белок или биспецифическое тандемное диатело, и очистку экспрессируемого CD33-связывающего белка или биспецифического тандемного диатела.

Также в настоящем документе предлагаются способы лечения CD33⁺ рака, включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему CD33⁺ раком. В некоторых вариантах осуществления CD33⁺ рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфобластный лейкоз (ALL), лимфобластный лейкоз из предшественников В-клеток, миелоидную саркому, множественную миелому, острую лимфому, острую лимфобластную лимфому или хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML). В некоторых вариантах осуществления CD33⁺ рак представляет собой острый миелоидный лейкоз (AML). В некоторых вариантах осуществления CD33⁺ рак представляет собой множественную миелому. В некоторых вариантах осуществления CD33⁺ рак представляет собой острый лимфобластный лейкоз (ALL).

Также, в настоящем документе предлагаются способы лечения острого миелоидного лейкоза (AML), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему AML. В некоторых вариантах осуществления AML представляет собой AML с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями, AML с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей терапией, миелоидную саркому, миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна, опухоль из бластных плазматитоидных дендритных клеток или AML, не отнесенные к какой-либо категории. В некоторых вариантах осуществления AML представляет собой AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7. В других вариантах осуществления AML является впервые диагностированным, рецидивирующим или рефракторным.

Также в настоящем документе предлагаются способы лечения миелодиспластического синдрома (MDS), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему MDS.

Также в настоящем документе предлагаются способы лечения миелопролиферативного заболевания (MPD), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему MPD.

Также в настоящем документе предлагаются способы лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему CMML.

Также в настоящем документе предлагаются способы лечения иммуносупрессии, вызванной супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC), включающие введение биспецифического тандемного диатела по любому из описанных выше вариантов осуществления индивидууму, страдающему иммуносупрессией.

В некоторых случаях вышеуказанные способы лечения, кроме того, включают введение цитарабина, азацитина, децитабина, антрациклина (например, даунорубицина, идарубицина, доксорубицина и т.п.), амсакрина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эпитопофиллотоксина (например, этопозида, тенипозида и т.п.), антрацендиона (например, митоксантрона, пиксантрона, лозоксантрона, пироксантрона, аметантрона и т.п.), анти-CD20 агента (например, ритуксимаба, окрелизумаба, офатумумаба и т.п.) или их комбинаций.

В настоящем документе предлагаются способы лечения острого миелоидного лейкоза (AML) у пациента, перенесшего трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, включающие введение терапевтически эффективного количества белка, который связывается с человеческим CD33 и человеческим CD3. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы, в которых трансплантация является аллогенной. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы, в которых трансплантация является аутологичной. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы, в которых паци-

ент не получает режим кондиционирования. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы, кроме того, включающие применение режима кондиционирования у пациента. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы, в которых режим кондиционирования является миелоаблативным. В некоторых вариантах осуществления предлагаются способы, в которых режим кондиционирования является немиелоаблативным.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят после режима кондиционирования. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых пациент находится в полной ремиссии. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых пациент имеет минимальное остаточное заболевание. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых применение химиотерапии или облучения оказалось неэффективным у пациента. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых применение индукционной химиотерапии оказалось неэффективным у пациента. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых применение консолидирующей или поддерживающей (постремиссионной) химиотерапии оказалось неэффективным у пациента.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых АМЛ является рецидивирующим. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых АМЛ является рефракторным. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых имеется высокий риск АМЛ или АМЛ находится в ремиссии. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят сразу же после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят через три дня после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят через семь дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят через две недели после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят через четыре недели после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из четырех недель, восьми недель, трех месяцев, четырех месяцев, шести месяцев, восьми месяцев, десяти месяцев, двенадцати месяцев, восемнадцати месяцев и двадцати четырех месяцев. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят во время прогрессирования в аллогенных условиях с донорскими лимфоцитами. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок вводят во время прогрессирования в аллогенных условиях без донорских лимфоцитов.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок содержит домены тяжелой и легкой цепей, специфические в отношении человеческого CD33 и человеческого CD3. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок представляет собой антитело или производное антитела. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок содержит фрагменты Fab, Fab' или F(ab')₂. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент, tandemный одноцепочечный Fv-фрагмент, ViTE-антитело (Vi-specific T-cell engager), переориентирующееся антитело с двойной аффинностью, диатело или биспецифическое tandemное диатело. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых белок представляет собой биспецифическое tandemное диатело. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых tandemное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре переменных домена цепи, связанных друг за другом, при этом каждый полипептид содержит переменный домен тяжелой цепи (VH), специфический в отношении человеческого CD33; переменный домен легкой цепи (VL), специфический в отношении человеческого CD33; VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3, и VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых в каждом полипептиде четыре переменных домена цепи связаны друг с другом посредством пептидных линкеров L1, L2 и L3 в следующем порядке:

VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-

VL(CD33)-L3-VH(CD3); VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3); VL(CD33)-
L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); или VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-
VL(CD33).

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых VL-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-27, CDR2, имеющий последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28-34, и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-41.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых VH-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48, CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-55, и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-63. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых участки CDR1, CDR2 и CDR3 VL-домена, специфического в отношении человеческого CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 28 и 35; SEQ ID NO: 22, 29 и 36; SEQ ID NO: 23, 30 и 37; SEQ ID NO: 24, 31 и 38; SEQ ID NO: 25, 32 и 39; SEQ ID NO: 28, 33 и 40 и SEQ ID NO: 27, 34 и 41.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых участки CDR1, CDR2 и CDR3 VH-домена, специфического в отношении CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 49 и 56; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 59; SEQ ID NO: 43, 50 и 60; SEQ ID NO: 44, 51 и 61; SEQ ID NO: 45, 52 и 62; SEQ ID NO: 46, 53 и 63 и SEQ ID NO: 48, 55 и 63.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых VL- и VH-домены, специфические в отношении CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 11; SEQ ID NO: 2 и 12; SEQ ID NO: 3 и 13; SEQ ID NO: 4 и 14; SEQ ID NO: 5 и 15; SEQ ID NO: 6 и 16; SEQ ID NO: 7 и 17; SEQ ID NO: 8 и 18; SEQ ID NO: 9 и 19; SEQ ID NO: 10 и 20.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит последовательность CDR1 STYAMN (SEQ ID NO: 72), последовательность CDR2 RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73) и последовательность CDR3 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74) или HGNFGNSYVSFYAY (SEQ ID NO: 75).

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит последовательность CDR1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), последовательность CDR2 GTNKRAP (SEQ ID NO: 91) и последовательность CDR3 ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых VL- и VH-домены, специфические в отношении CD3, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 и SEQ ID NO: 68; SEQ ID NO: 65 и SEQ ID NO: 69; SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 67 и SEQ ID NO: 71. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых каждый полипептид содержит четыре переменных домена цепи, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71 и SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых линкеры L1, L2 и L3 состоят из около 12 аминокислотных остатков или менее. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых линкеры L1, L2 и L3, каждый, независимо выбраны из GGSGGS (SEQ ID NO: 95) GGSG (SEQ ID NO: 96) или GGSGG (SEQ ID NO: 97).

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых тандемное диатело с C-концевой гекса-гистидиновой (6xHis)-меткой имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-121. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых тандемное диатело представляет собой тандемное диатело

01 (SEQ ID NO:98), 02 (SEQ ID NO:99), 03 (SEQ ID NO:100), 04 (SEQ ID NO:101),
05 (SEQ ID NO:102), 06 (SEQ ID NO:103), 07 (SEQ ID NO:104), 08 (SEQ ID NO:105), 09
(SEQ ID NO:106), 10 (SEQ ID NO:107), 11 (SEQ ID NO:108), 12 (SEQ ID NO:109), 13 (SEQ
ID NO:110), 14 (SEQ ID NO:111), 15 (SEQ ID NO:112), 16 (SEQ ID NO:113), 17 (SEQ ID
NO:114), 18 (SEQ ID NO:115), 19 (SEQ ID NO:116), 20 (SEQ ID NO:117), 21 (SEQ ID
NO:118), 22 (SEQ ID NO:119), 23 (SEQ ID NO:120) или 24 (SEQ ID NO:121).

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых тандемное диатело имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-146. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых тандемное диатело представляет собой тандемное диатело

01 (SEQ ID NO:123), 02 (SEQ ID NO:124), 03 (SEQ ID NO:125), 04 (SEQ ID NO:126), 05 (SEQ ID NO:127), 06 (SEQ ID NO:128), 07 (SEQ ID NO:129), 08 (SEQ ID NO:130), 09 (SEQ ID NO:131), 10 (SEQ ID NO:132), 11 (SEQ ID NO:133), 12 (SEQ ID NO:134), 13 (SEQ ID NO:135), 14 (SEQ ID NO:136), 15 (SEQ ID NO:137), 16 (SEQ ID NO:138), 17 (SEQ ID NO:139), 18 (SEQ ID NO:140), 19 (SEQ ID NO:141), 20 (SEQ ID NO:142), 21 (SEQ ID NO:143), 22 (SEQ ID NO:144), 23 (SEQ ID NO:145) или 24 (SEQ ID NO:146).

В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, кроме того, включающие введение цитарабина, азациитидина, децитабина, антрациклина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эпиподофиллотоксина, антраценедиона, анти-CD20 агента или их комбинаций. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых AML представляет собой AML с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями, AML с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей терапией, миелоидную саркому, миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна, опухоль из бластных плазмацитоидных дендритных клеток или AML, не отнесенные к какой-либо категории. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых AML представляет собой AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых введение белка пациенту, перенесшему аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток после применения миелоаблативного режима кондиционирования, приводит к улучшенной общей частоте ответов на терапию белком. В любом из указанных выше вариантов осуществления предлагаются способы, в которых введение белка пациенту, перенесшему аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток после применения немиелоаблативного режима кондиционирования, приводит к улучшенной общей частоте ответов на терапию белком. Включение посредством ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в той же самой степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

Новые признаки изобретения представлены подробно в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к следующему подробному описанию с иллюстративными вариантами осуществления, в которых использованы принципы изобретения, и сопровождающим чертежам, на которых показано:

фиг. 1 - схематическое изображение организации генов и порядка доменов CD3/CD33 тандемных диател (TandAb®). Тандемные диатела экспрессируются в виде единичного полипептида, состоящего из четырех переменных доменов, соединенных посредством коротких пептидных линкеров L1, L2 и L3. После экспрессии два мономерных полипептида ассоциируют нековалентно по принципу "голова-к-хвосту" с образованием молекулы функционального гомодимерного тандемного диатела. L1, L2, L3: линкер; V_H: переменный домен тяжелой цепи; V_L: переменный домен легкой цепи;

фиг. 2 - CD3-захватывающее тандемное диатело и его механизм действия. Тандемные диатела представляют собой четырехвалентные биспецифические белки, которые могут захватывать цитотоксические Т-клетки посредством связывания с CD3. Тандемное диатело связывается с CD33⁺ опухолевой клеткой с помощью двух из четырех связывающих доменов и с CD3 с помощью других двух связывающих доменов. Это событие связывания (перекрестного сшивания) Т-клетка/клетка-мишень способствует активации Т-клетки и последующему разрушению опухолевой клетки посредством ADCC;

фиг. 4 - сравнение позитивно обогащенных и подвергнутых негативной селекции Т-клеток здоровых доноров. Клетки KG-1a инкубировали с 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) и 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) одного из 10 выбранных тандемных диател и либо подвергнутыми негативной селекции Т-клетками здоровых доноров, либо подвергнутыми позитивной селекции Т-клетками здоровых доноров при соотношении эффектор:мишень (Е:Т), равном 1:1 или 3:1, как указано. Через 48 ч определяли число клеток и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания DAPI. Результаты показаны в виде среднего значения ± SEM для процентного содержания погибших клеток (верхние панели) и процента специфической цитотоксичности (нижние панели) по данным 3 независимых экспериментов, выполненных в лунках в двух повторах;

фиг. 5 - стратегия анализа. Графики рассеяния и гистограммы для одной аликвоты Т-клеток здоровых доноров и одной репрезентативной клеточной линии AML (HL-60) и образца первичного AML (AMP002), каждый из которых иллюстрирует стратегию определения цитотоксичности, индуцированной тандемным диателом. FSC, прямое светорассеяние; SSC, боковое светорассеяние;

фиг. 6 - скрининговые анализы на цитотоксичность в CD33⁺ клеточных линиях AML. Родительские

клетки HL-60 (A, B) и KG-1a (C, D) инкубировали с 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) и 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) одной из 22 молекул CD33/CD3 тандемных диател или несвязывающегося контрольного тандемного диатела (00) и Т-клетками здоровых доноров при соотношении эффектор:мишень (Е:Т) 1:1 (A, C) или 5:1 (B,D), как указано. Через 48 ч определяли число клеток и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания DAPI для количественного определения специфической к лекарственному средству цитотоксичности. Результаты показаны в виде среднего значения \pm SEM для процентного содержания DAPI⁺ клеток по данным трех независимых экспериментов, выполненных в лунках в двух повторах. Количественно схожие результаты получали при выражении цитотоксичности в виде процента специфической цитотоксичности;

фиг. 7 - отбор образцов первичного AML для исследования. Для анализа получали замороженные аликвоты из образцов первичного AML человека. Процентное содержание бластов AML после оттаивания определяли с помощью проточной цитометрии на основании свойств CD45/бокового светорассеяния. Жизнеспособность образцов определяли после оттаивания, а также через 48 ч в содержащей цитокин жидкой культуре (без добавления молекул тандемных диател или Т-клеток здоровых доноров) путем проточной цитометрии с использованием DAPI в качестве маркера живых/погибших клеток. Результаты по жизнеспособности после оттаивания, а также через 48 ч показаны для всех образцов, которые имели >58% бластов AML. Квадрат: образцы первичной AML, которые показали жизнеспособность >50% после оттаивания, а также >50% через 48 ч в цитокинсодержащей жидкой культуре, которые были включены в конечные анализы;

фиг. 8 - индуцированная тандемный диателом цитотоксичность в образцах первичного AML. Образцы первичного AML инкубировали с 2,5 пМ (приблизительно 250 пг/мл), 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) и 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) одной из 9 молекул тандемных диател без добавленных Т-клеток здоровых доноров или с Т-клетками здоровых доноров при соотношении эффектор:мишень (Е:Т) 1:3 (B) или 1:1 (C), как указано. Через 48 ч определяли число клеток и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания DAPI для количественного определения специфической к лекарственному средству цитотоксичности. Результаты показаны в виде среднего значения \pm SEM для процента специфической цитотоксичности по данным экспериментов, выполненных в лунках в двух повторах;

фиг. 9- аминокислотная последовательность внеклеточного домена человеческого CD33 (aa 18-259) (SEQ ID NO: 93);

фиг. 10 - аминокислотные последовательности:

(A) полная последовательность тандемного диатела 1 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 98);

(B) полная последовательность тандемного диатела 2 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 99);

(C) полная последовательность тандемного диатела 3 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 100);

(D) полная последовательность тандемного диатела 4 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 101);

(E) полная последовательность тандемного диатела 5 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 102);

(F) полная последовательность тандемного диатела 6 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 103);

(G) полная последовательность тандемного диатела 7 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 104);

(H) полная последовательность тандемного диатела 8 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 105);

(I) полная последовательность тандемного диатела 9 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 106);

(J) полная последовательность тандемного диатела 10 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 107);

(K) полная последовательность тандемного диатела 11 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 108);

(L) полная последовательность тандемного диатела 12 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 109);

(M) полная последовательность тандемного диатела 13 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 110);

(N) полная последовательность тандемного диатела 14 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ IDNO:111);

(O) полная последовательность тандемного диатела 15 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 112);

(P) полная последовательность tandemного диатела 16 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 113);

(Q) полная последовательность tandemного диатела 17 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 114);

(R) полная последовательность tandemного диатела 18 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 115);

(S) полная последовательность tandemного диатела 19 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 116);

(T) полная последовательность tandemного диатела 20 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 117);

(U) полная последовательность tandemного диатела 21 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 118);

(V) полная последовательность tandemного диатела 22 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 119);

(W) полная последовательность tandemного диатела 23 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 120) и

(X) полная последовательность tandemного диатела 24 с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой (SEQ ID NO: 121).

Подчеркнутые последовательности представляют линкеры L1, L2 и L3; фиг. 11 - аминокислотные последовательности:

(A) полная последовательность tandemного диатела 1 (SEQ ID NO: 123);

(B) полная последовательность tandemного диатела 2 (SEQ ID NO: 124);

(C) полная последовательность tandemного диатела 3 (SEQ ID NO: 125);

(D) полная последовательность tandemного диатела 4 (SEQ ID NO: 126);

(E) полная последовательность tandemного диатела 5 (SEQ ID NO: 127);

(F) полная последовательность tandemного диатела 6 (SEQ ID NO: 128);

(G) полная последовательность tandemного диатела 7 (SEQ ID NO: 129);

(H) полная последовательность tandemного диатела 8 (SEQ ID NO: 130);

(I) полная последовательность tandemного диатела 9 (SEQ ID NO: 131);

(J) полная последовательность tandemного диатела 10 (SEQ ID NO: 132);

(K) полная последовательность tandemного диатела 11 (SEQ ID NO: 133);

(L) полная последовательность tandemного диатела 12 (SEQ ID NO: 134);

(M) полная последовательность tandemного диатела 13 (SEQ ID NO: 135);

(N) полная последовательность tandemного диатела 14 (SEQ ID NO: 136);

(O) полная последовательность tandemного диатела 15 (SEQ ID NO: 137);

(P) полная последовательность tandemного диатела 16 (SEQ ID NO: 138);

(Q) полная последовательность tandemного диатела 17 (SEQ ID NO: 139);

(R) полная последовательность tandemного диатела 18 (SEQ ID NO: 140);

(S) полная последовательность tandemного диатела 19 (SEQ ID NO: 141);

(T) полная последовательность tandemного диатела 20 (SEQ ID NO: 142);

(U) полная последовательность tandemного диатела 21 (SEQ ID NO: 143);

(V) полная последовательность tandemного диатела 22 (SEQ ID NO: 144);

(W) полная последовательность tandemного диатела 23 (SEQ ID NO: 145) и

(X) полная последовательность tandemного диатела 24 (SEQ ID NO: 146).

Подчеркнутые последовательности представляют линкеры L1, L2 и L3;

фиг. 12 - эффект tandemных диател 16 и 12 на рост клеток HL-60 у мышей NOD/scid. Восемь экспериментальных групп иммунодефицитных мышей NOD/scid подвергали ксенотрансплантации путем подкожной инъекции суспензии 4×10^6 клеток HL-60 на 0 день. Перед инъекцией клетки HL-60 смешивали с 3×10^6 очищенных Т-клеток от здоровых доноров. Все животные экспериментальных групп, трансплантированные опухолевыми клетками и Т-клетками, получали внутривенный болюс на 0, 1, 2, 3 и 4 день, содержащий носитель (контроль) или tandemное диатело 16 или 12 при трех различных уровнях доз, как указано (0,1, 1 и 10 мкг). Одна группа без обработки эффекторными клетками и носителем служила в качестве дополнительного негативного контроля;

фиг. 13 - противоопухолевая активность tandemного диатела 16 в модели ксенотрансплантата AML. Мышей NOD/scid сублетально облучали (2 Gy) и подкожно инокулировали 4×10^6 клеток HL-60. На 9 день животные получали единичную болюсную инъекцию анти-Asialo-GM1 кроличьего антитела. Когда опухоли достигали объема 50-150 мм³ (среднее значение 73 ± 11 мм³) на 10 день животных распределяли по трем лечебным группам. Группам 2 и 3 (n=8) интраперитонеально инъецировали $1,5 \times 10^7$ размноженных и активированных человеческих Т-клеток. С 13 по 21 день (qdx9) животные получали tandemное диатело 16 (группа 3) или носитель в латеральную хвостовую вену (группа 1 и группа 2);

фиг. 14 - относительное количество (A) и абсолютное число (B) бластов AML человека в костном

мозге (BM) и селезенке мышей NSG на 38 день после лечения 5 мкг (0,25 мг/кг) или 50 мкг (2,5 мг/кг) CD33/CD3 тандемного диатела 12 и 16;

фиг. 15 - кинетика лизиса клеток-мишеней, опосредованного CD33/CD3 тандемным диателом 16. 1×10^4 Кальцеин-меченых клеток-мишеней HL-60 инкубировали с первичными Т-клетками человека в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т 25:1 в присутствии серийных разведений тандемного диатела 16 или без антитела (w/o) в течение 30 мин, 1, 2, 3, 4 или 5 ч. В каждый момент времени флуоресцентный кальцеин, высвобождаемый из лизированных клеток-мишеней, использовали для расчета специфического лизиса. Среднее значение и SD трех повторов наносили на график;

фиг. 16 - кинетика EC_{50} и величины специфического лизиса для CD33/CD3 тандемного диатела 16. Значения EC_{50} (черные сплошные круги) и опосредованный тандемным диателом 16 лизис клеток-мишеней (незакрашенные квадраты) определяли в анализах цитотоксичности по высвобождению кальцеина при указанных значениях времени инкубации с помощью нелинейной регрессии/сигмоидальной кривой доза-эффект и наносили на график;

фиг. 17 - цитотоксическая активность у пациентов с впервые диагностированным, рецидивирующим и рефракторным AML.

Подробное описание изобретения

В соответствии с первым аспектом в настоящем документе описаны связывающие белки, обладающие специфичностью в отношении по меньшей мере CD33, предпочтительно человеческого CD33. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающие белки обладают специфичностью в отношении человеческого CD33 и CD33 макак-крабоедов, т.е. являются кросс-реактивными. В некоторых вариантах осуществления эти кросс-реактивные связывающие белки связываются с человеческим CD33 и CD33 макак-крабоедов со сходной аффинностью.

