

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202293055 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.02.13

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

(22) Дата подачи заявки  
2021.04.23

(54) АНТИТЕЛА К CD19 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 63/015,385

(72) Изобретатель:

(32) 2020.04.24

Таварес Даниэль, Принц Бьянка,  
Гейган Джеймс (US)

(33) US

(86) PCT/US2021/028880

(74) Представитель:

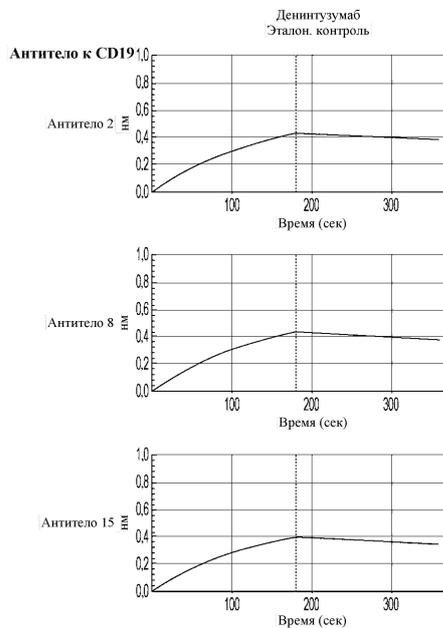
(87) WO 2021/217024 2021.10.28

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

МИЛЛЕНИУМ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛС, ИНК. (US)

(57) В изобретении описаны антитела, их фрагменты и слитые белки, которые специфически связываются с CD19, а также способы получения и применения таких антител. Такие антитела, слитые белки и их фрагменты применимы для лечения и диагностики различных В-клеточных расстройств, включая В-клеточные злокачественные новообразования и аутоиммунные заболевания.



A1

202293055

202293055

A1

## **АНТИТЕЛА К CD19 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

### **ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

[0001] Эта заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США с серийным № 60/015 385, поданной 24 апреля 2020 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

### **ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ**

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Упомянутая копия ASCII, созданная 30 марта 2021 года, называется MIL-004WO\_SL .txt и имеет размер 38 765 байт.

### **УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

[0003] Антиген CD19 представляет собой белок клеточной поверхности, обнаруженный на В-клетках. CD19 экспрессируется как на нормальных В-клетках, так и на злокачественных В-клетках, аномальный рост которых может привести к В-клеточным лимфомам. Например, CD19 экспрессируется на злокачественных новообразованиях В-клеточного происхождения, включая неходжкинскую лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз и острый лимфобластный лейкоз, но не ограничиваясь ими. В данной области техники существует потребность в разработке антител к CD19.

### **КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0004] Для решения многих проблем, связанных с В-клеточными расстройствами и их лечением, в настоящем изобретении предложены антитела человека к CD19 и их фрагменты для лечения В-клеточных лимфом и лейкозов, и аутоиммунных заболеваний. Антитела и их фрагменты по настоящему изобретению можно использовать по отдельности, в виде слитых белков или конъюгировать по меньшей мере с одним диагностическим и/или терапевтическим агентом, или в комбинации с другими способами лечения. Связывание CD19 человека с антителами к CD19 или их фрагментами, описанными в настоящем документе, может демонстрировать АЦКЗ-активность, индукцию апоптоза и ингибирование пролиферации В-клеток.

[0005] В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу или его фрагменту, которое специфически связывается с CD19. В одном аспекте настоящее

изобретение относится к антителу к CD19 или его фрагменту, содержащему последовательности определяющей комплементарность области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3).

**[0006]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

**[0007]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).

**[0008]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

**[0009]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).

**[0010]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

**[0011]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPFT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).

**[0012]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).

**[0013]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит переменную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).

**[0014]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 20; и переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5.

**[0015]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу к CD19 или его фрагменту, содержащему переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 20-27; и переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5.

**[0016]** В некоторых вариантах осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 20-27.

**[0017]** В некоторых вариантах осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 20-27.

**[0018]** В некоторых вариантах осуществления область VH содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5.

**[0019]** В некоторых вариантах осуществления область VH содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 5.

**[0020]** В некоторых вариантах осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 20-27, а область VH идентична SEQ ID NO: 5.

**[0021]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fd'-фрагмента, Fd-фрагмента, изолированных CDR или их наборов; одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), слитого полипептид-Fc, однодоменного

антитела, антитела верблюдовых; маскированного антитела, малое модульное иммунофармацевтическое средство («SMIPs™»), одноцепочечного антитела, тандемного диатела, VHH, антикалина, нанотела, минител, ViTE, белка с анкириновыми повторами, DARPIN, авимера, DART, ТКР-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела; аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирина и KALBITOR.

**[0022]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

**[0023]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой антитело, содержащее константную область IgG.

**[0024]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv).

**[0025]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит линкерную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36-39.