CD33 экспрессируется на миелоидных клетках, например, таких как бласты острого миелоидного лейкоза (AML). Для выделения доменов антитела, специфических в отношении CD33, такого как человеческий CD33, могут быть подвергнуты скринингу библиотеки антител. Например, могут быть подвергнуты скринингу библиотеки фагового дисплея IgM путем использования, например, рекомбинантного CD33-Fc белка слияния, содержащего аминокислоты 1-243 внеклеточного домена человеческого CD33 (фиг. 9, SEQ ID NO: 93).

В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок имеет по меньшей мере один CD33-связывающий участок, содержащий вариабельный домен легкой цепи и вариабельный домен тяжелой цепи. Вариабельный домен легкой цепи содержит участки CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, и вариабельный домен тяжелой цепи содержит участки CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления эти участки CDR легкой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3) выбраны из человеческих последовательностей CDR, показанных в табл. 1 (SEQ ID NO: 21-41). В определенных случаях CDR1 легкой цепи выбран из SEQ ID NO: 21-27. В определенных случаях CDR2 легкой цепи выбран из SEQ ID NO: 28-34. В определенных случаях CDR3 легкой цепи выбран из SEQ ID NO: 35-41.

В некоторых вариантах осуществления эти участки CDR тяжелой цепи (CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи) выбраны из человеческих последовательностей CDR, показанных в табл. 2 (SEQ ID NO: 42-63). В определенных случаях CDR1 тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 42-48. В определенных случаях CDR2 тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 49-55. В определенных случаях CDR3 тяжелой цепи выбран из SEQ ID NO: 56-63.

В некоторых вариантах осуществления участки CDR легкой и тяжелой цепей выбраны без окружающих каркасных последовательностей соответствующих вариабельных доменов, которые включают каркасные последовательности из других иммуноглобулинов или консенсусных каркасных областей, необязательно, кроме того, мутированные и/или замененные на другие подходящие каркасные последовательности. Таким образом, в настоящем документе в некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-связывающий белок, содержащий вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 21; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 28 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 22; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 29 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 23; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 30 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 37. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 24; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 31 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 38. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 25; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 32 и CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 26; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 33

CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, при этом CDR1 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 27; CDR2 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 34 CDR3 легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 41.

Также в настоящем документе в некоторых вариантах осуществления предлагается CD33-связывающий белок, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 42; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 49 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 56. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 58. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 43; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 60. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 44; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 51 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 45; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 52 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 62. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 46; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 53 CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 47; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 54 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 63. В некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, при этом CDR1 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 48; CDR2 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 55 и CDR3 тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 63.

В других вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10, показанных в табл. 3. В других вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-20, показанных в табл. 4. В еще других вариантах осуществления CD33-связывающий белок содержит вариабельный домен легкой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1-10, показанных в табл. 3, и вариабельный домен тяжелой цепи, выбранный из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 11-20, показанных в табл. 4.

Термин "связывающий белок" относится к производному иммуноглобулина с антигенсвязывающими свойствами, т.е. полипептидам иммуноглобулина или его фрагментам, которые содержат антигенсвязывающий участок. Связывающий белок содержит вариабельные домены антитела или его фрагменты. Каждый антигенсвязывающий домен образован вариабельным доменом тяжелой цепи (VH) антитела, т.е. иммуноглобулина, и вариабельным доменом легкой цепи (VL) антитела с аналогичной эпитопной специфичностью, при этом вариабельный домен тяжелой цепи (VH) содержит три участка тяжелой цепи, определяющие комплементарность (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3; и вариабельный домен легкой цепи (VL) содержит три участка легкой цепи, определяющие комплементарность (CDR): CDR1, CDR2 и CDR3. В некоторых случаях связывающий белок в соответствии с некоторыми вариантами осуществления лишен константных доменов иммуноглобулина. В некоторых случаях вариабельные домены легкой и тяжелой цепей, образующие антигенсвязывающий участок, ковалентно связаны друг с другом, например, с помощью пептидного линкера или в других случаях вариабельные домены легкой и тяжелой цепей нековалентно ассоциированы друг с другом с образованием антигенсвязывающего участка. Термин "связывающий белок" относится также к фрагментам антитела или производным антитела, включая, например, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, одноцепочечный Fv-фрагмент, tandemный одноцепочечный Fv-фрагмент ((scFv)₂, Bi-specific T-cell engagers (BiTE®), переориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (DART™), диатело и tandemное диатело (TandAb®). Кроме того, в определенных случаях связывающий белок является мультивалентным, т.е. имеет два, три или более связывающих участка для CD33.

Таблица 1

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельной области легкой цепи анти-CD33

CDR	Идентификатор последовательности	Последовательность CDR легкой цепи
CDR1	SEQ ID NO:21	GGNNIGSTTVH
	SEQ ID NO:22	SGSRSNIGSNTVN
	SEQ ID NO:23	SGSSSNIGSNTVN
	SEQ ID NO:24	TGSSSNIGAGYDVH
	SEQ ID NO:25	SGSSSNIGSNIVN
	SEQ ID NO:26	SGSSSNIGSNTVK
	SEQ ID NO:27	SGSSSNIGDNVVN
CDR2	SEQ ID NO:28	DDNERPS
	SEQ ID NO:29	GNNQRPS
	SEQ ID NO:30	SDNQRPS
	SEQ ID NO:31	GNSNRPS
	SEQ ID NO:32	SNNQRPS
	SEQ ID NO:33	SNNQRSS
	SEQ ID NO:34	STNKRPS
CDR3	SEQ ID NO:35	QVWDSGSDH
	SEQ ID NO:36	ATWDDSLIG
	SEQ ID NO:37	ATWDDSLNG
	SEQ ID NO:38	QSYDSSLSD
	SEQ ID NO:39	AAWDDSLKG
	SEQ ID NO:40	AAWDDSLNG
	SEQ ID NO:41	AAWDDLSA

Таблица 2

Аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменной области тяжелой цепи анти-CD33

CDR	Идентификатор последовательности	Последовательность CDR тяжелой цепи
CDR1	SEQ ID NO:42	SNYGIH
	SEQ ID NO:43	TSYDIN
	SEQ ID NO:44	TSYYMH
	SEQ ID NO:45	TSYWIG
	SEQ ID NO:46	SSYAIS
	SEQ ID NO:47	SSYGIS
	SEQ ID NO:48	DSYAIS
CDR2	SEQ ID NO:49	LISYDGNKKFYADSVKG
	SEQ ID NO:50	WMNPNSGNTGFAQKFQG
	SEQ ID NO:51	GIINPSGGSTSYAQKFQG
	SEQ ID NO:52	IIYPGSDTRYSPSFQG
	SEQ ID NO:53	GIYPIFGSANYAQKFQG
	SEQ ID NO:54	GIPIFGSAHYAQKFQG
	SEQ ID NO:55	GIPIFGSAHYSQKFQG
CDR3	SEQ ID NO:56	DRLESAAFDY
	SEQ ID NO:57	DRANTDFSYGMDV
	SEQ ID NO:58	DRAVTDYYYGMDV
	SEQ ID NO:59	DRANTDYSFGMDV
	SEQ ID NO:60	DRANTDYSLGMDV
	SEQ ID NO:61	DVVPAAIDYYGMDV
	SEQ ID NO:62	HKRGSDAFDI
	SEQ ID NO:63	EYYYSSEWAFDI

Таблица 3

Аминокислотные последовательности переменных доменов легкой цепи всех анти-CD33 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменных доменов легкой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

Клон анти-CD33	Идентификатор последовательности	Последовательность переменного домена легкой цепи (VL)
01	SEQ ID NO:1	SYELTQPPSVSVAPGQTAMITC <u>GGNNIGSTTVH</u> WYQQKPGQAPVLVV <u>YDDNERPS</u> GIPERFSGSNSGSTATLTINRVEAGDEADYYC <u>QVWDSGSD</u> <u>HVVFGGGTKLTVL</u>
02	SEQ ID NO:2	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YGNNORPS</u> GVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
03	SEQ ID NO:3	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YGNNORPS</u> GVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
04	SEQ ID NO:4	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YGNNORPS</u> GVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
05	SEQ ID NO:5	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGRSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YGNNORPS</u> GVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>ATWDDSLI</u> <u>GWVFGGGTKLTVL</u>
06	SEQ ID NO:6	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSSNIGSNTVN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YSDNORPS</u> GVPDFRFSGSKSGSSASLAISGLQSDDEADYYC <u>ATWDDSLN</u> <u>GAVFGGGTKLTVL</u>
07	SEQ ID NO:7	QSVLTQPPSVSAGPQQRVTIS <u>TGSSNIGAGYDVH</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>LIYGNSNRPS</u> GVPDFRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYC <u>QSYDSSL</u> <u>SDVVFVFGGGTKLTVL</u>
08	SEQ ID NO:8	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSSNIGSNIVN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YNNORPS</u> GVPDFRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLKG</u> <u>YVFGGGTKLTVL</u>
09	SEQ ID NO:9	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSSNIGSNTVK</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YNNORSS</u> GVPDFRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLN</u> <u>GYVFGGGTKLTVL</u>
10	SEQ ID NO:10	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>SGSSNIGDNVYN</u> WYQQLPGTAPKLLI <u>YSTNKRPS</u> GVPDFRFSGSKSGSSASLAISGLQSEDEADYYC <u>AAWDDSLS</u> <u>AYVFGGGTKLTVL</u>

Таблица 4

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи анти-CD33 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменных доменов тяжелой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

Клон анти-CD33	Идентификатор последовательности	Последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH)
01	SEQ ID NO:11	QVQLQESGGGVVQGRSLRLSCAASGFS <u>SNYGIH</u> WVRQAPGKGLEWVA <u>LISYDGNKKFYADSVKGR</u> FAISRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAK <u>DRLESAAFDY</u> WGQGLTVTVSS
02	SEQ ID NO:12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDFSYGMDV</u> WGQGLTVTVSS
03	SEQ ID NO:13	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRAVTDYYGMDV</u> WGQGLTVTVSS
04	SEQ ID NO:14	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDYSFGMDV</u> WGQGLTVTVSS
05	SEQ ID NO:15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYDIN</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GWMNPNSGNTGFAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDRANTDYSFGMDV</u> WGQGLTVTVSS
06	SEQ ID NO:16	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF <u>TSYMH</u> WVRQAPGQGLEW <u>MGIINPSGGSTSYAOKFOGR</u> VTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC <u>ARDVVPAAIDYYGMDV</u> WGQGLTVTVSS
07	SEQ ID NO:17	QVQLVQSGAEVKKPGESLKISKSGSYFT <u>TSYIW</u> WVRQMPGKGLEWM <u>GHIYPGSDTRYSPFOG</u> QVTISADKISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR <u>HKRGSDAFDI</u> WGQGLTVTVSS
08	SEQ ID NO:18	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF <u>SSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWMG <u>GIYPIFGSANYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>YYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS
09	SEQ ID NO:19	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF <u>SSYGIS</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GHIPIFGSAHYAOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR <u>EYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS
10	SEQ ID NO:20	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF <u>DSYAIS</u> WVRQAPGQGLEWM <u>GHIPIFGSAHYSOKFOGR</u> VTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARE <u>YYYDSSEWAFDI</u> WGQGLTVTVSS

В некоторых вариантах осуществления связывающий белок, наделяющий специфичностью к CD33,

выбран из одной из следующих комбинаций переменного домена тяжелой цепи и переменного домена легкой цепи, образующих участок связывания с человеческим CD33, показанный в табл. 3 и 4. Неограничивающие примеры включают (i) SEQ ID NO: 1 и 11; (ii) SEQ ID NO: 2 и 12; (iii) SEQ ID NO: 3 и 13; (iv) SEQ ID NO: 4 и 14; (v) SEQ ID NO: 5 и 15; (vi) SEQ ID NO: 6 и 16; (vii) SEQ ID NO: 7 и 17; (viii) SEQ ID NO: 8 и 18; (ix) SEQ ID NO: 9 и 19 и (x) SEQ ID NO: 10 и 20.

Также в настоящем документе описаны связывающие белки, которые не только обладают специфичностью в отношении CD33, но также имеют по меньшей мере один дополнительный функциональный домен. В другом варианте осуществления по меньшей мере один дополнительный функциональный домен представляет собой эффекторный домен. "Эффекторный домен" содержит связывающий участок антитела, специфический в отношении эффекторной клетки, которая может стимулировать или инициировать цитотоксичность, фагоцитоз, презентацию антигена, высвобождение цитокина. Такие эффекторные клетки представляют собой, например, но без ограничения, Т-клетки. В частности, эффекторный домен содержит по меньшей мере один переменный домен тяжелой цепи антитела и по меньшей мере один переменный домен легкой цепи антитела, образующие антигенсвязывающий участок для антигена на Т-клетках, такого как, например, человеческий CD3.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления CD33-связывающий белок является мультифункциональным. Используемый здесь термин "мультифункциональный" означает, что связывающий белок проявляет две или более различных биологических функций. Например, различные биологические функции представляют собой различные специфичности в отношении различных антигенов. В определенных случаях мультифункциональный CD33-связывающий белок является мультиспецифическим, т.е. обладает специфичностью связывания в отношении CD33 и одного или нескольких других антигенов. В определенных случаях связывающий белок является биспецифическим со специфичностями в отношении CD33 и CD3. Такие биспецифические связывающие белки включают, например, биспецифические моноклональные антитела классов IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, диатела, одноцепочечные диатела (scDb), тандемный одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv)₂, например, биспецифические Т-клетки (BiTE®), перориентирующиеся антитела с двойной аффинностью (DART™), тандемные диатела (TandAb®) и флексибела.

В определенных вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка обладает специфичностью в отношении человеческого CD3 и в некоторых случаях CD3 макака-крабоедов. Примерами такого связывающего участка являются полипептиды, содержащие CDR1, CDR2 и CDR3 VH-домена из последовательностей, показанных в табл. 5 (SEQ ID NO: 64-67) и CDR1, CDR2 и CDR3 VL-домена из последовательностей, показанных в табл. 6 (SEQ ID NO: 68-71). В определенных случаях CD3-связывающий участок представляет собой комбинацию переменного домена тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 64 и переменного домена легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 68. В определенных случаях CD3-связывающий участок представляет собой комбинацию переменного домена тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 65 и переменного домена легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 69. В определенных случаях CD3-связывающий участок представляет собой комбинацию переменного домена тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 66 и переменного домена легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 70. В определенных случаях CD3-связывающий участок представляет собой комбинацию переменного домена тяжелой цепи последовательности SEQ ID NO: 67 и переменного домена легкой цепи последовательности SEQ ID NO: 71.

Таблица 5

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи анти-CD3 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 переменного домена тяжелой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

анти-CD3	Последовательность VH-домена
SEQ ID NO:64 CD3-01	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>IRISKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLKTEDTAVYYCAR</u> <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO:65 CD3-02	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>IRISKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLKTEDTAVYYCAR</u> <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO:66 CD3-03	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>IRISKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLKTEDTAVYYCAR</u> <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS
SEQ ID NO:67 CD3-04	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF <u>STYAMN</u> WVRQAPGKGLEWVGR <u>IRISKYNNY</u> <u>ATYYADSVKDR</u> RFTISRDDSKNSLYLQMN <u>SLKTEDTAVYYCAR</u> <u>HGNFGNSYVSWFAYWG</u> QGTLVTVSS

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи анти-CD3 (аминокислотные последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 варибельного домена тяжелой цепи выделены жирным шрифтом и подчеркнуты)

анти-CD3	Последовательность VL-домена
SEQ ID NO:68 CD3-01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPGKAPKALIG <u>GTNKRAP</u> GVPSRFGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:69 CD3-02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPGKAPKGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:70 CD3-03	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPGKAPKGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPSRFGSLIGDKATLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK
SEQ ID NO:71 CD3-04	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR <u>RSSTGAVTTSNYAN</u> WVQKPGKAPKGLIG <u>GTNKRAP</u> GVPSRFGSLIGTDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>ALWYSNL</u> WVFGQGTKVEIK

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1 STYAMN 9SEQ ID NO: 72).

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR2 RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73).

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74).

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3 HGNFGNSYVSYFAY (SEQ ID NO: 75).

В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 72, 73 и 74 соответственно. В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 72, 73 и 75 соответственно.

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR1, выбранную из группы, состоящей из NTYAMN (SEQ ID NO: 76), NTYAMN (SEQ ID NO: 77) и NKYAMN (SEQ ID NO: 78).

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR2, выбранную из группы, состоящей из RIRNKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 79), RIRNKYNNYATEYADSVKD (SEQ ID NO: 80), RIRSKYNNYATEYAASVKD (SEQ ID NO: 81), RIRNKYNNYATEYAASVKD (SEQ ID NO: 82), RIRSKYNNYATYYADSVKG (SEQ ID NO: 83) и RIRSKYNNYATEYSDSVKD (SEQ ID NO: 84),

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательность CDR3, выбранную из группы, состоящей из HGNFGDSYVSWFAY (SEQ ID NO: 85), HGNFGNTYVSWFAY (SEQ ID NO: 86), HGNFGCSYVSWFAY (SEQ ID NO: 87), HGNFGNSYISYWAY (SEQ ID NO: 88) и HGNFGNSYVSFFAY (SEQ ID NO: 89),

В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет варибельный домен тяжелой цепи, содержащий последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, представленные в SEQ ID NO: 76, 73 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 79 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 80 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 81 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 82 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 76, 83 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 72, 83 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 72, 83 и 85 соответственно, SEQ ID NO: 76, 83 и 86 соответственно, SEQ ID NO: 77, 83 и 74 соответственно, SEQ ID NO: 72, 83 и 87 соответственно, SEQ ID NO: 78, 73 и 88 соответственно или SEQ ID NO: 78, 84 и 89 соответственно.

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90).

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR2 GTNKRAP (SEQ ID NO: 91).

В других вариантах осуществления CD3-связывающий участок биспецифического CD33- и CD3-связывающего белка имеет варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательность CDR3 ALWYSNL (SEQ ID NO: 92).

В еще других вариантах осуществления CD3-связывающий участок имеет варибельный домен легкой цепи, содержащий последовательности CDR1, CD2 и CD3, представленные в SEQ ID NO: 90, 91 и 92

соответственно.

В определенных случаях CD3-связывающий участок обладает высокой аффинностью в отношении CD3. Альтернативно, в других случаях CDR1, CDR2, CDR3 из домена тяжелой цепи, а также домена легкой цепи или, необязательно, переменных доменов легкой цепи и переменных доменов тяжелой цепи происходят из других антител к CD3, таких как, например, UCNT1, муромонаб-CD3 (ОКТ3), отеликсизумаб (TRX4), теплизумаб (MGA031), визилизумаб (Nuvion) и т.п.

В другом аспекте в настоящем документе предлагаются CD33-связывающие белки, а также биспецифические CD33- и CD3-связывающие белки, которые являются гуманизированными или полностью человеческими, т.е. имеют человеческое происхождение.

В некоторых вариантах осуществления биспецифический CD33- и CD3-связывающий белок содержит одну из следующих комбинаций, обеспечивающих специфичность в отношении CD33 и CD3 с помощью переменных доменов легкой и тяжелой цепей для CD33 и CD3, включая, но без ограничения, (i) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; (ii) SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; (iii) SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; (iv) SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; (v) SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; (vi) SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; (vii) SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; (viii) SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; (ix) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; (x) SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; (xi) SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; (xii) SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; (xiii) SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68; (xiv) SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68; (xv) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; (xvi) SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68; (xvii) SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; (xviii) SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; (xix) SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; (xx) SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71 и (xxi) SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

Консервативные варианты последовательностей CDR и доменов тяжелой и легкой цепей.

В альтернативных вариантах осуществления домены тяжелой и легкой цепей включают иммунологически активные гомологи или варианты последовательностей CDR, описанных в настоящем документе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления последовательность CDR в домене тяжелой или легкой цепи, которая связывается с CD33 или CD3, является сходной, но не идентичной, аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21-63 или 72-92. В определенных случаях последовательность варианта CDR обладает 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 21-63 или 72-90, и является иммунологически активной.

В других случаях последовательность варианта CDR включает 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены включают аминокислотные замены, которые заменяют заданную аминокислоту другой аминокислотой, имеющей схожие характеристики, и, кроме того, включают из числа алифатических аминокислот взаимную замену аланина, валина, лейцина и изолейцина; взаимную замену гидроксильных остатков серина и треонина, обмен кислотных остатков аспартата и глутамата, замещение между амидными остатками аспарагином и глутамином, обмен основных остатков лизина и аргинина, и замены из числа ароматических остатков фенилаланина и тирозина.

В еще других случаях последовательность варианта CDR включает замены, которые усиливают свойства CDR, например, повышают стабильность, устойчивость к протеазам и/или аффинности связывания в отношении CD33 или CD3.

В других случаях последовательность варианта CDR модифицирована для замены некритических остатков или остатков в некритических областях. Аминокислоты, которые не являются критическими, могут быть идентифицированы известными способами, такими как созревание аффинности, "прогулка по CDR", сайт-направленный мутагенез, кристаллизация, ядерный магнитный резонанс, фотоаффинное мечение или аланин-сканирующий мутагенез.

В других альтернативных вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающие белки содержат домены тяжелой и легкой цепей, которые являются иммунологически активными гомологами или вариантами последовательностей доменов тяжелых и легких цепей, представленных в настоящем документе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок содержит последовательность домена тяжелой или легкой цепи, которая является сходной, но не идентичной аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1-20 или 64-71. В определенных случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи обладает 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81 или 80% идентичностью последовательности по сравнению с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1-20 или 64-71, и является иммунологически активной.

В других случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи включает 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен. Консервативные замены включают аминокислотные замены, которые заменяют заданную аминокислоту другой аминокислотой, имеющей схожие характеристики, и, кроме того, включают из числа алифатических аминокислот взаимную замену аланина, валина, лейцина и изолейцина; взаимную замену гидроксильных остатков серина и треонина, обмен кислотных остатков аспартата и глутамата, замещение между амидными остатками аспарагином и глутамином, обмен основных остатков лизина и аргинина и замены из числа ароматических остатков фенилаланина и тирозина.

В еще других случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи включает за-

мены, которые усиливают свойства CDR, например повышают стабильность, устойчивость к протеазам и/или аффинности связывания в отношении CD33 или CD3.

В других случаях последовательность варианта домена тяжелой или легкой цепи модифицирована для замены некритических остатков или остатков в некритических областях. Аминокислоты, которые не являются критическими, могут быть идентифицированы известными способами, такими как созревание аффинности, "прогулка по CDR", сайт-направленный мутагенез, кристаллизация, ядерный магнитный резонанс, фотоаффинное мечение или аланин-сканирующий мутагенез. CD33- и CD3-биспецифические и tandemные диатела

В другом аспекте CD33-связывающий белок или биспецифический CD33- и CD3-связывающий белок представляет собой димер, т.е. содержит два полипептида с антигенсвязывающими участками для CD33 и CD3.

Также в настоящем документе в другом аспекте предлагается димерный и биспецифический CD33- и CD3-связывающий белок в формате tandemного диатела (TandAb®). Такие tandemные диатела сконструированы путем соединения четырех переменных связывающих доменов антитела (двух переменных доменов тяжелой цепи (VH) и двух переменных доменов легкой цепи (VL)) в единую генетическую конструкцию (фиг. 1), обеспечивая возможность гомодимеризации. В таких tandemных диателах линкер имеет такую длину, которая предотвращает внутримолекулярное спаривание переменных доменов таким образом, что молекула не может сворачиваться обратно самостоятельно с образованием одноцепочечного диатела, а скорее стремится к спариванию с комплементарными доменами другой цепи. Домены также организованы таким образом, что соответствующие домены VH- и VL-домены спариваются в ходе этой димеризации. После экспрессии из единой генетической конструкции две идентичные полипептидные цепи сворачиваются "голова-к-хвосту", образуя функциональный нековалентный гомодимер размером приблизительно 105 кДа (фиг. 1). Несмотря на отсутствие межмолекулярных ковалентных связей, гомодимер обладает высокой стабильностью после образования, остается интактным и не превращается обратно в мономерную форму.

Tandemные диатела обладают рядом свойств, которые обеспечивают преимущества перед традиционными моноклональными антителами и другими биспецифическими молекулами меньшего размера. Tandemные диатела содержат только переменные домены антитела и, следовательно, предполагается, что они лишены побочных эффектов или неспецифических взаимодействий, которые могут быть связаны с Fc-фрагментом. Например, Fc-рецепторы, которые могут связываться с Fc-доменами, обнаружены на различных типах клеток, таких как белые кровяные клетки (например, базофилы, В-клетки, эозинофилы, естественные клетки-киллеры, нейтрофилы и т.п.) или клетки Купфера. Так как tandemные диатела обеспечивают бивалентное связывание с каждым из CD33 и CD3, avidность является такой же, как avidность IgG. Размер tandemного диатела приблизительно при 105 кДа меньше, чем размер IgG, что может обеспечить усиленное проникновение в опухоль. Однако этот размер намного превышает порог выведения почками для клиренса при первом прохождении, обеспечивая фармакокинетическое преимущество по сравнению с биспецифическими форматами меньшего размера на основе антитело-связывающих доменов или каркасов, не принадлежащих антителу. Более того, tandemные диатела являются предпочтительными по сравнению с другими биспецифическими связывающими белками, такими как молекулы ViTE или DART, на основе этих фармакокинетических и avidных свойств, что приводит к более длинным естественным периодам полувыведения и быстрой цитотоксичности. Tandemные диатела хорошо экспрессируются в клетках-хозяевах, например клетках CHO млекопитающего. Предполагается, что имеется надежный подготовительный процесс и процесс выделения и очистки tandemных диател.

CD33- и CD3-биспецифические tandemные диатела, описанные здесь, разработаны для обеспечения специфического нацеливания на CD33⁺ опухолевые клетки путем рекрутинга цитотоксических Т-клеток. Это улучшает ADCC (антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность) по сравнению с полноразмерными антителами, направленными на один антиген и не способными напрямую рекрутировать цитотоксические Т-клетки. Напротив, путем захвата молекул CD3, экспрессирующихся специфически на этих клетках, tandemное диатело может перекрестно сшивать цитотоксические Т-клетки с CD33⁺ опухолевыми клетками высокоспецифическим образом, тем самым значительно увеличивая цитотоксический потенциал таких молекул. Этот механизм показан на фиг. 2. Tandemное диатело проявляет сильную, специфическую и эффективную ADCC. Сообщается, что Т-клетки могут играть роль в контроле роста опухоли. Например, присутствие цитотоксических Т-клеток в колоректальных опухолях, а также лимфатических узлах от пациентов с NHL, как было показано, коррелирует с лучшим клиническим исходом. Кроме того, потенциал терапий, разработанных для индукции Т-клеточных ответов, был продемонстрирован для вакцин против миломы, а также антитела, направленного против CTLA-4, негативного регулятора Т-клеточной активации. Tandemные диатела, описанные здесь, захватывают цитотоксические Т-клетки путем связывания с экспрессируемым на поверхности CD3, который образует часть Т-клеточного рецептора. Одновременное связывание этого tandemного диатела с CD3 и CD33, экспрессируемыми на поверхности конкретных опухолевых клеток, вызывает активацию Т-клеток и опосредует последующий лизис опухолевой клетки (фиг. 2).

Таким образом, в следующем аспекте предлагается мультиспецифическое tandemное диатело. В не-

которых вариантах осуществления мультиспецифическое тандемное диатело обладает специфичностями в отношении двух, трех или более различных эпитопов, при этом два или более эпитопа могут относиться к одному антигену-мишени или различным антигенам-мишеням. В определенных вариантах осуществления мультиспецифическое тандемное диатело является биспецифическим и четырехвалентным, т.е. содержит четыре антигенсвязывающих участка. Такое биспецифическое тандемное диатело связывается посредством по меньшей мере одного антигенсвязывающего участка с человеческим CD3 и человеческим CD33, при этом в определенных случаях тандемное диатело связывается посредством двух антигенсвязывающих участков с человеческим CD3 и посредством двух других антигенсвязывающих участков с человеческим CD33, т.е. тандемное диатело связывается бивалентно с каждым антигеном.

В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антигенсвязывающее тандемное диатело является специфическим в отношении человеческого CD33 и человеческого CD3, при этом указанное тандемное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид содержит по меньшей мере четыре вариабельных домена цепи, соединенных друг за другом, при этом каждый полипептид содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), специфический в отношении человеческого CD33;

(ii) вариабельный домен легкой цепи (VL), специфический в отношении человеческого CD33;

(iii) VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3, и (iv) VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3. В конкретных вариантах осуществления биспецифическое тандемное диатело специфически связывается с эпитопом человеческого CD33, который находится в пределах ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 последовательности SEQ ID NO: 93) человеческого CD33. В конкретных случаях такое тандемное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре вариабельных домена цепи, соединенных друг с другом, при этом каждый полипептид содержит:

(i) вариабельный домен тяжелой цепи, специфический в отношении эпитопа человеческого CD33, который находится в пределах ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 последовательности SEQ ID NO: 93) человеческого CD33;

(ii) вариабельный домен легкой цепи, специфический в отношении эпитопа человеческого CD33, который находится в пределах ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) (аминокислотные остатки 62-70 последовательности SEQ ID NO: 93) человеческого CD33;

(iii) вариабельный домен тяжелой цепи, специфический в отношении человеческого CD3; и

(iv) вариабельный домен легкой цепи, специфический в отношении человеческого CD3.

В других вариантах осуществления в настоящем документе описаны CD33/CD3 тандемные диатела, которые обладают аффинностью в отношении CD33 на CD33⁺ клетках со значением K_D , равным 10 нМ или менее, 5 нМ или менее, 1 нМ или менее или 0,5 нМ или менее. CD33⁺ клетки могут быть выбраны из опухолевых клеток, таких как, например, HL-60 или KG-1.

В другом варианте осуществления CD33/CD3 тандемное диатело, описанное здесь, связывается с CD3 и в определенных случаях эпсилон-цепью CD3 на CD3⁺ клетках, в частности, Т-клетках, со значением K_D , равным 10 нМ или менее, 5 нМ или менее или 2 нМ или менее.

В некоторых вариантах осуществления каждый полипептид биспецифического тандемного диатела содержит одну из следующих комбинаций четырех вариабельных доменов цепи:

(i) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; (ii) SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; (iii) SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; (iv) SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; (v) SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; (vi) SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; (vii) SEQ ID NO: 2, 12, 66 и 70; (viii) SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; (ix) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; (x) SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; (xi) SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; (xii) SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; (xiii) SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; (xiv) SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68; (xv) SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68; (xvi) SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; (xvii) SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68; (xviii) SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; (xix) SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; (xx) SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; (xxi) SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71 и (xxii) SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

Используемый здесь "димер" относится к комплексу из двух полипептидов. В определенных вариантах осуществления два полипептида нековалентно связаны друг с другом, в частности, при условии, что ковалентная связь между двумя полипептидами отсутствует. В определенных случаях два полипептида имеют ковалентные связи, такие как дисульфидные связи, которые образуются для содействия стабилизации димера. В определенных вариантах осуществления димер является гомодимерным, т.е. содержит два идентичных полипептида. Термин "полипептид" относится к полимеру, состоящему из аминокислотных остатков, соединенных амидными связями. В определенных случаях полипептид представляет собой одноцепочечный белок слияния, который является неразветвленным. В полипептиде вариабельные домены антитела соединены друг с другом. В других случаях полипептид может иметь смежные аминокислотные остатки дополнительно к N-концевым и/или C-концевым остаткам вариабельного домена. Например, такие смежные аминокислотные остатки могут содержать Tag-последовательность, в некоторых случаях на C-конце, которая, как предполагается, является полезной для очистки и детекции полипептида.

В одном аспекте каждый полипептид биспецифического тандемного диатела содержит четыре ва-

риабельных домена, переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH) CD3-связывающего белка, а также переменный домен легкой цепи (VL) и переменный домен тяжелой цепи (VH) CD33-связывающего белка. В определенных вариантах осуществления четыре переменных домена соединены пептидными линкерами L1, L2 и L3 и в некоторых случаях расположены в направлении от N- к C-концу следующим образом.

Порядок доменов:

- (1) VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3); или
- (2) VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3); или
- (3) VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33); или
- (4) VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD3)-L3-VL(CD33).

Длина линкеров влияет на гибкость антигенсвязывающего тандемного диатела в соответствии с опубликованными исследованиями. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления длина пептидных линкеров L1, L2 и L3 является такой, что домены одного полипептида могут ассоциировать межмолекулярно с доменами другого полипептида с образованием димерного антигенсвязывающего тандемного диатела. В определенных вариантах осуществления такие линкеры являются "короткими", т.е. состоят из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков. Таким образом, в определенных случаях линкеры состоят примерно из 12 аминокислотных остатков или менее. В случае 0 аминокислотных остатков линкер представляет собой пептидную связь. Такие короткие линкеры способствуют межмолекулярной димеризации двух полипептидов путем связывания и образования правильных антигенсвязывающих участков между переменными доменами легкой цепи антитела и переменными доменами тяжелой цепи антитела различных полипептидов. Укорачивание линкера до около 12 аминокислотных остатков или менее, как правило, предотвращает внутримолекулярное взаимодействие друг с другом соседних доменов одной и той же полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления эти линкеры состоят примерно из 3-10, например 4, 5 или 6, смежных аминокислотных остатков.

В отношении аминокислотной композиции линкеров, выбраны пептиды, которые не препятствуют димеризации двух полипептидов. Например, линкеры, содержащие остатки глицина и серина, как правило, обеспечивают устойчивость к протеазе. Аминокислотная последовательность линкеров может быть оптимизирована, например, методами фагового дисплея, для улучшения связывания с антигеном и выхода антигенсвязывающего полипептидного димера. Примерами пептидных линкеров, подходящих для тандемного диатела в некоторых вариантах осуществления, являются GGSGGS (SEQ ID NO: 95), GGSG (SEQ ID NO: 96) или GGSGG (SEQ ID NO: 97).

Неограничивающими примерами тандемных диател, описанных здесь, являются тандемные диатела, имеющие VL- и VH-домены анти-СВ33, VL- и VH-домены анти-CD3, порядок доменов и линкер в соответствии с указанными в табл. 7.

Таблица 7

Иллюстративные CD33/CD3 тандемные диатела (TandAbs)

Тандемное диатело	Домен анти-CD33		Домен анти-CD3		Порядок доменов	Линкер	
	VL	VH	VH	VL		L1/L3	L2
01	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS	GGSG
02	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS	GGSG
03	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS	GGSG
04	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS	GGSG
05	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS	GGSG
06	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:69	1	GGSGGS	GGSG
07	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
08	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	3	GGSGGS	GGSG

09	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:70	1	GGSGGS	GGSG
10	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:70	1	GGSGGS	GGSG
11	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:70	1	GGSGGS	GGSG
12	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
13	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:71	1	GGSGGS	GGSG
14	SEQ ID NO:2	SEQ ID NO:12	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
15	SEQ ID NO:4	SEQ ID NO:14	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
16	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
17	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
18	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	2	GGSGGS	GGSG
19	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
20	SEQ ID NO:6	SEQ ID NO:16	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:71	1	GGSGGS	GGSG
21	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
22	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG
23	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:71	1	GGSGGS	GGSG
24	SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:64	SEQ ID NO:68	1	GGSGGS	GGSG

В некоторых вариантах осуществления тандемное диатело присоединено к С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-метке. В некоторых вариантах осуществления тандемное диатело с С-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-меткой представляет собой тандемное диатело

01 (SEQ ID NO:98), 02 (SEQ ID NO:99), 03 (SEQ ID NO:100), 04 (SEQ ID NO:101), 05 (SEQ ID NO:102), 06 (SEQ ID NO:103), 07 (SEQ ID NO:104), 08 (SEQ ID NO:105), 09 (SEQ ID NO:106), 10 (SEQ ID NO:107), 11 (SEQ ID NO:108), 12 (SEQ ID NO:109), 13 (SEQ ID NO:110), 14 (SEQ ID NO:111), 15 (SEQ ID NO:112), 16 (SEQ ID NO:113), 17 (SEQ ID NO:114), 18 (SEQ ID NO:115), 19 (SEQ ID NO:116), 20 (SEQ ID NO:117), 21 (SEQ ID NO:118), 22 (SEQ ID NO:119), 23 (SEQ ID NO:120) или 24 (SEQ ID NO:121),

как показано на фиг. 10А-10Х.

В некоторых вариантах осуществления тандемное диатело представляет собой тандемное диатело

01 (SEQ ID NO:123), 02 (SEQ ID NO:124), 03 (SEQ ID NO:125), 04 (SEQ ID NO:126), 05 (SEQ ID NO:127), 06 (SEQ ID NO:128), 07 (SEQ ID NO:129), 08 (SEQ ID NO:130), 09 (SEQ ID NO:131), 10 (SEQ ID NO:132), 11 (SEQ ID NO:133), 12 (SEQ ID NO:134), 13 (SEQ ID NO:135), 14 (SEQ ID NO:136), 15 (SEQ ID NO:137), 16 (SEQ ID NO:138), 17 (SEQ ID NO:139), 18 (SEQ ID NO:140), 19 (SEQ ID NO:141), 20 (SEQ ID NO:142), 21 (SEQ ID NO:143), 22 (SEQ ID NO:144), 23 (SEQ ID NO:145) или 24 (SEQ ID NO:146),

как показано на фи. 11А-11Х.

CD33-связывающий белок и биспецифический CD33/CD3-связывающий белок (например, биспецифическое CD33/CD3 тандемное диатело), описанные в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления получают путем экспрессии полинуклеотидов, кодирующих полипептид тандемного диатела, который соединен с другим идентичным полипептидом с образованием антигенсвязывающего тандемного диатела. Таким образом, другим аспектом является полинуклеотид, например, ДНК или РНК, кодирующий полипептид антигенсвязывающего тандемного диатела, как описано в настоящем документе.

Полинуклеотид сконструирован с помощью известных способов, например, путем объединения генов, кодирующих по меньшей мере четыре переменных домена антитела, отделенных пептидными линкерами или, в других вариантах осуществления, напрямую соединенных пептидной связью в единую

генетическую конструкцию, функционально связанную с подходящим промотором, и необязательно подходящим терминатором транскрипции, и экспрессии его в бактерии и другой подходящей системе экспрессии, такой как, например, клетки CHO. В зависимости от используемых векторной системы и хозяина можно использовать любое число подходящих элементов транскрипции и трансляции, включая конститутивные и индуцируемые промоторы. Промотор выбран таким образом, что он управляет экспрессией полинуклеотида в соответствующей клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид встроен в вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, который представляет следующий вариант осуществления. Этот рекомбинантный вектор может быть сконструирован в соответствии с известными способами.

Разнообразные системы экспрессионных векторов/хозяев могут быть использованы для содержания и экспрессии полинуклеотида, кодирующего полипептид описанного антигенсвязывающего тандемного диатела. Примерами экспрессионных векторов для экспрессии в *E.coli* являются pSKK (Le Gall et al., *J. Immunol. Methods.* (2004), 285(1):111-27) или pcDNA5 (Invitrogen) для экспрессии в клетках млекопитающих.

Таким образом, антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, в некоторых вариантах осуществления получают путем введения вектора, кодирующего описанный выше полипептид, в клетку-хозяина и культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, в которых полипептидные цепи экспрессируются, могут быть выделены и, необязательно, в дальнейшем очищены.

В других аспектах CD33-связывающий белок или биспецифический CD33/CD3-связывающий белок (например, биспецифическое CD33/CD3 тандемное диатело), описанный здесь, содержит модификацию. Типичные модификации включают, но без ограничения, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, конъюгацию лекарственного средства, сшивание, циклизацию, дисульфидные связи, деметилирование, образование ковалентных поперечных связей, образование цистина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксиллирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксिलирование, иодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, добавление аминокислот к белкам с помощью переноса, опосредованного РНК, такое как аргинилирование и убиквитинизация. В дополнительных вариантах осуществления CD33-связывающий белок или биспецифический CD33/CD3-связывающий белок модифицирован дополнительными аминокислотами, такими как лидерная или секреторная последовательность или последовательность, применяемая для очистки полипептида.

В других аспектах в настоящем документе предлагаются фармацевтические композиции, содержащие CD33-связывающий белок, антигенсвязывающее тандемное диатело, вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий антигенсвязывающее тандемное диатело, или клетку-хозяина, трансформированную этим вектором, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель. Термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает, но без ограничения, любой носитель, который не препятствует эффективности или биологической активности ингредиентов и не токсичен по отношению к пациенту, которому его вводят. Примеры подходящих фармацевтических носителей хорошо известны в данной области и включают фосфатно-солевые буферные растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы увлажняющих агентов, стерильных растворов и т.д. Такие носители могут быть составлены стандартными способами и могут быть введены субъекту в подходящей дозе. Предпочтительно композиции являются стерильными. Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Предотвращение действия микроорганизмов может быть гарантировано путем включения различных антибактериальных и противогрибковых агентов.

Биспецифические CD33/CD3-связывающие белки с высокоаффинным связыванием с CD33 и CD3, являются высокоактивными в большом числе образцов первичного AML, на основании чего можно предположить, что эти молекулы могут быть активными против AML человека по всему спектру цитогенетических/молекулярных заболеваний, даже в случае минимальной экспрессии CD33. Следует отметить, что специфическая к лекарственному средству цитотоксичность также наблюдалась в присутствии остаточных аутологичных Т-клеток и значительно возрастала при добавлении контролируемых количеств Т-клеток здоровых доноров (см. пример 6).

Биспецифические CD33/CD3-связывающие белки, в частности, тандемные диатела, могут индуцировать сильный цитолиз CD33⁺ лейкозных клеток *in vitro*. Данные указывают на то, что высокоаффинное связывание как с CD33, так и CD3 максимально увеличивает индуцированную биспецифическим белком активацию Т-клеток и эффективность против AML. Высокоаффинные биспецифические связывающие белки, направленные против CD33/CD3, такие как тандемные диатела, описанные здесь, проявляют цитолитическую активность в первичном AML *in vitro*. Таким образом, эти биспецифические связывающие белки и тандемные диатела являются подходящими для терапевтического подхода к лечению острого миелоидного лейкоза (AML) или других гематологических злокачественных опухолей, например миело-

идного диспластического синдрома (MDS) или миелопролиферативного заболевания (MPD).

Таким образом, в настоящем документе предлагаются способы, в которых антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное в настоящем документе выше, вводят в эффективной дозе субъекту, например, пациенту для лечения CD33⁺ рака (например, острого миелоидного лейкоза (AML)), заболевания или патологического состояния. CD33⁺ рак включает, но без ограничения, острые лейкозы, такие как острый миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз (ALL), включая лимфобластный лейкоз из предшественников В-клеток, миелоидную саркому, множественную миелому, острые лимфомы, такие как острая лимфобластная лимфома, хронический миеломоноцитарный лейкоз и т.п. CD33⁺ заболевания и патологические состояния включают иммуносупрессивные состояния или среды, вызванные супрессорными клетками миелоидного происхождения (MDSC) в некоторых типах рака и хроническом воспалении.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения острого миелоидного лейкоза (AML). В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения подтипа острого миелоидного лейкоза.