**[0026]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит сигнальный пептид, выбранный из SEQ ID NO: 40-42.

**[0027]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связывается с CD19 с KD от около 8 наномоль (нМ) до около 242 нМ.

**[0028]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент связывается с CD19 на клетках-мишенях с EC50 от около 0,1 нМ до около 2,7 нМ.

**[0029]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение антитела к CD19 или его фрагмента по любому из предшествующих пунктов субъекту, нуждающемуся в лечении.

**[0030]** В некоторых вариантах осуществления рак выбран из лейкоза, лимфомы или миеломы.

**[0031]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD19 или его фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, при этом антитело к CD19 или его фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3).

**[0032]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент

дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

**[0033]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).

**[0034]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

**[0035]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).

**[0036]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

**[0037]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).

**[0038]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPPT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).

**[0039]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).

**[0040]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен способ лечения рака,

включающий введение антитела к CD19 или его фрагмента субъекту, нуждающемуся в лечении, при этом антитело к CD19 или его фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3).

**[0041]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

**[0042]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).

**[0043]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

**[0044]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPTYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).

**[0045]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

**[0046]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей

комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPFT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).

**[0047]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат переменную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).

**[0048]** В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака включает введение антитела к CD19 или его фрагмента, которые дополнительно содержат переменную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).

**[0049]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5.

**[0050]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO:20-27.

**[0051]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложен вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5, и/или кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:20-27.

**[0052]** В одном аспекте в настоящем изобретении предложена выделенная клетка, содержащая вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5 и/или кодирующей аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную любой из SEQ ID NO: 20-27.

## **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

**[0053]** В контексте данного документа форма единственного числа объекта включает соответствующую форму множественного числа (*т.е.* по меньшей мере одного)

объекта. В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

**[0054]** *Аффинность*: Используемый в данном документе термин «аффинность» относится к характеристикам связывающего взаимодействия между связывающим фрагментом (например, антигенсвязывающим фрагментом (например, варибельным доменом, описанным в настоящем документе) и/или фрагментом, связывающим Fc-рецептор (например, FcRn-связывающим фрагментом, описанным в настоящем документе)) и мишенью (например, антигеном (например, CD19) и/или FcR (например, FcRn)) и указывает на силу связывающего взаимодействия. В некоторых вариантах осуществления показатель аффинности выражен в виде константы диссоциации ( $K_D$ ). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент обладает высокой аффинностью к мишени (например,  $K_D$  составляет менее около  $10^{-7}$  М, менее около  $10^{-8}$  М или менее около  $10^{-9}$  М). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент обладает низкой аффинностью к мишени (например,  $K_D$  составляет более около  $10^{-7}$  М, более около  $10^{-6}$  М, более около  $10^{-5}$  М или более около  $10^{-4}$  М). В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент обладает высокой аффинностью к мишени при первом значении pH, имеет низкую аффинность к мишени при втором значении pH и имеет промежуточную аффинность к мишени при уровне pH между первым и вторым значениями pH.

**[0055]** *Приблизительно или около*: В контексте данного документа термин «приблизительно» или «около» применительно к одному или большему количеству значений, представляющим интерес, относится к значению, которое аналогично установленному эталонному значению. В некоторых вариантах осуществления термин «приблизительно» или «около» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любую сторону (больше или меньше) от установленного эталонного значения, если не указано иное или иное не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышало бы 100 % от возможного значения).

**[0056]** *Антитело*: Используемый в данном документе термин «антитело» относится к полипептиду, который включает по меньшей мере одну варибельную область иммуноглобулина, например, аминокислотную последовательность, которая обеспечивает варибельный домен иммуноглобулина, или последовательность варибельного домена иммуноглобулина. Например, антитело может включать варибельную область тяжелой (H) цепи (обозначаемую в данном документе VH) и варибельную область легкой (L) цепи (обозначаемую в данном документе VL). В другом примере антитело включает две варибельные области тяжелой (H) цепи и две варибельные области легкой (L) цепи.

Термин «антитело» охватывает антигенсвязывающие фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv и dAb), а также полные антитела, например, интактные иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы). Легкие цепи иммуноглобулина могут относиться к типам каппа или лямбда.

**[0057]** *Связывающий фрагмент*: Используемый в данном документе «связывающий фрагмент» представляет собой любую молекулу или часть молекулы, способную специфически связывать мишень, например, представляющую интерес мишень (например, антиген (например, CD19) и/или FcR (например, FcRn)). Связывающие фрагменты включают, например, антитела, их антигенсвязывающие фрагменты, Fc-области или их Fc-фрагменты, миметики антител, пептиды и аптамеры.