Французко-Американо-Британская система классификации подразделяет AML на восемь подтипов: AML-M0 (минимально дифференцированный), AML-M1 (без созревания), AML-M2 (с гранулоцитарным созреванием), AML-M3 (промиелоцитарный или острый промиелоцитарный лейкоз), AML-4 (острый миеломоноцитарный лейкоз), AML-M5 (острый монобластный или моноцитарный лейкоз), AML-M6 (острый эритроидный лейкоз) и AML-M7 (острый мегакариобластный лейкоз). В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7.

Классификации ВОЗ (WHO) подразделяет AML на следующие подтипы: AML с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; миелодные неоплазии, связанные с предшествующей терапией; миелоидная саркома; миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна; опухоль из плазмацитоидных дендритных клеток; и AML, по-другому не специфицированные. В определенных других случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения AML с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями; AML с изменениями, связанными с миелодисплазией; миелодных неоплазий, связанных с предшествующей терапией; миелоидной саркомы; миелоидных опухолей, связанных с синдромом Дауна; опухоли из плазмацитоидных дендритных клеток; или AML, по-другому не специфицированных.

В некоторых других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения впервые диагностированного, рецидивирующего или рефракторного AML.

В некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок, например антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят пациенту, перенесшему трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (HCT), для лечения рецидивирующего или рефракторного AML. Пациенты, перенесшие HCT, являются особой популяцией пациентов, восприимчивых к введению CD33- и CD3-связывающего белка для лечения AML. Предполагается, что после проведения HCT пациенты восстанавливают свою иммунную систему, включая лимфоциты, позволяя тем самым CD33- и CD3-связывающему белку более эффективно захватывать цитотоксические Т-клетки и уничтожать опухолевые клетки.

Во многих или в большинстве случаев пациенты, получающие HCT, потерпели неудачу в предшествующей терапии для лечения AML, такой как химиотерапия или облучение, и на текущий момент находятся в ремиссии. В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие HCT, потерпели неудачу в химиотерапии первой линии или облучении. В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие HCT, потерпели неудачу в однокомпонентной химиотерапии или облучении. Некоторые пациенты с AML, получающие HCT, находятся в первой полной ремиссии (CR1). В некоторых вариантах осуществления пациенты с AML, получающие HCT, представляют собой пациентов с рецидивирующим AML, находящихся во второй полной ремиссии (CR2).

В некоторых вариантах осуществления трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является аллогенной (алло-HCT). В алло-HCT стволовые клетки происходят от лица, т.е. донора, отличного от пациента, который совпадает по человеческому лейкоцитарному антигену (HLA) с пациентом. Совместимые доноры могут иметь или не иметь родственных связей с пациентом. В некоторых случаях частично совместимый донор с одним несовпадением антигена может быть использован для алло-HCT. Типичные источники клеток от доноров включают клетки костного мозга и стволовые клетки периферической крови. Для тех пациентов, которые не совпадают или частично не совпадают по HLA с родственным или неродственным донором, могут быть использованы альтернативные источники доноров. Иллюстративные альтернативные варианты донора включают трансплантацию клеток пуповинной крови или гаплоидентичную трансплантацию. Преимущества алло-HCT включают использование не содержащего опухоль трансплантата и иммуноопосредованного эффекта трансплантата против лейкоза. Когда донорские иммунные клетки инфузируют в организм, они могут распознавать любые оставшиеся лейкозные клетки как чужеродные и атаковать их. Недостатки алло-HCT включают трудности в поиске совместимых или

частично совместимых доноров, а также болезнь трансплантат против хозяина, когда иммунная система, воссозданная донорскими клетками, распознает собственные ткани пациента как чужеродные и атакует их.

В некоторых других вариантах осуществления трансплантация гемопоэтических стволовых клеток является аутологичной (ауто-НСТ). Аутологичная НСТ требует забора, обычно путем афереза, гемопоэтических стволовых клеток у пациента и хранение собранных клеток в морозильной камере. Затем пациента подвергают лечению очень высокими дозами химиопрепаратов в сочетании с радиотерапией или без нее для эрадикации популяции злокачественных клеток пациента за счет частичной или полной абляции костного мозга, или другими словами, деструкции функции костного мозга пациента по созданию новых клеток крови. Затем собственные хранившиеся стволовые клетки пациента вводят в ее/его кровоток, где они заменяют разрушенную ткань и восстанавливают выработку нормальных клеток крови пациента. Аутологичные трансплантаты имеют преимущество, состоящее в пониженном риске возникновения инфекции во время иммунокомпрометированной части терапии, так как восстановление иммунной функции происходит быстро. Также случаи, когда пациенты испытывают отторжение, которое представляет собой острое или хроническое заболевание трансплантат против хозяина, являются очень редкими, так как донор и реципиент представляют одного и того же индивидуума.

В других вариантах осуществления пациент получает режим кондиционирования перед НСТ. В некоторых вариантах осуществления режим кондиционирования перед НСТ может обеспечить надлежащую иммуносупрессию для гарантирования приживания и не имеет значительной токсичности. Режим кондиционирования бывает миелоаблативным или немиелоаблативным, также известным как режим кондиционирования с уменьшенной интенсивностью дозы (RIC).

В некоторых вариантах осуществления режим кондиционирования является миелоаблативным. Миелоаблативный режим кондиционирования включает абляцию клеток в костном мозге, включая клетки AML, и обычно проводится путем облучения всего тела (TBI), введения циклофосфида, введения бусульфана или их комбинаций. Типичные циклофосфамиды включают эндоксан, цитоксан, неозар, процитокс, ревиммун и циклобластин. В некоторых вариантах осуществления режим кондиционирования является немиелоаблативным, т.е. кондиционирование с уменьшенной интенсивностью дозы (RIC). Режим RIC включает дозы химиотерапий и/или облучения, которые являются более низкими, чем при миелоаблативной терапии. Таким образом, режим RIC рассматривается как более мягкий режим, который не убивает все клетки костного мозга и может быть использован у пациентов, таких как пожилые пациенты, которые не могут быть подвергнуты режиму миелоаблативного кондиционирования.

В некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок, например антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят пациентам с AML, которые перенесли ауто-НСТ после миелоаблативного режима кондиционирования. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело вводят пациентам с AML, которые перенесли алло-НСТ после миелоаблативного режима кондиционирования. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые перенесли алло-НСТ после миелоаблативного режима кондиционирования, находятся в полной ремиссии (CR), и введение CD33- и CD3-связывающих белков, описанных здесь, после алло-НСТ уменьшает вероятность возникновения рецидивирующего или рефракторного AML. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые перенесли алло-НСТ после миелоаблативного режима кондиционирования, находятся в состоянии CR, но имеют минимальное остаточное заболевание (MRD), и введение CD33- и CD3-связывающего белка, описанного здесь, после алло-НСТ уменьшает вероятность возникновения рецидивирующего или рефракторного AML. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые перенесли алло-НСТ после миелоаблативного режима кондиционирования, имеют MRD, и введение CD33- и CD3-связывающего белка, описанного здесь, после алло-НСТ уменьшает вероятность возникновения рецидивирующего или рефракторного AML.

Некоторые доклинические исследования показали, что более интенсивные режимы кондиционирования приводят к высвобождению провоспалительных цитокинов, которые способствуют развитию острой реакции трансплантат против хозяина. Типичные режимы интенсивного кондиционирования включают очень высокие дозы тотального облучения тела (TBI). В некоторых вариантах осуществления введение CD33- и CD3-связывающего белка, описанного здесь, пациентам с AML, которые перенесли алло-НСТ после режима интенсивного кондиционирования, не вызывает высвобождение провоспалительных цитокинов и уменьшает вероятность возникновения острой реакции трансплантат против хозяина.

В других вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок, например антигенсвязывающее тандемное диатело, вводят пациентам с AML, которые перенесли ауто-НСТ после режима RIC. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело вводят пациенту с AML, который перенес алло-НСТ после режима RIC. Типичные режимы кондиционирования с минимальной интенсивностью доз включают введение флударабина в сочетании с TBI. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 30 мг/м²/день в течение 3 дней в сочетании с двумя Gy TBI. В некоторых исследованиях сообщается, что немиелоаблативный режим кондиционирования или RIC связан с общей выживаемостью 34-50% в течение двух лет, частотой возникновения безрецидивной смертности

(NRM) 22-34% в течение двух лет, частотой возникновения острой реакции трансплантат против хозяина 33-35% и частотой возникновения хронической реакции трансплантат против хозяина 41-53%. В некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок, описанный здесь, вводят пациентам с AML, которые получали алло-НСТ после режима кондиционирования RIC. В некоторых вариантах осуществления введение антигенсвязывающего тандемного диатела, описанного здесь, пациентам с AML, которые получали алло-НСТ после режима кондиционирования RIC, приводит к улучшению общей выживаемости, снижению частоты возникновения NRM и/или снижению частоты возникновения острой или хронической реакции трансплантат против хозяина.

В некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок вводят пациентам с AML, которые получали алло-НСТ после режима RIC. В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие алло-НСТ после режима RIC, находятся в полной ремиссии (CR), и введение CD33- и CD3-связывающего белка, описанного здесь, после алло-НСТ уменьшает вероятность возникновения рецидивирующего или рефракторного AML. В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие алло-НСТ после режима RIC, находятся в стадии CR, но имеют минимальное остаточное заболевание (MRD), и введение антигенсвязывающего тандемного диатела, описанного здесь, после алло-НСТ уменьшает вероятность возникновения рецидивирующего или рефракторного AML. В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие алло-НСТ после режима RIC, имеют MRD, и введение антигенсвязывающего тандемного диатела, описанного здесь, после алло-НСТ, уменьшает вероятность возникновения рецидивирующего или рефракторного AML.

В некоторых вариантах осуществления CD33- и CD3-связывающий белок, описанный здесь, вводят пациентам, которые получали алло-НСТ в сочетании с донорскими лимфоцитами во время прогрессирования AML. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят пациентам, которые получали алло-НСТ без донорских лимфоцитов во время прогрессирования AML.

В некоторых вариантах осуществления частота общего ответа у пациентов с AML, которым вводили CD33- и CD3-связывающий белок, как описано здесь, после алло-НСТ, является более высокой, чем частота общего ответа у пациентов с AML, которым вводили CD33- и CD3-связывающий белок, как описано здесь, без предшествующей алло-НСТ. В некоторых вариантах осуществления пациенты с AML, получающие алло-НСТ после миелоаблативного режима кондиционирования или режима кондиционирования со сниженной интенсивностью, имеют функциональные Т-клетки для связывания CD33- и CD3-связывающего белка, как описано здесь, и введение CD33- и CD3-связывающего белка, как описано здесь, в присутствии функциональных Т-клеток приводит к улучшенному показателю эффективности лечения AML.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения заболевания крови, называемого предлейкозом, такого как миелоидный диспластический синдром (MDS) или миелопролиферативное заболевание (MPD). В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения MDS. В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения MPD.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения множественной миеломы. В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения хронического миеломоноцитарного лейкоза (CMML).

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для ингибирования или удаления супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC). Супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) сверхэкспрессируют CD33 в определенных изолированных пораженных заболеванием тканях и обладают высокой иммуносупрессорной активностью. В определенных типах рака у человека (CD33⁺, а также не-CD33⁺) супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) пролиферируют и активируются для подавления опухоль-специфических CD4⁺ Т-клеточных ответов и индукции T_{reg} клеток, позволяя опухоли или раку быстро развиваться в микроокружении. При хроническом воспалении MDSC согласно имеющимся данным распространяются и обнаруживаются в участках воспаления для подавления Т-клеточной иммунной функции. В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения патологического состояния, связанного с MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения иммуносупрессии. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения воспаления, супрессированного MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения снижения иммунного ответа, вызванного MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения ангиогенеза, инвазии опухоли или метастаз рака, стимулированных MDSC. В еще других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят для лечения рака или опухоли, которая усиливается, нарастается, обостряется или увеличивается под воздействием MDSC.

Антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, предусматривается для применения в качестве лекарственного средства. Введение достигается различными путями, например, путем внутривенного, интраперитонеального, подкожного, внутримышечного, местного или интрадермального введения. В некоторых вариантах осуществления способ введения зависит от вида терапии и вида соединения, содержащегося в фармацевтической композиции. Режим дозирования будет определяться назначенным терапевтом и другими клиническими факторами. Дозировки для любого пациента зависят от множества факторов, включая размеры пациента, площадь поверхности тела, возраст, пол, конкретное соединение, которое предполагается вводить, время и способ введения, вид терапии, общее состояние здоровья и наличие других применяемых одновременно лекарственных средств. "Эффективная доза" относится к количеству активного ингредиента, которое является достаточным для воздействия на течение и тяжесть заболевания, приводя к уменьшению или ремиссии такой патологии. "Эффективная доза", полезная для лечения и/или предупреждения AML, может быть определена с использованием способов, известных в данной области.

В других вариантах осуществления антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации со стандартной терапией CD33⁺ типов рака, заболеваний или патологических состояний. Стандартные виды терапии включают химиотерапию, иммунотерапию, гормональную терапию, лучевую терапию, хирургическое вмешательство, генную терапию и т.п. В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации со стандартной терапией AML. В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с цитарабином, азациитидином, децитабином, антрациклином (например, даунорубицином, идарубицином, доксорубицином и т.п.), амсакрином, флударабином, клофарабином, кладрибином, неларабином, метотрексатом, бортезомибом, карфилзомибом, мелфаланом, ибрутинибом, талидомидом, леналидомидом, помалидомидом, апремиластом, эписподофиллотоксином (например, этопозидом, тенипозидом и т.п.), антрацендионом (например, митоксантроном, пиксантроном, лозоксантроном, пироксантроном, аметантроном и т.п.), анти-CD20 агентом (например, ритуксимабом, окрелизумабом, офатумумабом или их комбинациями). В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с цитарабином (ага-С). В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с азациитидином. В определенных случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с децитабином. В других случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с антрациклином (например, даунорубицином, идарубицином, доксорубицином и т.п.). В других случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с ингибитором контрольных точек (например, ингибитором PD-1, ингибитором CTLA-4 и т.п.). В еще других случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с эписподофиллотоксином (например, этопозидом, тенипозидом и т.п.). В еще других случаях антигенсвязывающее тандемное диатело, описанное здесь, вводят в комбинации с антрацендионом (например, митоксантроном, пиксантроном, лозоксантроном, пироксантроном, аметантроном и т.п.).

Представленные ниже примеры дополнительно иллюстрируют описанные варианты осуществления без ограничения объема изобретения.

Пример 1.

Клонирование экспрессионных ДНК-конструкций, кодирующих одноцепочечные Fv антитела.

Для бактериальной экспрессии анти-CD33 одноцепочечных Fv (scFv) антител в *E. coli* кодирующие последовательности ДНК всех молекул клонировали в бактериальный экспрессионный вектор. Все экспрессионные конструкции были разработаны так, чтобы они содержали кодирующие последовательности для N-концевого сигнального пептида и C-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-метки для содействия секреции антитела в периплазму и очистке, соответственно. Аминокислотные последовательности VL- и VH-доменов от всех анти-CD33 scFv-клонов показаны в табл. 3 и 4.

Экспрессия рекомбинантных анти-CD33 scFv-антител в *E. coli*.

Рекомбинантные scFv-антитела экспрессировали в виде растворимых секретируемых белков в периплазме *E. coli*. На первой стадии культуральную среду, дополненную ампициллином, инокулировали трансформированными бактериями и инкубировали в течение 16 ч при 28°C. Затем оптическую плотность регулировали путем добавления второй среды, дополненной ампициллином, и снова инкубировали при 28°C до достижения оптической плотности в диапазоне 0,6-0,8 при 600 нм. Экспрессию белка индуцировали посредством добавления 50 мкМ IPTG и инкубации культур при 21-28°C и 200 об/мин в течение 16 ч. После инкубации клетки осаждали центрифугированием (30 мин, 4°C, 7500 об/мин) и хранили при -20°C до последующей обработки.

Очистка анти-CD33 одноцепочечных Fv-фрагментов антител.

Рекомбинантный scFv-фрагмент выделяли из периплазмы *E. coli* после центрифугирования культур бактериальных клеток путем ресуспендирования клеточного осадка в буфере и инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре при осторожном перемешивании. Клетки осаждали путем центрифугирования и супернатанты, содержащие рекомбинантные белки, сохраняли. Процедуру повторяли снова перед объединением супернатантов и гомогенизацией путем обработки ультразвуком. Гомогенаты раз-

водили, дополняли низкими концентрациями имидазола и нагружали на предварительно упакованную колонку (GE Healthcare) для аффинной хроматографии с использованием иммобилизованных металлов (ИМАС). Колонку промывали до достижения исходного уровня и связанный белок затем элюировали имидазольным буфером. Содержащие антитело фракции объединяли и затем очищали эксклюзионной хроматографией (SEC). В заключение белковые элюаты концентрировали путем ультрафильтрации и диализировали против буфера хранения. После обработки при низком pH (инкубация при pH 3,0 в течение 20-24 ч при 37°C) образцы нейтрализовали с использованием Tris. Очищенные белки хранили в виде аликвот при -80°C до использования.

Пример 2.

Клонирование экспрессионных ДНК-конструкций, кодирующих тандемные диатела (TandAb®)

Для экспрессии биспецифических тандемных диател в клетках CHO кодирующие последовательности всех молекул клонировали в экспрессионную векторную систему млекопитающего. Домены scFv анти-CD33 из примера 1 использовали для конструирования CD33/CD3 тандемных диател в комбинации с доменом scFv анти-CD3, при этом домены организованы, как показано в табл. 7 и на фиг. 3. Вкратце, синтезировали и субклонировали генные последовательности, кодирующие VH- и VL-домены анти-CD33, отделенные пептидным линкером (VH-линкер-VL или VL-линкер-VH). Полученную конструкцию расщепляли для создания отдельных последовательностей, кодирующих VH- и VL, используя сайт рестрикции Bam HI, локализованный в пределах последовательности линкера. Эти фрагменты VH и VL затем лигировали с фрагментом ДНК, кодирующим VH- и VL-домены анти-CD3 (VH-линкер-VL или VL-линкер-VH), с получением конечной конструкции. Варианты 1-3 порядка доменов CD33/CD3 тандемных диател показаны на фиг. 3. Все экспрессионные конструкции разработаны так, чтобы содержать кодирующие последовательности для N-концевого сигнального пептида и C-концевой гекса-гистидиновой (6×His)-метки для содействия секреции и очистке антитела, соответственно.

Экспрессия тандемных диател в стабильно трансфицированных клетках CHO

Использовали систему экспрессии в клетках CHO (Flp-In®, Life Technologies), производное клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 (ATCC, CCL-61) (Kao and Puck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1968; 60(4):1275-81). Адгезивные клетки субкультивировали в соответствии со стандартными протоколами культивирования клеток, представленными фирмой Life Technologies.

Для адаптации к росту в суспензии клетки открепляли от культуральных флаконов и помещали в бессывороточную среду. Адаптированные к суспензии клетки криоконсервировали в среде, содержащей 10% DMSO.

Рекомбинантные клеточные линии CHO, стабильно экспрессирующие секретлируемые тандемные диатела, генерировали путем трансфекции адаптированных к суспензии клеток. Во время селекции с помощью антибиотика гигромицина В измеряли плотности жизнеспособных клеток два раза в неделю, и клетки центрифугировали и ресуспендировали в свежей селекционной среде при максимальной плотности $0,1 \times 10^6$ жизнеспособных клеток/мл. Пулы клеток, стабильно экспрессирующие тандемные диатела, извлекали через 2-3 недели селекции и клетки переносили в стандартную культуральную среду во встряхиваемые колбы. Экспрессию рекомбинантных секретлируемых белков подтверждали с помощью геле-электрофореза или проточной цитометрии. Пулы стабильных клеток криоконсервировали в среде, содержащей DMSO.

Тандемные диатела получали в 10-дневных культурах с подпиткой стабильно трансфицированных клеточных линий CHO путем секреции в супернатант клеточной культуры. Супернатанты клеточных культур собирали через 10 дней при показателях жизнеспособности культур обычно >75%. Образцы собирали из культур для продуцирования через день и оценивали плотность и жизнеспособность клеток. В день сбора супернатанты клеточных культур осветляли путем центрифугирования и вакуумной фильтрации перед последующим использованием.

Титры экспрессии белка и целостность продукта в супернатантах клеточных культур анализировали с помощью SDS-PAGE.

Очистка тандемных диател.

Тандемные диатела очищали из супернатантов клеточных культур CHO в ходе двухстадийной процедуры. His6-меченые конструкции подвергали хроматографии на Ni-NTA Superflow на первой стадии с последующей препаративной эксклюзионной хроматографией (SEC) на колонке Superdex 200 на второй стадии. Элюированные тандемные диатела характеризовали на их содержание гомодимеров (тандемное диатело) и объединяли, если содержание гомодимеров составляло 90% или более. В заключение, объединенные образцы подвергали замене буфера и концентрировали путем ультрафильтрации до типичной концентрации >1 мг/мл. Чистоту и гомогенность (обычно >90%) конечных образцов оценивали с помощью SDS PAGE в восстановительных и невосстановительных условиях с последующим иммуноблоттингом с использованием анти-His-Tag антитела, а также путем аналитической эксклюзионной хроматографии (SEC), соответственно.

Очищенные белки хранили в аликвотах при -80°C до использования.

Полипептиды CD33/CD3 тандемных диател показаны в табл. 7 и на фиг. 3. Каждое тандемное диа-

тело состоит из двух идентичных полипептидов (фиг. 1). Оба внешних линкера L1 и L3 состоят из шести аминокислот GGS₂GS (SEQ ID NO: 95), тогда как центральный пептидный линкер 2 варьирует по длине (4-6 аминокислот) с последовательностями GGS₂G (SEQ ID NO: 96), GGS₂GG (SEQ ID NO: 97) или GGS₂GS (SEQ ID NO: 95) соответственно.