**[0058]** *Антигенсвязывающий фрагмент* или *его антигенный фрагмент* относится к части интактного антитела. Антигенсвязывающий фрагмент или его фрагмент антитела относится к части интактного антитела, которая связывается с антигеном (например, CD19). Антигенсвязывающий фрагмент может содержать определяющие антигенность переменные области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, линейные антитела, миметики антител, scFv и одноцепочечные антитела, но не ограничиваются ими.

**[0059]** *Определяющая комплементарность область (CDR)*: «CDR» переменного домена представляют собой аминокислотные остатки в пределах переменной области, которые идентифицируют в соответствии с определениями по Kabat, Chothia, аккумуляцией Kabat и Chothia, AbM, контактными и/или конформационными определениями или любым способом определения CDR, хорошо известным в данной области техники. CDR антитела могут быть идентифицированы как гиперпеременные области, первоначально определенные по Kabat et al. См., например, Kabat et al., 1992, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington D.C. Положения CDR также могут быть идентифицированы как петлевые структуры, первоначально описанные Chothia и другими. См., например, Chothia et al., Nature 342:877-883, 1989. Другие подходы к идентификации CDR включают «определение AbM», которое представляет собой компромисс между Kabat и Chothia и получено с использованием программного обеспечения для моделирования антител Oxford Molecular AbM (теперь Accelrys®), или «определение контакта» CDR на основе наблюдаемых контактов антигена, изложенное в MacCallum et al., J. Mol. Biol., 262:732-745, 1996. В другом подходе, называемом в данном документе «конформационным определением» CDR, положения CDR могут быть идентифицированы как остатки, которые вносят энтальпийные вклады в связывание

антигена. См., например, Makabe et al., Journal of Biological Chemistry, 283: 1156-1166, 2008. Другие определения границ CDR могут не строго следовать одному из вышеперечисленных подходов, но, тем не менее, будут перекрываться по меньшей мере с частью CDR по Kabat, хотя они могут быть укорочены или удлинены в свете предположений или экспериментальных данных о том, что определенные остатки или группы остатков, или даже целые CDR не оказывают существенного влияния на связывание антигена. Используемый в данном документе CDR может относиться к CDR, определенным любым известным в данной области подходом, включая комбинации подходов. В способах, используемых в настоящем документе, могут использоваться CDR, определенные в соответствии с любым из этих подходов. Для любого данного варианта осуществления, содержащего более одной CDR, CDR могут быть определены в соответствии с любым из определений по Kabat, Chothia, расширенных, AbM, контактных и/или конформационных определений.

**[0060]** *Константная область:* Используемый в данном документе термин «константная область» относится к полипептиду, который соответствует или получен из одного или нескольких иммуноглобулиновых доменов константной области антитела. Константная область может включать любой или все из следующих доменов иммуноглобулина: домен CH1, шарнирная область, домен CH2, домен CH3 (полученный из IgA, IgD, IgG, IgE или IgM) и домен CH4 (полученный из IgE или IgM).

**[0061]** *Эпитоп:* Используемый в данном документе термин «эпитоп» представляет собой термин в данной области техники и относится к локализованной области антигена, с которой может специфически связываться антитело. Эпитоп может представлять собой, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитоп может, например, представлять собой объединенные две или более несмежные области полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). В некоторых вариантах осуществления эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить, например, с помощью ЯМР-спектроскопии, исследований дифракционной рентгеновской кристаллографии, анализов методом ИФА, анализов обмена водорода/дейтерия в сочетании с масс-спектрометрией (например, жидкостной хроматографией с масс-спектрометрией с электрораспылением), анализов сканирования массива олигопептидов и/или картирования мутагенеза (например, картирование сайт-направленного мутагенеза). Для рентгеновской кристаллографии кристаллизация может быть выполнена с использованием любого из известных в данной области способов (например, Giege R et al, (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50(Pt 4)

: 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5 : 1269-1274; McPherson A ( 1976) J Biol Chem 251 : 6300-6303). Антитело: кристаллы антигена можно изучать с использованием хорошо известных методов дифракции рентгеновских лучей и можно уточнять с помощью компьютерного программного обеспечения, известного в данной области, например, Refmac и Phenix. Исследования картирования мутагенеза могут быть выполнены с использованием любого метода, известного специалистам в данной области техники. См., например, Champe M et al, (1995) J Biol Chem 270: 1388-1394 and Cunningham BC & Wells JA (1989) Science 244: 1081-1085 для описания методов исследования мутагенеза, включая методы исследования аланин-сканирующим мутагенезом.

**[0062]** *Fc-область*: Используемый в данном документе термин «Fc-область» относится к димеру двух «Fc-полипептидов», каждый из которых «Fc-полипептид» содержит константную область антитела, за исключением первого иммуноглобулинового домена константной области. В некоторых вариантах осуществления «Fc-область» включает два Fc-полипептида, связанных одной или несколькими дисульфидными связями, химическими линкерами или пептидными линкерами. «Fc-полипептид» относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и к трем последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, и может также включать часть или весь N-конец гибкого шарнира по отношению к этим доменам. Для IgG «Fc-полипептид» включает иммуноглобулиновые домены Сгамма2 (C $\gamma$ 2) и Сгамма3 (C $\gamma$ 3) и нижнюю часть шарнира между Сгамма1 (C $\gamma$ 1) и C $\gamma$ 2. Хотя границы Fc-полипептида могут варьироваться, Fc-полипептид тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как содержащий остатки, начинающиеся с T223, или C226, или P230, до его карбокси-конца, где нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Services, Springfield, VA). Для IgA Fc-полипептид включает иммуноглобулиновые домены Сальфа2 (C $\alpha$ 2) и Сальфа3 (C $\alpha$ 3) и нижнюю часть шарнира между Сальфа1 (C $\alpha$ 1) и C $\alpha$ 2. Fc-область может быть синтетической, рекомбинантной или полученной из природных источников, таких как IVIG.

**[0063]** *K<sub>a</sub>*: Используемый в данном документе термин «K<sub>a</sub>» относится к скорости ассоциации конкретного связывающего фрагмента и мишени с образованием комплекса связывающий фрагмент/мишень.

**[0064]** *K<sub>d</sub>*: Используемый в данном документе термин «K<sub>d</sub>» относится к скорости диссоциации конкретного комплекса связывающий фрагмент//мишень.

**[0065]** *K<sub>D</sub>*: Используемый в данном документе термин «K<sub>D</sub>» относится к константе

диссоциации, которую получают из отношения  $K_d$  к  $K_a$  (т.е.  $K_d/K_a$ ) и выражают в виде молярной концентрации (M). Значения  $K_D$  можно определить с использованием методов, хорошо зарекомендовавших себя в данной области техники, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса или с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

**[0066]** *Эталон:* «Эталонный» объект, система, количество, набор условий и т. д. представляет собой объект, с которым сравнивается тестовый объект, систему, количество, набор условий и т. д., как описано в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления «эталонное» антитело представляет собой контрольное антитело, которое не было сконструировано, как описано в настоящем документе.

**[0067]** *Избирательное связывание:* Используемые в данном документе термины «избирательное связывание», «избирательно связывает», «специфическое связывание» или «специфически связывает» в отношении связывающего фрагмента и мишени относятся к предпочтительной ассоциации связывающего фрагмента с мишенью, а не с объектом, который не является мишенью. Определенная степень неспецифического связывания может иметь место между связывающим фрагментом и не-мишенью. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент селективно связывается с мишенью, если связывание между связывающим фрагментом и мишенью более чем в 2 раза, более чем в 5 раз, более чем в 10 раз или более чем в 100 раз превышает связывание связывающего фрагмента и не-мишени. В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент селективно связывается с мишенью, если аффинность связывания составляет менее около  $10^{-5}$  M, менее около  $10^{-6}$  M, менее около  $10^{-7}$  M, менее около  $10^{-8}$  M или менее около  $10^{-9}$  M. В некоторых вариантах осуществления молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью иммунологических анализов, прибора BIACORE®, KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID) или других анализов, известных в области техники.

**[0068]** *Одноцепочечный переменный фрагмент (scFv):* Используемый в данном документе термин «одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку переменных областей тяжелой ( $V_H$ ) и легкой ( $V_L$ ) цепей иммуноглобулина (например, мышинового или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера  $V_H::V_L$ . Тяжелая ( $V_H$ ) и легкая цепи ( $V_L$ ) либо соединены напрямую, либо соединены кодирующим пептид линкером (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец  $V_H$  с C-концом  $V_L$  или C-конец  $V_H$  с N-концом  $V_L$ . Линкер обычно

обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

**[0069]** *Субъект:* Термин «субъект», используемый в данном документе, означает любого субъекта, для которого желательны диагноз, прогноз или терапия. Например, субъект может быть млекопитающим, *например*, человеком или приматом, отличным от человека (таким как человекообразная обезьяна, мартышка, орангутанг или шимпанзе), собакой, кошкой, морской свинкой, кроликом, крысой, мышью, лошадью, крупным рогатым скотом или коровой.

**[0070]** *Мишень:* Используемый в данном документе термин «мишень» представляет собой любую молекулу, специфически связанную связывающим фрагментом антитела или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления мишенью является антиген, описанный в настоящем документе (например, CD19). В некоторых вариантах осуществления мишенью является FcR (например, FcRn). Термины «первая мишень» и «вторая мишень» используются в данном документе для обозначения молекул двух разных молекулярных видов, а не двух молекул одного и того же молекулярного вида. Например, в некоторых вариантах осуществления первая мишень представляет собой белок сыворотки, а вторая мишень представляет собой FcRn.