Используя серии переменных доменов анти-CD33 и переменных доменов анти-CD3 генерировали большое число молекул тандемных диател, которые могут стабильно продуцироваться в трансфицированных клеточных линиях и которые сохраняют стабильность при температуре тела, а также после повторных циклов замораживания/оттаивания. Для содействия дальнейшей разработке и доклиническим токсикологическим исследованиям внимание акцентировали на селекции молекул тандемных диател, которые показали связывание как с человеческим CD33, так и CD33 макака-крабоедов. Примеры полных аминокислотных последовательностей показаны для единичной цепи тандемных диател 12 (SEQ ID NO: 109), 14 (SEQ ID NO: 111) и 16 (SEQ ID NO: 113) на фиг. 10L, 10N и 10P, соответственно. В этом примере порядок переменных доменов и их линкеров для структур представляет собой следующий: VL (CD3)-L1-VH (CD33)-L2-VL (CD33)-L3-VH (CD3). Во время очистки С-концевая гексагистидиновая (6×His)-метка отщепляется. Полные аминокислотные последовательности для вышеуказанных тандемных диател после удаления гексагистидиновой метки представляют собой тандемное диатело 12 (SEQ ID NO: 134), тандемное диатело 14 (SEQ ID NO: 136) и тандемное диатело 16 (SEQ ID NO: 138), как показано на фиг. 11L, 11N и 11P соответственно.

Пример 3.

Определение аффинности антител путем проточной цитометрии.

Клетки инкубировали с 100 мкл серийных разведений CD33/CD3 тандемных диател. После промывки три раза буфером FACS клетки инкубировали с 0,1 мл 10 мкг/мл мышинового моноклонального анти-His антитела в том же самом буфере в течение 45 мин на льду. После второго цикла промывки клетки инкубировали с 0,1 мл 15 мкг/мл FITC-конъюгированных козьих анти-мышинных IgG-антител в тех же самых условиях, как и ранее. В качестве контроля клетки инкубировали анти-His IgG с последующими FITC-конъюгированными козьими анти-мышинными IgG-антителами без анти-CD33 тандемных диател. Затем клетки снова промывали и ресуспендировали в 0,2 мл буфера FACS, содержащего 2 мкг/мл иодида пропидия (PI), для исключения погибших клеток. Флуоресценцию 1×10^4 живых клеток измеряли на проточном цитометре FC500 MPL фирмы Beckman-Coulter с использованием программного обеспечения MXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) или на проточном цитометре Millipore Guava EasyCyte с использованием программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Germany). Средние интенсивности флуоресценции клеточных образцов рассчитывали с использованием программного обеспечения CXP (Beckman-Coulter, Krefeld, Germany) или программного обеспечения Incyte (Merck Millipore, Schwalbach, Germany). После вычитания значений интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных только вторичными и третичными реагентами, значения использовали для расчета величин K_D с помощью уравнения для односайтового связывания (гипербола) GraphPad Prism (версия 6.00 для Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA).

Тандемные диатела тестировали на их аффинности связывания с человеческими CD3⁺ и CD33⁺ клетками и CD3⁺ и CD33⁺ клетками макака-крабоедов. Иллюстративные данные по связыванию для выбранных тандемных диател представлены в табл. 8:

Таблица 8

Характеристики CD3- и CD33-связывания CD33/CD3 тандемных диател

TandAb	K_D на T-клетках [нМ]	K_D на HL-60 [нМ]	K_D на KG-1 [нМ]	K_D на U-937 [нМ]	Отношение K_D CD33макак/CD33чел	EC ₅₀ на HL-60 [нМ]
01	94.2	0.6	0.9	7.1	0.7	1.9
02	69.8	0.2	0.3	0.9	1.1	0.5
03	81.9	1.1	1.8	8.9	0.6	3.6
04	79.3	0.5	0.5	1.7	1.1	1.8
05	69.5	1.0	1.2	6.2	0.8	2.7
06	86.3	0.4	0.5	1.6	0.8	1.6
07	49.7	13.7	47.9	47.1	45.8	17.8
08	2.4	0.3	0.5	1.8	0.6	1.8
09	2.4	0.5	0.3	2.2	1.0	6.8
10	1.9	0.5	1.0	1.7	0.8	7.0
11	2.6	0.3	0.5	0.6	1.2	5.9
12	1.5	0.3	0.9	0.5	1.7	1.3
13	55.7	0.2	0.3	0.5	1.6	1.1
14	2.1	0.3	0.3	1.2	1.0	1.6
15	1.3	0.4	0.3	0.9	1.1	1.8
16	2.1	0.3	0.2	0.3	1.4	1.5
17	3.3	5.0	52.5	24.4	1.9	18.4
18	1.9	3.4	16.3	15.1	3.1	6.3
19	6.3	2.8	3.6	5.4	37.3	5.7
20	143.8	4.1	7.0	7.2	33.8	10.0
21	2.1	9.7	25.1	80.2	0.9	7.6
22	4.1	0.7	2.0	8.6	0.6	3.2
23	97.2	0.4	1.0	5.1	1.9	2.8
24	2.3	5.6	12.4	39.5	1.8	9.6

Отношение $\#K_D$ CD33 макак-крабоедов/CD33 человека рассчитывали на основе значений K_D , измеренных на клетках CHO, экспрессирующих CD33 макак-крабоедов и CD33 человека, соответственно. Отношение $\ddagger K_D$ CD3 человека/CD33 человека рассчитывали на основе значений K_D , измеренных на клетках Jurkat (CD3 человека) и среднем значении K_D трех человеческих CD33⁺ опухолевых клеточных линий (HL-60, KG-1, U937).

Аффинность связывания с CD3 и кроссреактивность оценивали в экспериментах по титрованию и проточной цитометрии на CD3⁺ клетках линии Jurkat (предоставленных Dr. Moldenhauer, DKFZ Heidelberg; острый Т-клеточный лейкоз человека) и CD3⁺ клеточной линии HSC-F макак-крабоедов (JCRB, номер по каталогу: JCRB1164). Связывание с CD33 и кросс-реактивность оценивали на человеческих CD33⁺ опухолевых клеточных линиях: HL-60 (DSMZ, номер по каталогу: ACC 3, человеческий В-клеточный лейкоз из клеток-предшественников), U-937 (DSMZ, номер по каталогу: ACC5; человеческая гистиоцитарная лимфома) и KG-1 (DSMZ, номер по каталогу: ACC14; острый миелоидный лейкоз). Соотношение K_D кросс-реактивности рассчитывали с использованием значений K_D , определенных на клеточных линиях CHO, экспрессирующих рекомбинантные антигены человека или макак-крабоедов.

Тандемные диатела проявили относительно высокую аффинность в отношении человеческих CD33⁺ клеток на большинстве протестированных опухолевых клеточных линий, равную менее 1 нМ. Было определено, что аффинности в отношении человеческого CD3 равны 2 нМ или менее.

Пример 4.

Анализ цитотоксичности.

Для анализа цитотоксичности клетки-мишени, культивированные в стандартных условиях, собирали, промывали и ресуспендировали в разбавителе C, содержащемся в наборе PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit, до плотности 2×10^7 клеток/мл. Затем клеточную суспензию смешивали с равным объемом раствора PKH67 для мечения двойной концентрации и инкубировали в течение 2-5 мин при

комнатной температуре (RT). Реакцию окрашивания выполняли путем добавления равного объема FCS и инкубации в течение 1 мин. После промывки меченых клеток-мишеней полной средой RPMI клетки подсчитывали и ресуспендировали до плотности 2×10^5 клеток/мл в полной среде RPMI. Затем 2×10^4 клеток-мишеней высевали вместе с обогащенными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т, равном 5:1, в присутствии возрастающих концентраций указанных тандемных диател в индивидуальные лунки микротитровального планшета в общем объеме 200 мкл/лунку. Спонтанную клеточную гибель и уничтожение мишеней Т-клетками в отсутствие антител определяли по меньшей мере в трех повторах на каждом планшете. После центрифугирования аналитические планшеты инкубировали в течение указанных периодов времени при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации культуры промывали один раз буфером FACS и затем ресуспендировали в 150 мкл буфера FACS, дополненного 2 мкг/мл PL Абсолютное количество живых клеток-мишеней измеряли по положительному зеленому окрашиванию PKH67 и негативному окрашиванию на PI с использованием проточного цитометра Beckman-Coulter FC500 MPL (Beckman-Coulter) или проточного цитометра Millipore Guava EasyCyte (Merck Millipore). На основе измеренных оставшихся живых клеток-мишеней рассчитывали процент специфического лизиса клеток согласно следующей формуле:

$$[1 - (\text{число живых мишеней(образец)}/\text{число живых мишеней(спонтанных)})] \times 100\%.$$

Сигмоидальные кривые доза-ответ строили и значения EC₅₀ рассчитывали с помощью нелинейной регрессии/4-параметрической логистической аппроксимации с использованием программного обеспечения GraphPad. Величины лизиса, полученные для заданной концентрации антитела, использовали для расчета сигмоидальных кривых доза-ответ с помощью анализа путем 4-параметрической логистической аппроксимации с использованием программного обеспечения Prism.

Значения EC₅₀ определяли в 20-24-часовом анализе на CD33⁺ клетках-мишенях U-937 (DSMZ, номер по каталогу: ACC5; гистиоцитарная лимфома человека) с обогащенными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении 5:1. Некоторые тандемные диатела также тестировали в анализах цитотоксичности на CD33⁺ клетках мишенях KG-1 (DSMZ, номер по каталогу: ACC14; острый миелоидный лейкоз) и HL-60. В частности, клетки HL-60 выбирали в качестве модели AML с относительно высокой экспрессией CD33 на клеточной поверхности (относительных единиц MFI [среднее значение \pm SEM]: 3,133 \pm 215; n=3) и KG-1а выбирали в качестве модели AML с очень ограниченной экспрессией CD33 (относительных единиц MFI: 277 \pm 11; n=3). Иллюстративные данные по цитотоксичности для выбранных тандемных диател представлены в табл. 9. Дополнительные данные по цитотоксичности для клеточных линий HL-60 содержатся в последней колонке в табл. 8.

Таблица 9

In vitro активность CD33/CD3 тандемных диател на различных CD33⁺ опухолевых клеточных линиях

Тандемное диатело	EC ₅₀ [пМ (пг/мл)] на человеческих CD33 ⁺ целевых клеточных линиях							
	HL-60		U-937		KG-1	Среднее значение		
12	1.3	(137)	0.8	(84)	1.2	(126)	1.1	(116)
14	1.6	(168)	3.6	(378)	2.6	(273)	2.6	(273)
16	1.5	(158)	1.9	(200)	1.8	(189)	1.7	(179)

Значения EC₅₀ определяли в анализах цитотоксичности на основе FACS с первичными человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т, равном 5:1, на указанных целевых клеточных линиях, инкубированных в течение 20-24 часов. Каждое тандемное диатело тестировали на каждой опухолевой клеточной линии по меньшей мере в двух независимых экспериментах. Представлены средние значения.

Пример 5.

Дополнительные эксперименты по скринингу цитотоксичности в человеческих CD33⁺ клеточных линиях AML через 48 ч.

Как описано выше, значительную цитотоксичность детектировали уже через 24 ч, однако через 48 ч могут быть детектированы более высокие уровни токсичности. Для последующих анализов выбирали временную точку 48 ч. Тестировали влияние селекции Т-клеток на индуцированную тандемным диателом цитотоксичность. Для этого получали нестимулированные РВМС от здоровых доноров-добровольцев и CD3⁺ клетки выделяли путем простого "позитивного обогащения" посредством использования микрочастиц CD3, а также путем более сложной "негативной селекции" посредством коктейля микрочастиц, состоящего из антител против CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 и CD235a. Как показано на фиг. 4, индуцированная тандемным диателом цитотоксичность была более высокой при использовании подвергнутых негативной селекции Т-клеток здоровых доноров, чем при использовании подвергнутых позитивной селекции Т-клеток. Однако способ селекции Т-клеток не влиял на относительные цитотоксические активности индивидуальных тандемных диател. Поэтому последующие анализы выполняли с позитивно обогащенными Т-клетками здоровых доноров.

Нестимулированные мононуклеарные клетки собирали от здоровых взрослых добровольцев путем лейкофереза в Hematopoietic Cell Processing Core (Core Center of Excellence) Центра исследования рако-

вых заболеваний имени Fred Hutchinson (FHCRC) согласно протоколам исследования, одобренным Институциональным наблюдательным советом FHCRC. Т-клетки обогащали посредством магнитного клеточного сортирования с помощью CD3 Microbeads ("позитивное обогащение") или набора Pan T-Cell Isolation Kit ("негативная селекция"; оба от фирмы Miltenyi Biotec, Auburn, CA), а затем замораживали в аликвотах и хранили в жидком азоте. Оттаявшие аликвоты клеток метили 3 мкМ Cell Vue Burgundy (eBioscience, San Diego, CA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Очищенные PBMC культивировали в присутствии различных концентраций молекул тандемных диател.

Для количественного определения индуцированной лекарственным средством цитотоксичности клетки инкубировали при 37°C (в атмосфере 5% CO₂ в воздухе), как в примере 4, при различных соотношениях эффектор:мишень (Е:Т). Через 24-72 ч число клеток и индуцированную лекарственным средством цитотоксичность, используя DAPI для детекции нежизнеспособных клеток, определяли с использованием цитометра LSRII (BD Biosciences) и анализировали с помощью FlowJo. Клетки AML идентифицировали по свойствам прямого/бокового светорассеяния и, в экспериментах, в которых были добавлены Т-клетки здоровых доноров, негативности на краситель CellVue Burgundy (фиг. 5). Индуцированная лекарственным средством цитотоксичность представлена в виде:

$$\% \text{ цитотоксичность} = 100 \times (1 - \text{живые клетки-мишени}_{\text{обработанные}} / \text{живые клетки-мишени}_{\text{контроль}}).$$

Результаты анализов цитотоксичности представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Непараметрическую корреляцию Спирмена использовали для вычисления корреляций между характеристиками непрерывной выборки. Все Р-значения являются двухсторонними. Статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

В отсутствие Т-клеток здоровых доноров ни одно из CD33/CD-тандемных диател не проявило какого-либо заметного цитотоксического эффекта в отношении клеточных линий AML в отсутствие Т-клеток, подтверждая абсолютную необходимость в Т-клетках для их цитотоксических эффектов (данные не показаны). В присутствии Т-клеток степень индуцированной тандемным диателом специфической цитотоксичности зависела от концентрации тандемного диатела, а также соотношения эффектор:мишень (Е:Т). Прямые сравнительные исследования молекул тандемных диател, направленных на CD33/CD3, и одного контрольного тандемного диатела (00) показали значительные различия в индуцированной антителом цитотоксичности в клетках HL-60 (фиг. 6А, В и табл. 10) и клетках KG-1a (фиг. 6С, D и табл. 10), при этом результаты являются высоковоспроизводимыми в повторных экспериментах. В целом, степень индуцированной тандемным диателом цитотоксичности коррелировала с аффинностью связывания в отношении CD3 на первичных человеческих Т-клетках (для цитотоксичности в клетках KG-1a при 25 пМ (приблизительно 2,5 нг/мл) и Е:Т=5:1: $r=-0,542$, $p=0,009$; для цитотоксичности в клетках HL-60 при 25 пМ и Е:Т=5:1: $r=-0,391$, $p=0,07$). Тандемные диатела 12, 14, 16 были высокоцитотоксичными как для клеток HL-60, так и для клеток KG-1a.

Таблица 10

Индукция CD25 и CD69 и цитотоксичность через 48 ч CD33/CD3 тандемных диател

Тандемное диатело ¹	CD3 К _б (нМ) чел. Т-клетки	CD33 К _б (нМ) клетки HL-60	Индукция CD25 EC ₅₀ (нМ) ²	Индукция CD69 EC ₅₀ (нМ) ²	Пролиферация Т-клеток в РВМС EC ₅₀ (нМ) ³	Цитотоксичность клеток HL-60 (% ± SEM) ⁴	Цитотоксичность клеток KG-1a (% ± SEM) ⁴
15	1.3	0.4	6	7	7	82.9 ± 3.7	80.2 ± 1.9
12	1.5	0.3	6	3	2	84.7 ± 2.3	85.6 ± 1.6
10	1.9	0.5	10	6	6	48.0 ± 2.4	78.6 ± 2.3
14	2.1	0.3	10	7	6	86.0 ± 0.4	69.8 ± 5.7
21	2.1	9.7	ND	225	500	12.4 ± 1.0	0.0 ± 0.2
24	2.3	5.6	ND	57	264	24.5 ± 1.9	1.1 ± 0.2
09	2.4	0.5	11	7	9	43.2 ± 15.8	74.6 ± 3.2
11	2.6	0.3	11	5	6	52.7 ± 8.1	84.7 ± 1.4
17	3.3	5.0	30	114	30	4.2 ± 0.2	0.7 ± 0.4
22	4.1	0.7	10	4	7	74.2 ± 7.4	44.4 ± 5.3
16	5.1	0.3	1	2	3	86.0 ± 1.4	81.3 ± 1.5
19	6.3	2.8	9	5	6	79.4 ± 3.5	83.8 ± 2.9
07	49.7	13.7	134	65	50	6.3 ± 3.3	2.1 ± 0.7
13	55.7	0.2	30	22	23	70.4 ± 2.5	1.3 ± 0.4
05	69.5	1	116	74	74	23.8 ± 6.9	0.3 ± 0.3
02	69.8	0.2	42	27	4	80.9 ± 3.6	4.6 ± 2.1
04	79.3	0.5	94	62	44	24.1 ± 4.0	0.7 ± 0.8
03	81.9	1.1	117	87	63	13.1 ± 3.6	0.0 ± 0.5
06	86.3	0.4	39	21	48	45.7 ± 6.4	1.4 ± 0.2
01	94.2	0.6	92	91	89	8.0 ± 1.6	0.4 ± 0.4
23	97.2	0.4	41	17	37	73.7 ± 2.6	1.5 ± 0.3
20	143.8	4.1	98	75	38	31.2 ± 3.9	1.1 ± 0.3

¹Тандемные диатела (TandAbs) указаны в порядке увеличения аффинности в отношении CD3.

²Индукцию CD25 и CD69 измеряли через 24 ч в нефракционированных культурах РВМС.

³Т-клеточная пролиферация, индуцированная CD33/CD3 тандемными диателами в нефракционированных РВМС с присутствующими CD33⁺ клетками.

⁴Цитотоксичность (%) через 48 ч DAPI⁺ клеток при концентрации тандемных диател 25 нМ в присутствии Т-клеток здоровых доноров при клеточном соотношении Е:Т, равном 5:1, из трех независимых экспериментов, выполненных в лунках в двух повторах.

ND: активации CD25 не обнаружено.

Пример 6.

Дополнительная характеристика тандемных диател в образцах первичного АМЛ человека.

Для полного описания цитотоксических свойств этих кандидатов образцы от пациентов с АМЛ получали для исследований из хранилища образцов FHCRC.

Из хранилищ FHCRC получали замороженные аликвоты выделенных на фиколле мононуклеарных клеток из образцов периферической крови или костного мозга, взятых до лечения ("диагностических") у взрослых пациентов с АМЛ. Использовали критерии WHO 2008 для определения АМЛ (Vardiman et al.; Blood. 2009; 114(5):937-951) и уточненные критерии Британского совета медицинских исследований (United Kingdom Medical Research Council, MRC) для оценки цитогенетического риска (Grimwalde et al.; Blood. 2010; 116(3):354-365). Пациенты давали письменное информированное согласие на сбор и использование их биологических материалов в исследовательских целях согласно протоколам, утвержденным Экспертным советом организации FHCRC. Клинические данные деидентифицировали в соответствии с Законом о преемственности страхования и отчетности в области здравоохранения (Health Insurance Portability and Accountability Act). После оттаивания клетки окрашивали напрямую мечеными антителами, распознающими CD33 (клон Р67.6; PE-Cy7-конъюгированные), CD3 (клон SK7; PerCP-конъюгированные), CD34 (клон 8G12; APC-конъюгированные; все от фирмы BD Biosciences, San

Jose, CA), и CD45 (клон HI30; APC-eFluor®780-конъюгированные; eBioscience). Для идентификации нежизнеспособных клеток образцы окрашивали 4',6-диамино-2-фенилиндолом (DAPI). По меньшей мере 10000 событий собирали на проточном цитометре Canto II (BD Biosciences) и окрашенные DAPI клетки анализировали с использованием FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

После оттаивания образцы имели >58% бластов AML по данным проточной цитометрии на основании параметров экспрессии CD45/бокового светорассеяния. Образцы имели >50% жизнеспособных клеток непосредственно после оттаивания, и >50% жизнеспособных клеток через 48 ч в цитокин-содержащей жидкой культуре (фиг. 7). Средний возраст пациентов составил 58,1 лет (диапазон: 23,9-76,2) лет; риск заболевания по данным цитогенетической диагностики был благоприятным у 2, промежуточным у 18, и неблагоприятным у 7. Информация по мутационному статусу генов NPM1, FLT3 и СЕВРА была неполной; однако было известно, что один образец является СЕВРА^{double-mutant}, и другой образец является NPM1^{pos}/FLT3-ITD^{neg}. Среднее процентное содержание миелоидных бластов и CD3⁺ Т-клеток в исследуемых образцах составило 86,1% (диапазон: 58,4-97,0%) и 2,0% (диапазон: 0-11,9%) соответственно, и средняя жизнеспособность образцов через 48 ч в культуре составила 80,1% (диапазон: 53,6-93,6%). На момент сбора образцов 15 пациентов имели впервые диагностированный AML, тогда как 12 пациентов имели рецидивирующее (n=7) или рефракторное (n=5) заболевание. Как показано в табл. 11, основные характеристики образцов, полученных от пациентов с впервые диагностированным AML, аналогичны характеристикам образцов, полученных от пациентов с рецидивирующим/рефракторным заболеванием, в отношении экспрессии CD33 на миелоидных бластах, количества аутологичных Т-клеток, доли миелоидных бластов и жизнеспособности в культуре.