**[0071]** *Терапевтически эффективное количество:* Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтической молекулы (например, антитела к CD19, описанного в настоящем документе), которая оказывает терапевтическое действие на субъекта, подвергающегося лечению, с разумным соотношением польза/риск, применимым к любому медикаментозному лечению. Терапевтический эффект может быть объективным (т. е. измеряемым каким-либо тестом или маркером) или субъективным (т. е. субъект указывает на эффект или ощущает его). В частности, «терапевтически эффективное количество» относится к количеству терапевтической молекулы или композиции, эффективной для лечения, облегчения или предотвращения конкретного заболевания или состояния или для проявления поддающегося обнаружению терапевтического или профилактического эффекта, такого как облегчение симптомов, связанных с заболеванием, предотвращение или отсрочка начала заболевания и/или также уменьшение тяжести или частоты симптомов заболевания. Терапевтически эффективное количество можно вводить в режиме

дозирования, который может включать множественные стандартные дозы. Для любой конкретной терапевтической молекулы терапевтически эффективное количество (и/или подходящая стандартная доза в пределах эффективного режима дозирования) может варьироваться, например, в зависимости от пути введения, от комбинации с другими фармацевтическими агентами. Также, конкретное терапевтически эффективное количество (и/или стандартная доза) для любого конкретного субъекта может зависеть от множества факторов, включая подлежащее лечению расстройство и тяжесть расстройства; активность конкретного используемого фармацевтического агента; конкретную используемую композицию; возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и диету субъекта; время введения, способ введения и/или скорость выведения или метаболизма конкретной используемой терапевтической молекулы; продолжительность лечения; и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

**[0072]** *Лечение:* Используемый в данном документе термин «лечение» (также «лечить» или «процесс лечения») относится к любому введению терапевтической молекулы (например, антитела к CD19, описанного в настоящем документе), которое частично или полностью облегчает, ослабляет, улучшает, подавляет, задерживает начало, снижает тяжесть и/или уменьшает частоту возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, расстройства и/или состояния. Такое лечение может проводиться у субъекта, у которого не проявляются признаки соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния, и/или субъекта, у которого проявляются только ранние признаки заболевания, расстройства и/или состояния. Альтернативно или дополнительно, такое лечение может проводиться у субъекта, у которого проявляется один или более установленных признаков соответствующего заболевания, расстройства и/или состояния.

## **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**[0073]** Графические материалы предназначены только для иллюстрации; не для ограничения.

**[0074]** На Фиг. 1 показаны типичные хроматограммы проточной цитометрии антител к CD19, связывающихся с экспрессирующими CD19 клетками Raji и NALM-6 дикого типа и клетками с нокаутом CD19.

**[0075]** На Фиг. 2A-2C показаны типичные кривые связывания антител к CD19, связывающих CD19 на клетках NALM-6.

[0076] На Фиг. 3 показаны типичные результаты конкурентного анализа, использованного для характеристики антител к CD19 и их антигенсвязывающих фрагментов путем биннинга эпитопов.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[0077] Настоящее изобретение частично основано на открытии сконструированных антител и их антигенсвязывающих фрагментов, которые проявляют связывание с CD19 (например, CD19 человека). CD19 (также известный как «кластер дифференцировки 19», В-лимфоцитарный антиген CD19, В-лимфоцитарный поверхностный антиген В4, В4, CV1D3 или дифференцировочный антиген CD19) представляет собой белок с одним трансмембранным доменом, цитоплазматическим С-концом и внеклеточным N-концом. CD19 специфически экспрессируется в нормальных и неопластических В-клетках, а также в фолликулярных дендритных клетках. Поверхностная плотность CD19 сильно регулируется на протяжении развития и созревания В-клеток вплоть до потери экспрессии во время терминальной дифференцировки плазматических клеток. Кроме того, CD19 является поверхностным биомаркером для В-лимфоцитов и, следовательно, может быть пригодным антигеном для распознавания раковых клеток, возникающих из этого типа В-клеток (например, В-клеточных лимфом).

### **Антитела**

[0078] Описанные в данном документе антитела к CD19 предназначены для специфического связывания с CD19. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе антитела к CD19 и их фрагменты связываются с CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления CD19 человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности со ссылочным номером NCBI NP\_001171569.1 (SEQ ID NO: 4) или ее фрагмента.

[0079] SEQ ID NO: 4 представлена ниже:

[0080] MPPRLLFFL LFLTPMEVRP EEPLVVKVEE GDNAVLQCLK  
GTSDGPTQQL TWSRESPLKP FLKLSLGLPG LGIHMRLAI WLFIFNVSQQ  
MGGFYLCQPG PPSEKAWQPG WTVNVEGSGE LFRWNVSDLG GLGCGLKNRS  
SEGPSSPSGK LMSPKLYVWA KDRPEIWEGE PPCLPPRDSL NQSLSQDLTM  
APGSTLWLSC GVPPDSVSRG PLSWTHVHPK GPKSLLSLEL KDDRPARDMW  
VMETGLLLPR ATAQDAGKYY CHRGNLTMSF HLEITARPVL WHWLLRTGGW

KVSAVTLAYL IFCLCSLVGI LHLQRALVLR RKRKRMTDPT RRFFKVTPPP  
 GSGPQNQYGN VLSLPTPTSG LGRAQRWAAG LGGTAPSYGN PSSDVQADGA  
 LGSRSPPGVG PEEEEGEGYE EPDSEEDSEF YENDSNLGQD QLSQDGSgye  
 NPEDEPLGPE DEDSFSNAES YENEDEELTQ PVARTMDFLS PHGSAWDPSR  
 EATSLAGSQS YEDMRGILYA APQLRSIRGQ PGPNHEEDAD SYENMDNPDG  
 PDPAWGGGGR MGTWSTR [SEQ ID NO: 4]

**[0081]** В некоторых вариантах осуществления CD19 человека содержит или состоит из аминокислотной последовательности со ссылочным номером NCBI NP\_001761.3 (SEQ ID NO: 45) или ее фрагмента.

**[0082]** SEQ ID NO: 45 представлена ниже:

MPPRLLFFL LFLTPMEVRP EEPLVVKVEE GDNAVLQCLK GTSDGPTQQL  
 TWSRESPLKP FLKLSLGLPG LGIHMRLAI WLFIFNVSQQ MGGFYLCQPG  
 PPSEKAWQPG WTVNVEGSGE LFRWNVSDLG GLGCGLKNRS SEGSPSPSGK  
 LMSPKLYVWA KDRPEIWEGE PPCLPPRDSL NQSLSQDLTM APGSTLWLSC  
 GVPPDSVSRG PLSWTHVHPK GPKSLLSLEL KDDRPARDMW VMETGLLLPR  
 ATAQDAGKYY CHRGNLTMSF HLEITARVPL WHWLLRTGGW KVSAVTLAYL  
 IFCLCSLVGI LHLQRALVLR RKRKRMTDPT RRFFKVTPPP GSGPQNQYGN  
 VLSLPTPTSG LGRAQRWAAG LGGTAPSYGN PSSDVQADGA LGSRSPPGVG  
 PEEEEGEGYE EPDSEEDSEF YENDSNLGQD QLSQDGSgye NPEDEPLGPE  
 DEDSFSNAES YENEDEELTQ PVARTMDFLS PHGSAWDPSR EATSLGSSY  
 EDMRGILYAA PQLRSIRGQP GPNHEEDADS YENMDNPDGP DPAWGGGGRM GTWSTR  
 [SEQ ID NO: 45]

**[0083]** В некоторых вариантах осуществления антитела к CD19 и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, связываются с внеклеточным доменом CD19. В некоторых вариантах осуществления антитела к CD19 и их антигенсвязывающие фрагменты связываются с внеклеточным доменом CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CD19 человека содержит или состоит из аминокислот 20-291 SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления внеклеточный домен CD19 человека содержит или состоит из аминокислот 20-291 SEQ ID NO: 45.

**[0084]** В некоторых вариантах осуществления CD19 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по

меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или по меньшей мере на около 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, или ее фрагменту.

**[0085]** В некоторых вариантах осуществления CD19 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или по меньшей мере на около 100% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 45, или ее фрагменту.

**[0086]** Антитело к CD19, описанное в настоящем документе, может быть иммуноглобулином, антителом с тяжелой цепью, антителом с легкой цепью, антителом на основе LRR или другим белковым каркасом с антителоподобными свойствами, а также другим иммунологическим связывающим фрагментом, известным в данной области техники, включая, например, Fab, Fab', Fab'2, Fab<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, антитело, диатело, триантитело, тетратело, минитело, макситело, тандемное диатело (tandab), DVD, BiTe, четырехвалентное тандемное антитело (TandAb) и т.п., или любую их комбинацию. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов антител известны в данной области техники.

**[0087]** Антитело может представлять собой молекулу иммуноглобулина, состоящую из четырех полипептидных цепей, например, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей. Тяжелая цепь может включать переменный домен тяжелой цепи и константный домен тяжелой цепи. Константный домен тяжелой цепи может включать области CH1, шарнира, CH2, CH3 и, в некоторых случаях, CH4. Подходящая константная область тяжелой цепи может быть получена из любого иммуноглобулина (например, IgA, IgG или IgE). В некоторых вариантах осуществления подходящая константная область тяжелой цепи может быть получена из IgG1, IgG2 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления подходящая константная область тяжелой цепи получена из IgG1. Легкая цепь может включать переменный домен легкой цепи и константный домен легкой цепи. Константный домен легкой цепи может включать либо легкую цепь каппа, либо легкую цепь лямбда. Переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи обычно можно дополнительно разделить на области вариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждый из таких переменных доменов тяжелой цепи и легкой цепи может включать три CDR и четыре

каркасных участка, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4, один или несколько из которых могут быть сконструированы, как описано в данном документе. Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям по Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 та 1991)) или по Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). Используемые в данном документе CDR относятся к каждой из тяжелых (HCDR1, HCDR2, HCDR3) и легких (LCDR1, LCDR2, LCDR3) цепей.