Добавление молекул тандемного диатела к образцам культур AML привело к умеренной дозозависимой цитотоксичности (фиг. 8А), демонстрируя, что аутологичные Т-клетки, содержащиеся в образцах от пациентов с активным AML, могут участвовать в лизисе лейкозных клеток. В присутствии Т-клеток здоровых доноров цитотоксическая активность индивидуальных тандемных диател находилась в строгой зависимости от дозы лекарственного средства и соотношения эффектор:мишень (Е:Т) (фиг. 8В, С). Однако высокая активность тандемных диател наблюдалась даже в некоторых образцах с очень низкой экспрессией CD33 на бластах AML. Среди молекул тандемных диател 12-я оказалась наиболее активной, поскольку имела самую высокую цитотоксичность при низких концентрациях (2,5 пМ (приблизительно 250 нг/мл) и, до менее значительной степени, также 10 пМ (приблизительно 1 нг/мл) при обоих соотношениях Е:Т=1:3 и Е:Т=1:1.

CD33/CD3 тандемные диатела подвергали скринингу в репрезентативных образцах крови от пациентов с AML, которые различались по полу, возрасту, стадии заболевания (впервые диагностированное, рецидивирующее, рефракторное) пациента, степени экспрессии CD33 и цитогенетическому риску (табл. 11). Примечательно, что ряд исследованных тандемных диател (например, 02, 08, 09, 11, 12, 14, 16, 19, 22 и 23) были высокоактивными почти во всех образцах от пациентов по спектру заболеваний, как показано на фиг. 17. Кроме того, степень и объем активности являются сходными на всех стадиях AML, включая впервые диагностированных, рецидивирующих и рефракторных пациентов.

Таблица 11

Характеристики образцов первичного AML

	Все пациенты (n=27)	Впервые диагностированные AML (n=15)	Рецидивирующие/ рефракторные AML (n=12)
Средний возраст (диапазон), лет	58.1 (23.9-76.2)	64.0 (40.2-76.2)	44.4 (23.9-67.4)
Цитогенетический/молекулярный риск			
Благоприятный	2	2	--
Промежуточный	18	10	8
СЕВРА ^{double-mutant}	1	1	--
NPM1 ^{pos} /FLT3-ITD ^{neg}	1	--	1
NPM1 ^{pos} /FLT3-ITD ^{pos} or NPM1 ^{neg} /FLT3-ITD ^{pos}	10	5	5
Неблагоприятный	7	3	4
Источник образцов			
Костный мозг	11	4	7
Периферическая кровь	16	11	5
Средний % бластов (диапазон)	86.1 (58.4-97.0)	86.1 (66.7-95.5)	86.7 (58.4-97.0)
Средняя экспрессия CD33 на бластах (диапазон)	849 (5-5,356)	849 (5-5,356)	788 (7-2,242)
Средний % Т-клеток (диапазон)	2.0 (0-11.9)	1.6 (0-11.9)	2.1 (0.7-8.7)
Средний % жизнеспособности через 48 часов (диапазон)	80.1 (53.6-93.6)	76.0 (53.6-93.6)	83.5 (63.9-93.1)

Пример 7.

Активность и эффективность CD33/CD3 тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16 на различных CD33⁺ клеточных линиях разного происхождения, экспрессирующих различные уровни CD33.

Для оценки зависимости активности и эффективности CD33/CD3 тандемных диател от плотности CD33 на клетках-мишенях различные человеческие CD33⁺ опухолевые клеточные линии и клетки СНО,

экспрессирующие рекомбинантный человеческий CD33, тестировали на их уровни экспрессии CD33 с использованием набора для количественного определения QIFIKIT quantification kit и анти-CD33 моноклонального антитела WM53. Результаты в табл. 12 показывают, что плотности CD33 на опухолевых клеточных линиях находятся в диапазоне от ~1300 SABC (стандартизованная связывающая способность антител) до ~46000 SABC. Экспрессия на клетках CHO-CD33 составила ~197000 SABC, значительно выше, чем на опухолевых клеточных линиях. Все тестируемые CD33⁺ клеточные линии использовали в качестве клеток-мишеней по меньшей мере в трех независимых анализах цитотоксичности на основе FACS с человеческими Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношении эффектор:мишень 5:1 в присутствии серийных разведений CD33/CD3 тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16. В каждом анализе рассчитывали значения EC₅₀ и опосредованного тандемным диателом лизиса с помощью нелинейной регрессии. Результаты показали, что ни активность (значения EC₅₀), ни эффективность (% лизиса) 12 и 16 не коррелируют с плотностью CD33 на поверхности клеток-мишеней.

Примечательно, что по меньшей мере 12 и 16 проявляют свою цитотоксическую активность также против клеток, подобных SEM, с очень низкими плотностями CD33, составляющими ниже 1500 SABC.

Таблица 12

Экспрессия CD33 на поверхности клетки-мишени и цитотоксическая активность CD33/CD3 тандемного диатела 12 и тандемного диатела 16

Линия клеток	Плотность CD33 [SABC]		12		16	
			EC ₅₀ [пМ]		EC ₅₀ [пМ]	
	среднее	SD	среднее	SD	среднее	SD
CHO-CD33	196990	28053	11.8	11.2	24.0	19.5
HL-60	45948	4478	1.4	0.5	1.6	0.4
KG-1	42828	6923	1.0	0.6	1.9	2.0
KASUMI-1	25922	6484	1.3	0.6	2.4	1.4
THP-1	22065	415	1.9	0.2	6.0	1.2
RPMI-8226	19931	2604	14.0	17.8	2.8	2.0
U-937	17669	4593	0.9	0.1	1.3	0.6
K562	13789	2156	4.5	1.3	4.8	2.7
BV-173	8518	1231	1.4	0.6	3.2	1.6
SEM	1306	144.2	2.2	0.5	5.1	3.0

Стандартизованную связывающую способность антитела (SABC) на CD33⁺ клеточных линиях определяли с использованием QIFIKIT и анти-CD33 моноклонального антитела WM53. Значения EC₅₀ для тандемных диател 12 и 16, перенаправляющих лизис клеток-мишеней, определяли в анализах цитотоксичности на основе FACS с человеческими первичными Т-клетками в качестве эффекторных клеток при соотношениях Е:Т 5:1 и инкубации в течение 20-24 ч; образцы с CD33-экспрессирующими клетками CHO инкубировали в течение 40-48 ч. Показано среднее значение и SD по результатам по меньшей мере трех независимых экспериментов.

Пример 8.

Активация Т-клеток TandAb и уничтожение *in vitro* клеток AML.

TandAbs инкубировали с очищенными человеческими Т-клетками и VPD-450-меченой человеческой CD33⁺ клеточной линией лейкоза KG-1, или CD33⁻ человеческой клеточной линией ALL, G2 (Е:Т 5:1). Проточную цитометрию использовали для оценки лизиса клеток-мишеней TandAbs (10⁻¹⁵-10⁻⁸ М; 24 ч, 37°C).

Инкубация TandAbs 12, 16 и 19 с человеческими Т-клетками эффективно лизировала клетки KG-1 (IC₅₀ ~0,01, 0,5 и 5 пМ соответственно). До 40% Т-клеток было активировано (CD25⁺) одновременно с ростом цитотоксической активности. Контрольное TandAb с нерелевантной мишенью, 00 (>10⁻⁷ М), не привело к значительному уничтожению KG-1 *in vitro*. Взятые отдельно TandAb 16 индуцировало лизис клеток KG-1 (IC₅₀=5×10⁻¹² М), при этом величина 1×10⁻⁸ М не имела эффекта на клетки CD33-G2. Результаты указывают на то, что Т-клетки стали активированными и активно лизировали опухолевые клетки, когда были нацелены на CD33⁺ лейкозные клетки (KG-1) и первичные CD33⁺ бласты AML с помощью CD33/CD3 TandAbs.

Пример 9.

Картирование эпитопов.

Тандемные диатела, содержащие различные CD33-связывающие фрагменты, подвергали картированию эпитопов с использованием технологии CLIPS Technology (Periscan) для идентификации CD33-связывающих эпитопов.

Технология CLIPS Technology способствует структурированию пептидов в единичные петли, двойные петли, тройные петли, свертывания в виде листа, свертывания в виде спирали и их комбинации, обеспечивая возможность картирования прерывистых эпитопов молекулы-мишени.

Синтезировали массив, содержащий более чем 7000 независимых пептидов, и связывание каждого антитела с пептидами тестировали с помощью ELISA.

Тандемные диатела 12, 14, 16 и 22 связываются с удлинением ${}_{62}\text{DQEVQEETQ}_{70}$ (SEQ ID NO: 94) в первом Ig-подобном домене человеческого CD33. Соответствующие аминокислотные удлинения показаны подчеркнутыми и выделенными жирным шрифтом на фиг. 10 и 11. Предполагается, что тандемные диатела 01, 02, 04, 06, 08, 09, 13 и 23 также связываются с этим эпитопом, так как эти тандемные диатела содержат такие же CD33-связывающие домены (SEQ ID NO: 2 и 12, 3 и 13, 5 и 15, 9 и 19), как тандемные диатела 12, 14, 16 и 12.

Пример 10.

Дозозависимый эффект в профилактической модели опухоли *in vivo*.

Тандемные диатела 12 и 16 сравнивали при различных уровнях доз в профилактической модели ксенотрансплантата опухоли HL-60 у мышей NOD/scid, восстановленных с использованием человеческих Т-клеток. Для достижения дозозависимого эффекта выбирали три уровня доз при 10, 1 и 0,1 мкг (0,5, 0,05 и 0,005 мг/кг).

Восемь экспериментальных групп иммунодефицитных мышей NOD/scid подвергали ксенотрансплантации путем подкожной инъекции суспензии 4×10^6 клеток HL-60. Перед инъекцией клетки смешивали с 3×10^6 Т-клеток, выделенных из лейкоцитарных пленок (здоровых доноров), используя негативную селекцию. Для учета потенциальной вариабельности Т-клеток между донорами каждую из экспериментальных групп подразделяли на три когорты, каждая из которых получала Т-клетки только одного индивидуального донора. Все животные экспериментальных групп, трансплантированные опухолевыми клетками и Т-клетками, получали внутривенный болюс на дни 0, 1, 2, 3 и 4 (qdx5) носителя (контроля) или 16 или 12 при трех различных уровнях доз, как указано (0,1, 1 и 10 мкг). Одна группа без обработки эффекторными клетками и носителем служила в качестве дополнительного контроля. В табл. 13 показано распределение по группам и режим дозирования.

Таблица 13

Лечебные группы для исследования *in vivo* зависимости доза-эффект в модели ксенотрансплантата HL-60

Группа	Лечение	Доза	Концентрация клеток / животное	Когорта	Режим введения (внутривенно, iv)	n
1	Носитель	---	4×10^6 HL-60			4
2	Носитель	---	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3
3	16	10 мкг	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3
4	16	1 мкг	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3
5	16	0.1 мкг	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3
6	12	10 мкг	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3
7	12	1 мкг	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3
8	12	0.1 мкг	4×10^6 HL-60 + 3×10^6 Т-клеток	Когорта 1	День 0, 1, 2, 3, 4	3
				Когорта 2		3
				Когорта 3		3

Лечебные группы для исследования *in vivo* зависимости доза-эффект в модели ксенотрансплантата HL-60.

Все животные в контрольных группах надежно развили опухоль и проявили однородный рост опухолей. Присутствие Т-клеток не повлияло на развитие опухолей. Различия в росте HL-60 не наблюдалось в присутствии или отсутствии Т-клеток в обработанных носителем контрольных группах.

Лечение обоими тестируемыми тандемными диателами выявило четкий дозозависимый противоопухолевый эффект (фиг. 12). Значительного различия между двумя тандемными диателами не было обнаружено. Нанесение на график средних объемов опухолей на фиг. 12 ограничивается днем 29, когда большинство лечебных групп завершили исследование. Исследование продолжали до дня 45 и животных наблюдали на безопухолевую выживаемость. В группах, подвергнутых лечению 10 или 1 мкг 16, 6 из 9 животных не имели опухоли в конце периода наблюдения и 5 из 9 животных, подвергнутых лечению 10 мкг 12, не имели опухоли на день 45. Одно животное оставалось без опухоли после лечения 1 мкг 12.

Все животные в контрольных группах надежно развили опухоль и проявили однородный рост опухолей. Обработка каждым из тандемных диател выявила дозозависимый противоопухолевый эффект и не было обнаружено существенного различия между двумя тандемными диателами до дня 29.

Поддающиеся детекции различия наблюдались только после длительного наблюдения (день 45),

когда группы, получавшие низкую дозу, и контрольные группы уже прекратили исследование по причине роста опухолей большого размера. В группах, подвергнутых лечению 16, имелось большее количество животных, не имеющих опухоли.

Пример 11.

Модель развившейся опухоли.

Для проверки правильности концепции разработали модель ксенотрансплантата у мышей NOD/scid с предварительно развившимися опухолями HL-60, с использованием 16.

Вкратце, иммунодефицитных самок мышей NOD/scid сублетально облучали (2 Gy) и подкожно инокулировали 4×10^6 клеток HL-60. На день 9 животные получали однократную болюсную инъекцию анти-Asialo GM1 кроличьего антитела (Wako, Neuss, Germany) для элиминации мышинных естественных клеток-киллеров (NK). На день 10, когда опухоль достигала объема 50-150 мм³ (среднее значение 73 ± 11 мм³), животных распределяли по трем лечебным группам. Группам 2 и 3 (8 животных в каждой группе) интраперитонеально инъецировали $1,5 \times 10^7$ активированных человеческих Т-клеток. Перед инъекцией Т-клетки выделяли из лейкоцитарных пленок (здоровых доноров), используя негативную селекцию. Т-клетки размножали и активировали с помощью набора T-Cell Activation/Expansion Kit в соответствии с инструкцией изготовителя (Miltenyi Biotech). Для решения проблемы, связанной с потенциальной вариабельностью доноров, группы 2 и 3 подразделяли на две когорты, каждая из которых получала размноженные и активированные Т-клетки от индивидуального донора. Каждая когорта получала Т-клетки только от одного индивидуального донора Т-клеток.

Таблица 14

Лечебные группы для модели ксенотрансплантата развившейся опухоли HL-60

Группа	Животные (n)	Инокулированные клетки		Когорта	Лечение
		День 0, подкожное введение	День 10, интраперитонеальное введение		
1	5	4×10^6 HL-60			Носитель (iv)
2	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клетки (Донор 1)	1	Носитель (iv)
	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клетки (Донор 2)	2	
3	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клетки (Донор 1)	1	TandAb 16 (iv) 50 мкг
	4	4×10^6 HL-60	$1,5 \times 10^7$ Т-клетки (Донор 2)	2	

Начиная с 13 дня средний объем опухоли у животных в группе 3 составил 105 мм³ и животным вводили в общей сложности 9 внутривенных доз по 50 мкг тандемного диатела 16 (qdx9d). В табл. 14 показано распределение по группам и режим дозирования. Группы 1 и 2 обрабатывали только носителем. Массу тела и объем опухоли определяли до дня 27.

Все животные надежно развивали опухоль, которая была пальпируемой на день 6. Средний объем опухоли у животных в группах 1 и 2 (HL-60), обработанных носителем, непрерывно увеличивался до прекращения исследования на день 27 (фиг. 13). В группе 2 животные, которые получали первичные активированные человеческие Т-клетки дополнительно к опухолевым клеткам HL-60, средний объем опухоли увеличивался быстрее по сравнению с группой 1 (только HL-60).

Повторное внутривенное введение с 13 по 21 день (qdx9) тандемного диатела 16 (50 мкг/животное; 2,5 мг/кг) в присутствии человеческих Т-клеток (группа 3) быстро задерживало рост опухоли по сравнению с группой 1 и группой 2. Тандемное диатело 16 задерживало рост опухоли в группе 3 приблизительно на 4-5 дней по сравнению с контрольной группой, обработанной носителем (группа 2). Статистически значимые различия в период времени с 6 по 27 день были выявлены между группой 2 (HL-60, Т-клетки, носитель) и группой 3 (HL-60, Т-клетки, 16) на день 22 ($p < 0,05$), день 23 ($p < 0,01$) и день 27 ($p < 0,01$) (двухфакторный дисперсионный анализ повторных измерений (ANOVA) с поправками Бонферрони). Статистически значимые различия между группой 1 и группой 3 отсутствовали из-за необычно медленного роста опухоли в группе 1.

Вариабельности доноров в отношении Т-клеточной активности не наблюдалось при сравнении развития опухолей в когорте 1 и когорте 2 в группе, которая получала Т-клетки от различных доноров (см. табл. 14).

В примере 10 показано, что была успешно разработана модель ксенотрансплантата у мышей NOD/scid с предварительно развившейся опухолью HL-60 (AML) и интраперитонеально привитыми человеческими Т-клетками. Повторное дозирование тандемным диателом 16 на уровне однократной дозы привело к статистически значимой задержке роста опухоли по сравнению с соответствующей контрольной группой, обработанной носителем. Полученные данные сравнимы с результатами, опубликованными для аналогичного исследования с использованием CD33/CD3 BiTE™ (Aigner et al., 2012; Leukemia, 2013, Apr; 27(5):1107-15).

Пример 12.

Эффективность CD33/CD3 тандемных диател в модели PDX AML у мышей NSG.

Криоконсервированные клетки от пациентов с AML, чей CD33⁺ лейкоз содержал 2-4% CD3⁺ Т-клеток, использовали для развития модели PDX AML у мышей NSG. Через 1 ч после инъекции опухолевых клеток облученным (250 cGy) мышам NSG, CD33/CD3 тандемные диатела, 16 или 12, в двух внутривенных дозах (50 или 5 мкг; n=8 мышей/группа) инъецировали в виде болюса в объеме 200 мкл. Дополнительные инъекции тандемных диател выполняли ежедневно в течение последующих 4 дней. Мышей взвешивали раз в неделю и затем умерщвляли на день 38 для сбора периферической крови, костного мозга и селезенки для анализа путем проточной цитометрии (huCD33, huCD34, huCD45, muCD45, huCD14, huCD3, huCD4, huCD8 и 7AAD). Результаты показаны на фиг. 14.

На фиг. 14 показано, что у не подвергнутых лечению мышей имелось значительное количество человеческих бластов в костном мозге и селезенке через 38 дней. Напротив, мыши, подвергнутые лечению путем ежедневных внутривенных инъекций тандемных диател 12 или 16, показали значительно более низкое количество человеческих бластов AML в костном мозге и селезенке. Сильный анти-AML эффект CD33/CD3 тандемного диатела наблюдался при обоих уровнях доз (5 и 50 мкг/инъекцию).

Наблюдаемый анти-AML эффект для обоих CD33/CD3 тандемных диател, 12 и 16, был гораздо сильнее, чем эффект CD123/CD3 DART® антитела, нацеленного на AML в идентичной мышинной модели (Hussaini et al.: "Targeting CD123 In Leukemic Stem Cells Using Dual Affinity Re-Targeting Molecules (DARTs®) November 15, 2013; Blood: 122 (21)). В противоположность CD33/CD3 тандемным диателам, которые элиминировали почти все бласты AML в костном мозге и селезенке, в работе Hussaini et al. указывается, что CD123/CD3 DART® уменьшает число бластов AML в костном мозге и селезенке в модели PDX только в 50-1000 раз при 2,5 и 0,25 мг/кг, и авторы, кроме того, сообщают, что CD123/CD3 DART™ уменьшает число бластов AML в костном мозге и селезенке в модели PDX только на 40-78% при 0,5 мг/кг.

Пример 13.

Быстрое начало лизиса клеток-мишеней, опосредованного CD33/CD3 тандемным диателом 16.

Для оценки кинетики лизиса клеток-мишеней, опосредованного CD33/CD3 тандемным диателом 16, проводили анализы цитотоксичности путем детектирования высвобождения кальцеина при различных значениях времени инкубации. Меченные кальцеином CD33⁺ клетки-мишени HL-60 инкубировали с серийными разведениями тандемного диатела 16 в присутствии первичных человеческих Т-клеток в качестве эффекторных клеток при соотношении Е:Т, равном 25:1, в течение 30 мин, 1, 2, 3, 4 или 5 ч. В каждый момент времени кальцеин, который высвобождался из лизированных клеток-мишеней, использовали для расчета величины EC₅₀ и лизиса клеток-мишеней, опосредованного тандемным диателом 16, с использованием нелинейной регрессии/сигмоидальной кривой доза-ответ. На фиг. 15 показано неожиданно быстрое начало лизиса клеток-мишеней, опосредованного тандемным диателом, с более чем 40% лизисом после 30 мин инкубации при насыщающих концентрациях тандемного диатела. Через 4 ч инкубации был достигнут лизис клеток-мишеней, составляющий более чем 90%. В табл. 15 и на фиг. 16 приведены значения EC₅₀ и специфического лизиса, определенные для тандемного диатела 16 при значениях времени инкубации в интервале от 30 мин до 5 ч. Результаты, кроме того, демонстрируют, что в используемых аналитических условиях максимальная активность (самое низкое значение EC₅₀) достигалась после 2 ч инкубации и что после 5 ч инкубации почти все клетки-мишени были лизированы. Взятые вместе, эти результаты демонстрируют очень быстрый, сильный и эффективный лизис клеток-мишеней, опосредованный CD33/CD3 тандемными диателами.

Таблица 15
Кинетика EC₅₀ и величины лизиса, определенные для тандемного диатела 16

Время инкубации [мин]	EC ₅₀ [пМ]	Лизис, опосредованный тандемным диателом [%]
30	4.8	44.1
60	2.5	59.8
120	1.6	75.1
180	1.6	88.8
240	1.5	93.7
300	1.6	97.4

Пример 14.