**[0088]** Варианты осуществления изобретения включают антитела, содержащие CDR, обнаруженные в доменах vH и vL, описанных в настоящем документе, которые идентифицируются с использованием обычных систем нумерации, таких как системы нумерации IMGT, Kabat и Chothia. Такие системы нумерации хорошо известны в данной области техники.

#### **Вариабельная область тяжелой цепи**

**[0089]** В некоторых вариантах осуществления антитела к CD19 или их фрагменты, описанные в настоящем документе, содержат общую вариабельную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит последовательности определяющей комплементарности области (CDR) вариабельной области тяжелой цепи (vH):

CDR1 vH: SYGMH (SEQ ID NO: 1)

CDR2 vH: LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2)

CDR3 vH: PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3)

**[0090]** В некоторых вариантах осуществления CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации Kabat.

**[0091]** В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFDYWGQGT LVTVSS (SEQ ID NO: 5).

**[0092]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5.

**[0093]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 5, а также включает одну или несколько последовательностей CDR1 vH, CDR2 vH и/или CDR3 vH, описанных в настоящем документе.

**[0094]** В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, идентичную SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления V<sub>H</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на около 80% (*например*, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90% или по меньшей мере на около 95%) идентична или гомологична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5. Например, V<sub>H</sub> содержит аминокислотную последовательность, которая на около 80%, на около 81%, на около 82%, на около 83%, на около 84%, на около 85%, на около 86%, на около 87%, на около 88%, на около 89% %, на около 90%, на около 91%, на около 92%, на около 93%, на около 94%, на около 95%, на около 96%, на около 97%, на около 98%, на около 99% или на около 100% идентичную или гомологичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит не более 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18 , 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 5.

**[0095]** В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи антитела к CD19 кодируется полинуклеотидом, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты

**[0096]** CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG  
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCA  
CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCACTGATATGGTATG  
ATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA  
GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACAC  
GGCGGTGTACTACTGCGCCAAGCCAGTGGAAGGACTATTAAGAGGATTCGATTA  
CTGGGGACAGGGTACATTGGTCAACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 6)

**[0097]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 имеет нуклеотидную

последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления сконструированные антитела имеют нуклеотидную последовательность тяжелой цепи, идентичную SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 имеет нуклеотидную последовательность, которая кодирует антитело, содержащее не более 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 5.

**[0098]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 кодируется полинуклеотидом, который содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность тяжелой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 6, а также включает одну или несколько последовательностей CDR1 vH, CDR2 vH и/или CDR3 vH, описанных в настоящем документе.

**[0099]** Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность CDR тяжелой цепи можно легко комбинировать, например, методами молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, представленными в настоящем документе или иным образом известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники.

**[0100]** В различных сконструированных антителах, описанных в настоящем документе, константный домен тяжелой цепи может относиться к любому классу (или подклассу). В различных сконструированных антителах, описанных в настоящем документе, константный домен тяжелой цепи может включать аминокислотную последовательность любого одного или нескольких из IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, включая подклассы, такие как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, и IgA2. В различных вариантах осуществления константный домен сконструированных антител, описанных в настоящем документе, может включать смесь двух или более классов (или подклассов) константного домена тяжелой цепи иммуноглобулина. Например, антитело к CD19 может включать первую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, выбранного из константного домена класса IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, и вторую часть константного домена, которая имеет последовательность

константного домена иммуноглобулина, отличную от первой и выбранную из константного домена класса IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. В некоторых случаях константный домен антитела к CD19, описанный в настоящем документе, может включать смесь двух или более подклассов конкретного класса константных доменов, например, первую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, выбранного из константного домена подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и вторую часть константного домена, которая имеет последовательность константного домена иммуноглобулина, отличную от первой и выбранную из константного домена подкласса IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых конкретных вариантах осуществления константный домен включает весь или часть константного домена IgG2 и весь или часть константного домена IgG4.

**[0101]** В некоторых случаях антитело к CD19 включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, который проявляет измененное связывание (по сравнению с эталонной константной областью) с одним или несколькими Fc-рецепторами (например, рецептором FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIV или FcRn). В некоторых вариантах осуществления константная область, Fc-область или Fc-фрагмент сконструированы таким образом, чтобы связываться с мишенью (например, рецептором FcRn) измененным образом (например, чувствительным к pH образом (например, более или менее чувствительным к pH образом) и/или сниженным или повышенным связыванием) по сравнению с эталонной константной областью, Fc-областью или Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые проявляют пониженное связывание (по сравнению с эталонной константной областью) с одним или несколькими рецепторами Fcγ (например, FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB или FcγRIV). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, которые проявляют повышенное связывание с рецептором FcRn (по сравнению с эталонной константной областью) при pH сыворотки и/или при внутриклеточном pH.