Протокол предварительного исследования клинической эффективности введения CD33/CD3 тандемных диател пациентам с AML.

Данное клиническое исследование I/II фазы для изучения CD33/CD3 тандемного диатела 16 в качестве терапии острого миелоидного лейкоза (AML).

Результаты исследования:

Первичные: Максимально переносимая доза CD33/CD3 тандемного диатела 16.

Вторичные: Определения связи ответа *in vitro* CD33/CD3 тандемного диатела 16 с клиническим ответом.

I фаза.

Максимально переносимая доза (MTD) будет определена в I фазе раздела клинического исследования.

1.1. Максимально переносимая доза (MTD) будет определена в I фазе раздела клинического исследования.

1.2. Пациенты, которые удовлетворяют критериям отбора, будут включены в исследование с применением CD33/CD3 тандемного диатела 16.

1.3. Целью является идентификация самой высокой дозы CD33/CD3 тандемного диатела 16, которую можно вводить безопасно без тяжелых или неуправляемых побочных эффектов у участников. Вводимая доза будет зависеть от числа участников, включенных в исследование ранее, и от того, насколько хорошо переносилась доза. Не все участники будут получать одинаковую дозу.

II фаза.

2.1. На следующей II фазе раздела будет проведено лечение при MTD с целью определения, вызывает ли терапия CD33/CD3 тандемным диателом 16 ответ на лечение по меньшей мере у 20% участников.

Первичные конечные точки для II фазы - Определение, вызывает ли терапия CD33/CD3 тандемным диателом 16 клинический ответ по меньшей мере у 20% пациентов (ответ blastов, незначительный ответ, частичный ответ или полный ответ).

Отбор подходящих пациентов.

Подтвержденный AML анализами периферической крови и костного мозга, отвечающий критериям WHO, за исключением пациентов с острым промиелоцитарным лейкозом (APL).

Пациенты, имеющие AML, рефракторные к первичной индукционной химиотерапии, имеющие рецидивирующее заболевание или находящиеся в возрасте ≥ 60 лет и не подходящие для стандартной терапии цитотоксическими препаратами из-за возраста, общего состояния и/или неблагоприятных факторов риска, по мнению лечащего терапевта.

Возраст ≥ 18 лет.

Оценка общего состояния пациента по шкале Карновского $\geq 50\%$ или общее состояние по шкале ECOG 0-2.

Ожидаемая продолжительность жизни ≥ 6 недель.

Хотя в настоящем документе показаны и описаны некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, для специалистов в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления приведены лишь в качестве примера. Специалисты могут осуществить различные модификации, изменения и замены без выхода за рамки настоящего изобретения. Следует понимать, что при осуществлении настоящего изобретения возможно использование различных альтернативных вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. Предполагается, что следующая формула изобретения определяет рамки настоящего изобретения и что она охватывает способы и структуры в рамках указанных пунктов формулы изобретения и их эквиваленты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения острого миелогенного лейкоза (AML) у пациента, перенесшего трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, включающий введение терапевтически эффективного количества гомодимерного тандемного диатела, которое связывается с человеческим CD33 и человеческим CD3, причем гомодимерное тандемное диатело содержит первый полипептид и второй полипептид, при этом каждый полипептид имеет по меньшей мере четыре переменных домена цепи, связанных друг с другом, при этом каждый полипептид содержит:

- (i) переменный домен тяжелой цепи (VH), специфический в отношении человеческого CD33;
- (ii) переменный домен легкой цепи (VL), специфический в отношении человеческого CD33;
- (iii) VH-домен, специфический в отношении человеческого CD3; и
- (iv) VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3,

которые связаны друг с другом пептидными линкерами L1, L2 и L3 в следующем порядке:

VL(CD3)-L1-VH(CD33)-L2-VL(CD33)-L3-VH(CD3);

VH(CD3)-L1-VL(CD33)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD3);

VL(CD33)-L1-VH(CD3)-L2-VL(CD3)-L3-VH(CD33) или

VH(CD33)-L1-VL(CD3)-L2-VH(CD33)-L3-VL(CD33),

причем VL-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21-27; CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 28-34; и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 35-41; и

причем VH-домен, специфический в отношении человеческого CD33, содержит CDR1, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-48; CDR2, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 49-55; и CDR3, имеющий последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 56-63.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что трансплантация является аллогенной.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что трансплантация является аутологичной.
4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что пациент не получает режима кондиционирования.
5. Способ по любому из пп.1-3, дополнительно включающий применение режима кондиционирования у пациента.
6. Способ по п.5, отличающийся тем, что режим кондиционирования является миелоаблативным.
7. Способ по п.5, отличающийся тем, что режим кондиционирования является немиелоаблативным.
8. Способ по любому из пп.5-7, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят после режима кондиционирования.
9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что пациент находится в полной ремиссии.
10. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что пациент имеет минимальное остаточное заболевание.
11. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что применение химиотерапии или облучения оказалось неэффективным у пациента.
12. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что применение индукционной химиотерапии оказалось неэффективным у пациента.
13. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что применение консолидирующей или поддерживающей (постремиссионной) химиотерапии оказалось неэффективным у пациента.
14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AML является рецидивирующим.
15. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AML является рефрактерным.
16. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что AML представляет собой AML высокого риска и находится в ремиссии.
17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят сразу же после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
18. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят через три дня после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
19. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят через семь дней после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
20. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят через две недели после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
21. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят через четыре недели после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.
22. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из четырех недель, восьми недель, трех месяцев, четырех месяцев, шести месяцев, восьми месяцев, десяти месяцев, двенадцати месяцев, восемнадцати месяцев и двадцати четырех месяцев.
23. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят во время прогрессирования AML в аллогенных условиях с донорскими лимфоцитами.
24. Способ по любому из пп.1, 2, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело вводят во время прогрессирования AML в аллогенных условиях без донорских лимфоцитов.
25. Способ по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело содержит домены тяжелой и легкой цепей, специфические в отношении человеческого CD33 и человеческого CD3.
26. Способ по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 VL-домена, специфического в отношении человеческого CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 21, 28 и 35; SEQ ID NO: 22, 29 и 36; SEQ ID NO: 23, 30 и 37; SEQ ID NO: 24, 31 и 38; SEQ ID NO: 25, 32 и 39; SEQ ID NO: 26, 33 и 40 и SEQ ID NO: 27, 34 и 41.
27. Способ по любому из пп.1-26, отличающийся тем, что CDR1, CDR2 и CDR3 VH-домена, специфического в отношении CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42, 49 и 56; SEQ ID NO: 43, 50 и 57; SEQ ID NO: 43, 50 и 58; SEQ ID NO: 43, 50 и 59; SEQ ID NO: 43, 50 и 60; SEQ ID NO: 44, 51 и 61; SEQ ID NO: 45, 52 и 62; SEQ ID NO: 46, 53 и 63; SEQ ID NO: 47, 54 и 63 и SEQ ID NO: 48, 55 и 63.
28. Способ по любому из пп.1-27, отличающийся тем, что VL- и VH-домены, специфические в отношении CD33, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1 и 11; SEQ ID NO: 2 и 12; SEQ ID NO: 3 и 13; SEQ ID NO: 4 и 14; SEQ ID NO: 5 и 15; SEQ ID NO: 6 и 16; SEQ ID NO: 7 и 17; SEQ ID NO: 8 и 18; SEQ ID NO: 9 и 19 и SEQ ID NO: 10 и 20.
29. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что VH-домен, специфический в отношении

человеческого CD3, содержит последовательность CDR1 STYAMN (SEQ ID NO: 72), последовательность CDR2 RIRSKYNNYATYYADSVKD (SEQ ID NO: 73) и последовательность CDR3 HGNFGNSYVSWFAY (SEQ ID NO: 74) или HGNFGNSYVSYFAY (SEQ ID NO: 75).

30. Способ по любому из пп.1-29, отличающийся тем, что VL-домен, специфический в отношении человеческого CD3, содержит последовательность CDR1 RSSTGAVTTSNYAN (SEQ ID NO: 90), последовательность CDR2 GTNKRAP (SEQ ID NO: 91) и последовательность CDR3 ALWAYSNL (SEQ ID NO: 92).

31. Способ по любому из пп.1-30, отличающийся тем, что VL- и VH-домены, специфические в отношении CD3, представляют собой последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 64 и 68; SEQ ID NO: 65 и 69; SEQ ID NO: 66 и 70 и SEQ ID NO: 67 и 71.

32. Способ по любому из пп.1-31, отличающийся тем, что каждый полипептид содержит четыре варибельных домена цепи, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 12, 65 и 69; SEQ ID NO: 3, 13, 65 и 69; SEQ ID NO: 4, 14, 65 и 69; SEQ ID NO: 5, 15, 65 и 69; SEQ ID NO: 1, 11, 64 и 68; SEQ ID NO: 2, 12, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 12, 66 и 70; SEQ ID NO: 4, 14, 66 и 70; SEQ ID NO: 5, 15, 66 и 70; SEQ ID NO: 3, 13, 64 и 68; SEQ ID NO: 3, 13, 67 и 71; SEQ ID NO: 4, 14, 64 и 68; SEQ ID NO: 5, 15, 64 и 68; SEQ ID NO: 7, 17, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 64 и 68; SEQ ID NO: 6, 16, 67 и 71; SEQ ID NO: 8, 18, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 64 и 68; SEQ ID NO: 9, 19, 67 и 71 и SEQ ID NO: 10, 20, 64 и 68.

33. Способ по любому из пп.1-32, отличающийся тем, что линкеры L1, L2 и L3 состоят из около 12 или менее аминокислотных остатков.

34. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что линкеры L1, L2 и L3, каждый, независимо выбраны из GGS GGS (SEQ ID NO: 95), GGS G (SEQ ID NO: 96) или GGS GG (SEQ ID NO: 97).

35. Способ по любому из пп.1-34, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 98-121.

36. Способ по любому из пп.1-35, отличающийся тем, что гомодимерное тандемное диатело представляет собой SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120 или SEQ ID NO: 121.

37. Способ по любому из пп.1-36, отличающийся тем, что каждый из первого полипептида и второго полипептида содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 123-146.

38. Способ по любому из пп.1-34 или 37, отличающийся тем, что каждый из первого полипептида и второго полипептида состоит из SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145 или SEQ ID NO: 146.

39. Способ по п.38, отличающийся тем, что каждый из первого полипептида и второго полипептида состоит из SEQ ID NO: 134.

40. Способ по п.38, отличающийся тем, что каждый из первого полипептида и второго полипептида состоит из SEQ ID NO: 136.

41. Способ по п.38, отличающийся тем, что каждый из первого полипептида и второго полипептида состоит из SEQ ID NO: 138.

42. Способ по любому из пп.1-41, отличающийся тем, что способ дополнительно включает введение цитарабина, азациитидина, децитабина, антрациклина, флударабина, клофарабина, кладрибина, неларабина, метотрексата, бортезомиба, карфилзомиба, мелфалана, ибрутиниба, талидомида, леналидомида, помалидомида, апремиласта, эпитопофиллотоксина, антрацендиона, ритуксимаба, окрелизумаба, офатумумаба или их комбинаций.

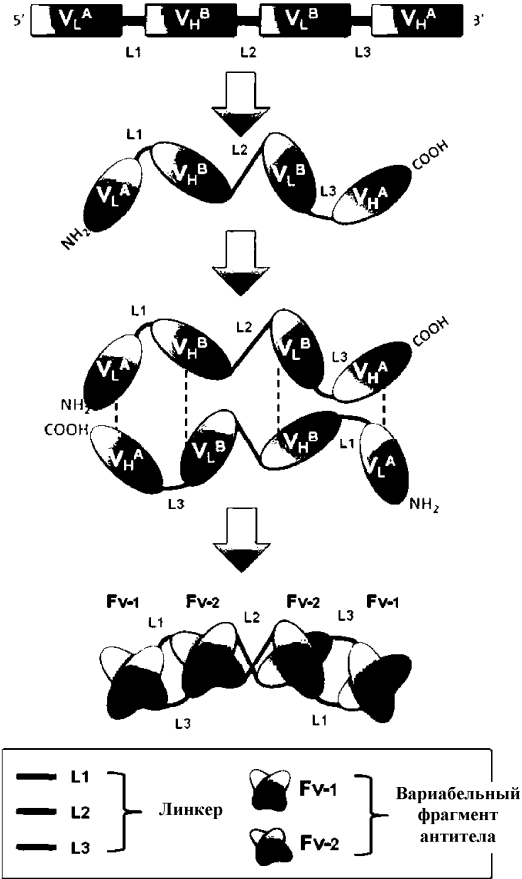
43. Способ по любому из пп.1-42, отличающийся тем, что AML представляет собой AML с устойчиво выявляемыми генетическими аномалиями, AML с изменениями, связанными с миелодисплазией, миелоидные неоплазии, связанные с предшествующей терапией, миелоидную саркому, миелоидные опухоли, связанные с синдромом Дауна, опухоль из бластных плазмацитоидных дендритных клеток или AML, не отнесенные к какой-либо категории.

44. Способ по любому из пп.1-43, отличающийся тем, что AML представляет собой AML-M0, AML-M1, AML-M2, AML-M3, AML-M4, AML-M5, AML-M6 или AML-M7.

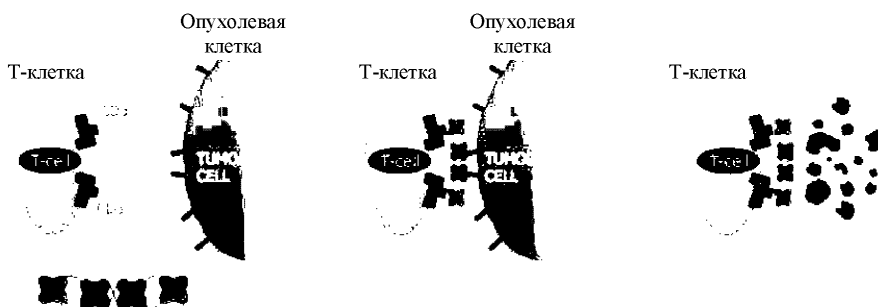
45. Способ по любому из пп.1-44, отличающийся тем, что введение гомодимерного тандемного диатела у пациента, перенесшего аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток после применения миелоаблативного режима кондиционирования, приводит к улучшенной общей частоте ответа на терапию гомодимерным тандемным диателом относительно частоты общего ответа на терапию у субъекта, который получал гомодимерное тандемное диатело, но не трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

46. Способ по любому из пп.1-45, отличающийся тем, что введение гомодимерного тандемного ди-

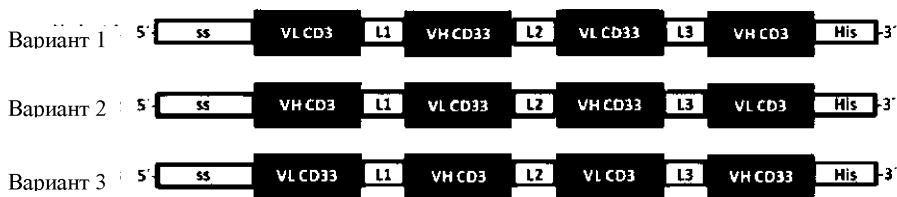
атела у пациента, перенесшего аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток после применения немиелоаблативного режима кондиционирования, приводит к улучшенной общей частоте ответа на терапию гомодимерным тандемным диателом относительно частоты общего ответа на терапию у субъекта, который получал гомодимерное тандемное диатело, но не трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.