**[0102]** Например, антитело к CD19 может включать константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, сконструированные таким образом, чтобы они включали вставку, делецию или замену аминокислоты одного или нескольких аминокислотных остатков 251-256, 285- 290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация по Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)). Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что одна или несколько из этих

аминокислот константной области, Fc-области или Fc-фрагмента опосредуют взаимодействие с Fc-рецептором, например, FcRn. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из этих описанных аминокислот заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления остаток негистидина заменен остатком гистидина. В некоторых вариантах осуществления остаток гистидина заменен остатком негистидина.

**[0103]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 308, 309, 311, 312 и 314, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких положениях 308, 309, 311, 312 и 314 на треонин, пролин, серин, аспарагиновую кислоту и лейцин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 308, 309 и 311 заменены на изолейцин, пролин и глутаминовую кислоту, соответственно. В других вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 308, 309, 311, 312 и 314 заменены на треонин, пролин, серин, аспарагиновую кислоту и лейцин, соответственно.

**[0104]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 251, 252, 254, 255 и 256, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких из этих положений. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 заменен на лейцин или аргинин, остаток 252 заменен на лейцин, тирозин, фенилаланин, серин, триптофан или треонин, остаток 254 заменен на треонин или серин, остаток 255 заменен на лейцин, глицин, изолейцин или аргинин и/или остаток 256 заменен на серин, фенилаланин, аргинин, глутамин, глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, аланин, аспарагин или треонин. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 заменен на лейцин, остаток 252 заменен на тирозин или лейцин, остаток 254 заменен на треонин или серин и/или остаток 255 заменен на аргинин. В других вариантах осуществления остаток 252 заменен на фенилаланин и/или остаток 256 заменен на аспарагиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления остаток 251 заменен на лейцин, остаток 252 заменен на тирозин, остаток 254 заменен на треонин или серин и/или остаток 255 заменен на аргинин.

**[0105]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 428, 433, 434, 435 и

436, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких из этих положений. В некоторых вариантах осуществления остаток 428 заменен на метионин, треонин, лейцин, фенилаланин или серин, остаток 433 заменен на лизин, аргинин, серин, изолейцин, пролин, глутамин или гистидин, остаток 434 заменен на фенилаланин, тирозин или гистидин, остаток 435 заменен на тирозин и/или остаток 436 заменен на гистидин, аспарагин, аргинин, треонин, лизин, метионин или треонин. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 433, 434, 435 и 436 заменены на лизин, фенилаланин, тирозин и гистидин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остаток 428 заменен на метионин и/или остаток 434 заменен на тирозин.

**[0106]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие аминокислотные модификации в одном или нескольких из положений 385, 386, 387 и 389, более конкретно, имеющие замены в одном или нескольких из этих положений. В некоторых вариантах осуществления остаток 385 заменен на аргинин, аспарагиновую кислоту, серин, треонин, гистидин, лизин или аланин, остаток 386 заменен на треонин, пролин, аспарагиновую кислоту, серин, лизин, аргинин, изолейцин или метионин, остаток 387 заменен на аргинин, гистидин, серин, треонин, аланин или пролин, и/или остаток 389 заменен на пролин или серин. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 385, 386, 387 и 389 заменены на аргинин, треонин, аргинин и пролин, соответственно. В некоторых вариантах осуществления остатки в одном или нескольких положениях 385, 386 и 389 заменены на аспарагиновую кислоту, пролин и серин, соответственно.

**[0107]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 включает константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, имеющие одну или несколько из следующих замен: лейцин в остатке 251, тирозин или лейцин в остатке 252, треонин или серин в остатке 254, аргинин в остатке 255, треонин в остатке 308, пролин в остатке 309, серин в остатке 311, аспарагиновая кислота в остатке 312, лейцин в остатке 314, аргинин в остатке 385, треонин в остатке 386, аргинин в остатке 387, пролин в остатке 389, метионин в остатке 428, лизин в остатке 433, фенилаланин или тирозин в остатке 434, тирозин в положении 435 и/или тирозин в положении 436. Дополнительные аминокислотные замены, которые могут быть включены в константную область, Fc-область или Fc-фрагмент, включают замены, описанные, например, в патентах США № 6277375; 8012476; и 8163881.

**[0108]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в

настоящем документе, включает константный домен тяжелой цепи, который включает мутацию Ala-Ala, описанную, например, в публикациях РСТ № WO 94/28027 и WO 98/47531; и