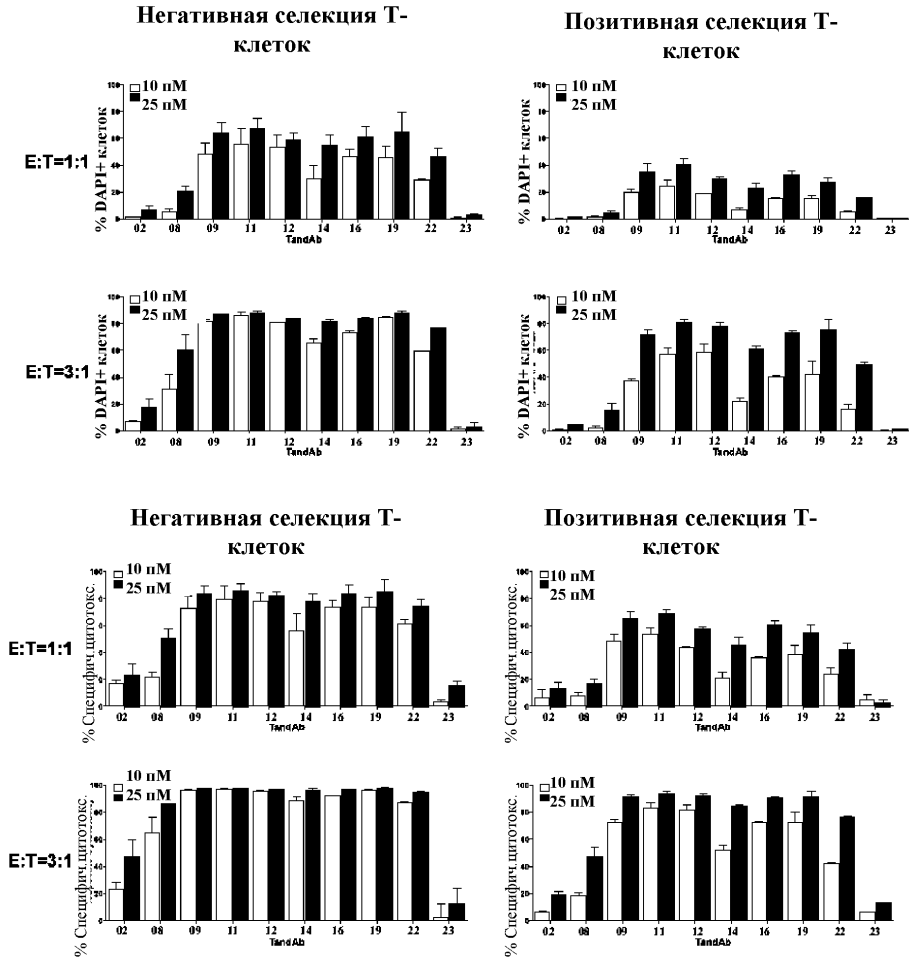
Фиг. 1



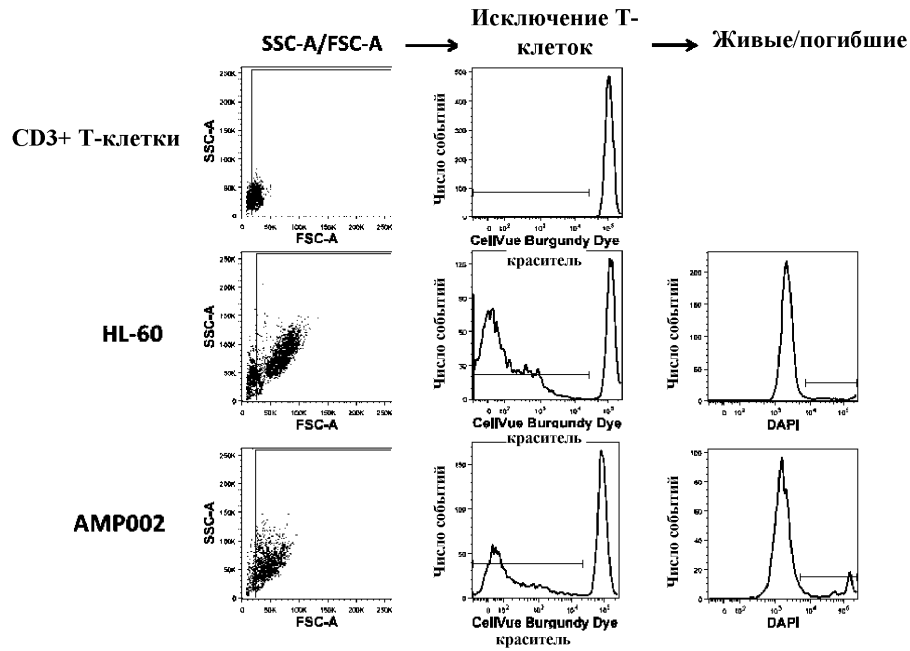
Фиг. 2



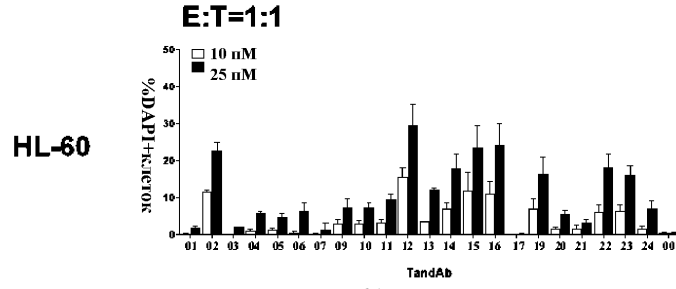
Фиг. 3



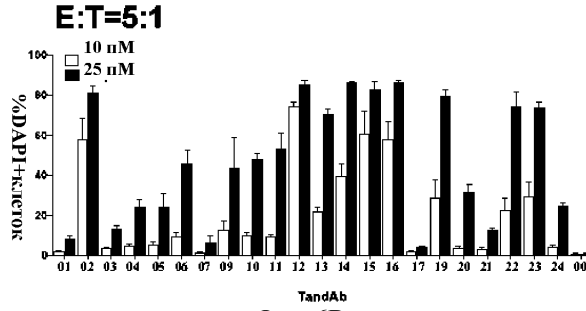
Фиг. 4



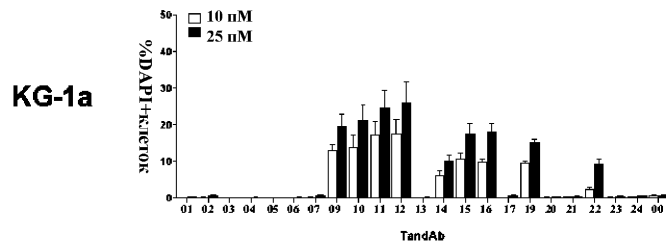
Фиг. 5



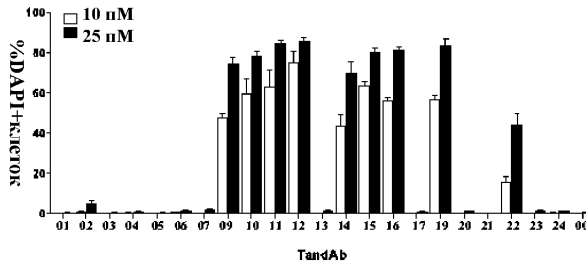
Фиг. 6А



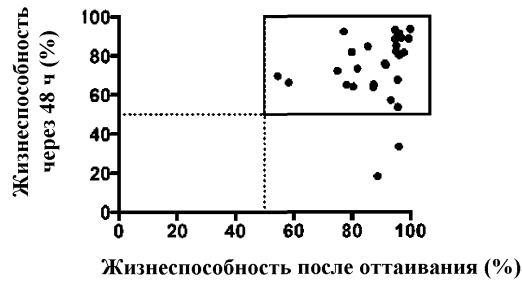
Фиг. 6В



Фиг. 6С

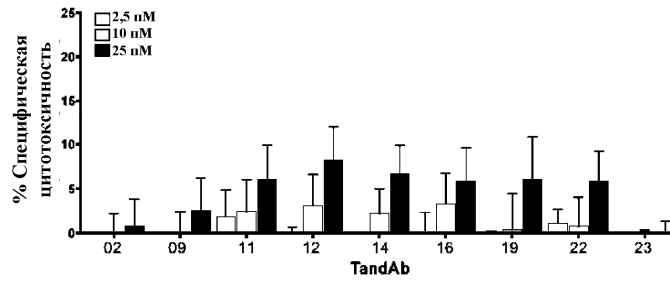


Фиг. 6D



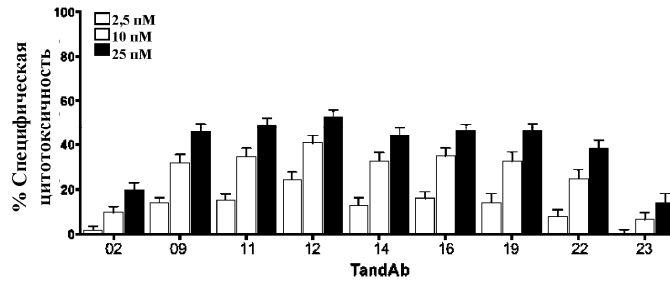
Фиг. 7

Без добавления Т-клеток здоровых доноров



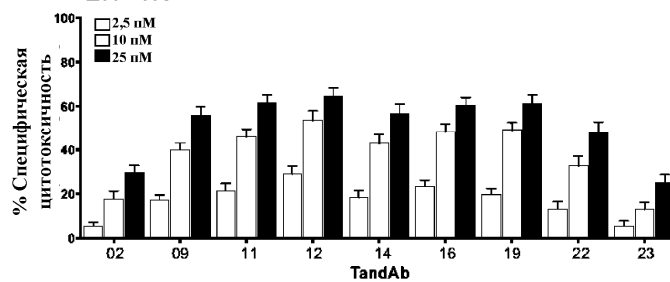
Фиг. 8А

E:T=1:3



Фиг. 8В

E:T=1:1



Фиг. 8С

```

DPNFWLQVQE SVTVQEGLCV LVPCTFFHPI PYYDKNSPVH GYWFREGAII SRDSPVATNK      60
LDQEVQEEIQ GRERLLGDPS RNNCSLSIVD ARRRDNGSYF FRMERGSTKY SYKSPQLSVH      120
VTDLTHRPKI LIPGTLEPGH SKNLTCVSW ACEQGTPIIF SWLSAAPTSL GPRTHSSVL      180
IITPRPQDHG TNLTCQVKFA GAGVTTERTI QLNVTYVPQN PTTGIFPGDG SGRQETRAGV      240
VH                                                                                   242
    
```

SEQ ID NO:93

Фиг. 9

```

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMCWMNPNSGNTGFAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDFAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQLPGTAPKLLIYGNNQRPSCVDPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGSEVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNGFNYSVSWFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH
    
```

SEQ ID NO:98

Фиг. 10А

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDEFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRAVTDYVYGMVWVGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:99

Фиг. 10B

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDEFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWVGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:100

Фиг. 10C

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDEFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWVGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:101

Фиг. 10D

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDEFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWVGQGLVTVSSGG
SGGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAP
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:102

Фиг. 10E

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDEFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWVGQGLVTVSSGG
SGGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAP
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:103

Фиг. 10F

044237

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSACAASGFSTSYGIHVVWRQAPGKG
LEWVALISYDGNKFFYADSVKGRFATSRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAKDRLESAAFDYWGQGTTLTVSSGGSGG
SSYELTQPPSVSVAPGQTAMITCGGNIGSTTVHWYQKPKQAPVLVYDDNERPSGIPERFSGSNSGSTATLTINRVEA
GDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTTSTYAMNWRQAPGKGL
EWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTLTVSS
AAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:104

Фиг. 10G

QSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQ
SEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTTSTYAMNWRQAPGKG
LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGTTLTVSS
GGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDK
ATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWV
RQAPGQGLEWVGWMPNSGNTGFAQKFKQGRVTMTRDTSSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGTTL
VTVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:105

Фиг. 10H

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKQGRVTMTRDTSSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:106

Фиг. 10I

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKQGRVTMTRDTSSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:107

Фиг. 10J

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFRSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKQGRVTMTRDTSSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGTTLTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRTVITCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSACAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:108

Фиг. 10K

044237

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNNGTGFQKQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRAVTDYVYGMVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:109

Фиг. 10L

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNNGTGFQKQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRAVTDYVYGMVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:110

Фиг. 10M

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNNGTGFQKQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSYGMVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:111

Фиг. 10N

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNNGTGFQKQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSYGMVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:112

Фиг. 10O

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGWMNPNNGTGFQKQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSYGMVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:113

Фиг. 10P

044237

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG
LEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHKGSDAFDIWGQGTTVTVSSGGSEQ
SVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCTGSSSNI GAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ
AEDEADYYCQSYDSSSLSDVVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKG
LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWQGTTLVTS
SAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:114

Фиг. 10Q

EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNS
LYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWQGTTLVTVSSGGSGGSQSVLTQPPSVSGAPGQQRVTISCTGSSSNI
GAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSSLSDVVFGGGTKLTVL
VLGGSEQVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKLEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGGVTTISADK
SISTAYLQWSSLKASDTAMYCARHKGSDAFDIWGQGTTVTVSSGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGA
VTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEI
KAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:115

Фиг. 10R

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQG
LEWMGI INPSSGGS SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARDVVPAAIDYGM DVWGQGTTVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNI GSNVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSTYAMNWRQAP
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWQGTTLV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:116

Фиг. 10S

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDTFLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQG
LEWMGI INPSSGGS SYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCARDVVPAAIDYGM DVWGQGTTVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNI GSNVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSTYAMNWRQAP
GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWQGTTLV
TVSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:117

Фиг. 10T

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGTFSSYAI SWVRQAPGQG
LEWMGGIYPIFGSANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGTTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQQRVTISCSGSSSNI GSNVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLKGYVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWQGTTLV
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:118

Фиг. 10U

044237

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG
LEWMGGIIPIFGSAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGTTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAWGQGTTLVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:119

Фиг. 10V

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG
LEWMGGIIPIFGSAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGTTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAWGQGTTLVT
VSS

SEQ ID NO:120

Фиг. 10W

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFDSYAISWVRQAPGQG
LEWMGGIIPIFGSAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGTTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNVNWYQQLPGTAPKLLIYSTNKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
LQSEDEADYYCAAWDDSLAYVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAWGQGTTLVT
VSSAAAGSHHHHHH

SEQ ID NO:121

Фиг. 10X

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSCTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGMNPNNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGTTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAWGQGTTLVT
VSS

SEQ ID NO:123

Фиг. 11A

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSCTDFTLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
LEWMGMNPNNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSEDTAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGTTLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSFYAWGQGTTLVT
VSS

SEQ ID NO:124

Фиг. 11B

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:125

Фиг. 11C

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:126

Фиг. 11D

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAP
 GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLV
 TVSS

SEQ ID NO:127

Фиг. 11E

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPARFSGSGSGTDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKQGRVTMTRDTSTSTVYMELSLRSSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS
 GLQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAP
 GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLV
 TVSS

SEQ ID NO:128

Фиг. 11F

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKEIKGGSGGSQVQLQESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSSNYGIHWVRQAPGKG
 LEWVALISYDGNKIFYADSVKGRFAISRDTSKNTVDLQMTSLRPEDTAVYYCAKDRLESAAFDYWGQGLVTVSSGGSGG
SSYELTQPPSVSVAPGQTAMITCGGNNIGSTTVHWYQKPGQAPVLVYDDNERPSGIPERFSGSNSGSTATLTINRVEA
 GDEADYYCQVWDSGSDHVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMNWRQAPGKGL
 EWWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTVSS

SEQ ID NO:129

Фиг. 11G

QSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQ
SEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPGKG
LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTVS
GGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSPRFSGLIGDK
ATLTISSLPEDFATYYCALWYSNLWVFGGQTKVEIKGGSGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWV
RQAPGQGLEWVGWMPNSGNTGFAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFS YGMDVWGQGL
VTVSS

SEQ ID NO:130

Фиг. 11H

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSPRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGGQTKVEIKGGSGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDFS YGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSS

SEQ ID NO:131

Фиг. 11I

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSPRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGGQTKVEIKGGSGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSS

SEQ ID NO:132

Фиг. 11J

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSPRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGGQTKVEIKGGSGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLTVT
VSS

SEQ ID NO:133

Фиг. 11K

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSPRFSGLIGDKATLTISS
LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGGQTKVEIKGGSGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTSYDINWVRQAPGQ
LEWVGWMPNSGNTGFAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDRAVTDY YGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSRNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGGTKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTSTYAMNWRQAPG
KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLTVT
VSS

SEQ ID NO:134

Фиг. 11L

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRAVTDYYYGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:135

Фиг. 11М

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDFSYGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:136

Фиг. 11N

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:137

Фиг. 11O

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTSYDINWVRQAPGQG
 LEWMGWMNPNSGNTGFAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARDRANTDYSFGMDVWGQGLVTVSSGG
SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSRSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCATWDDSLIGWVFGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:138

Фиг. 11P

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGESLKIACKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG
 LEWMGI IYPGDS DTRYSPSFQGVTTISADKSI STAYLQWSSSLKASDTAMYCARHHRGSDAFDIWGQGLVTVSSGGSG
 SVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQ
 AEDEADYYCQSYDSSLSDVVFVGGGKTLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPGKG
 LEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTVS
 S

SEQ ID NO:139

Фиг. 11Q

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNS
 LYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTVSSGGSGGSQSVLTQPPSVSGAPGQRVITISCTGSSSNI
 GAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDDEADYYCQSYDSSLSDVVFVGGGKLT
 VLGGSGQVQLVQSGAEVKKPQESLKIACKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWVGMGIYPGSDTRYSPSFQGGVITISADK
 SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHGRGSDAFDIWGQGTITVTVSSGGSGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGA
 VTTSNYANWVQKPKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISSLQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEI
 K

SEQ ID NO:140

Фиг. 11R

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQG
 LEWVGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDVVPAAIDYYGMDVWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
 GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAP
 GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLV
 TVSS

SEQ ID NO:141

Фиг. 11S

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDFTLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQG
 LEWVGMGIINPSGGSTSYAQKFGQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCARDVVPAAIDYYGMDVWGQGTITVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAIS
 GLQSDDEADYYCATWDDSLNGAVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAP
 GKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLV
 TVSS

SEQ ID NO:142

Фиг. 11T

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQG
 LEWVGMGIIPIFGSANYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMESSLRSEDVAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGLVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDDSLKGYVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLV
 VSS

SEQ ID NO:143

Фиг. 11U

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSTGAVTTSNYANWVQKPKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGLIGDKATLTISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYGISWVRQAPGQG
 LEWVGMGIIPIFGSAHYAQKFGQGRVTITADESTSTAYMESSLRSEDVAVYYCAREYYYDSSEWAFDIWGQGLVTVSSGG
GGQSVLTQPPSASGTPGQRVITISCSGSSSNI GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRSSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDDSLNGYVFGGKLTVLGGSGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLV
 VSS

SEQ ID NO:144

Фиг. 11V

DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKGLIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGTDFLTITISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYGISWVRQAPGQG
 LEWMGGIIPIFGSAHYAQKFQGRVTTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYDSSEWAFDIWGQGLVTVSSGG
 SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVTKWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRSSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDSSLNGYVFGGKTLTVLGGSGGSSEVQLVVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYWGQGLVTV
 VSS

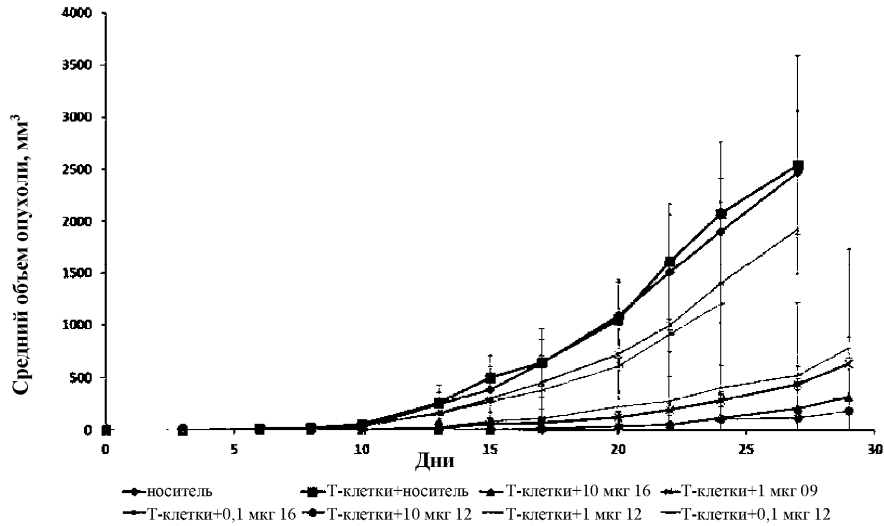
SEQ ID NO:145

Фиг. 11W

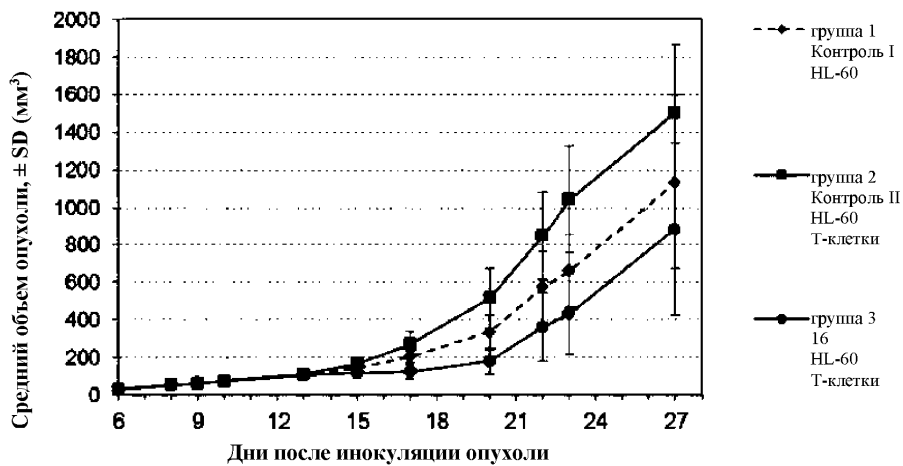
DIQMTQSPSSLSASVGRVTTICRSSTGAVTTSNYANWVQKPKGKAPKALIGGTNKRAPGVPSRFSGSLIGDKATLTITISS
 LQPEDFATYYCALWYSNLWVFGQGTKVEIKGGSGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFDSYAISWVRQAPGQG
 LEWMGGIIPIFGSAHYQKFQGRVTTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREYYDSSEWAFDIWGQGLVTVSSGG
 SGQSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGDNVWNWYQQLPGTAPKLLIYSTNKRPSGVPDRFSGSKSGSSASLAISG
 LQSEDEADYYCAAWDSSLNAYVFGGKTLTVLGGSGGSSEVQLVVEGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWRQAPG
 KGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSYFAYWGQGLVTV
 VSS

SEQ ID NO:146

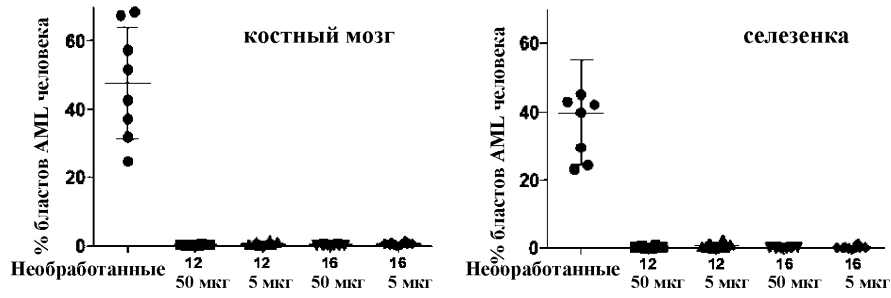
Фиг. 11X



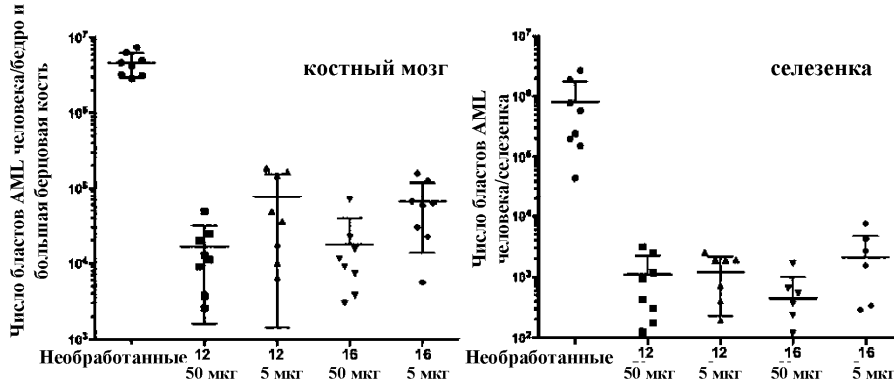
Фиг. 12



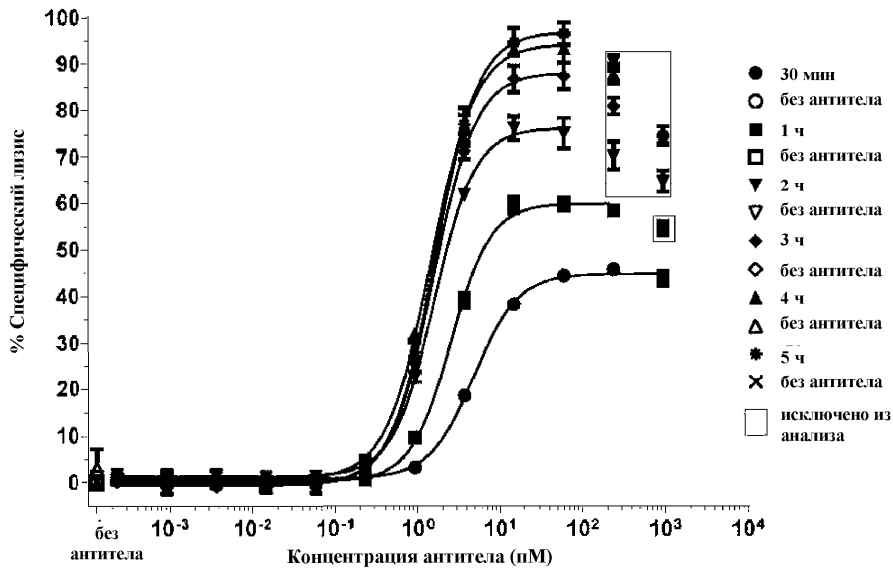
Фиг. 13



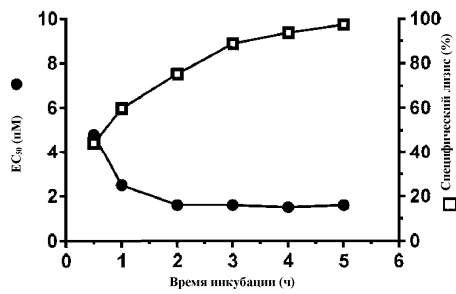
Фиг. 14А



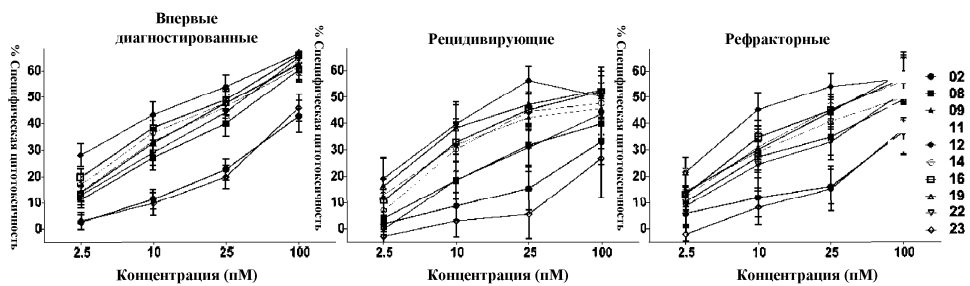
Фиг. 14В



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17

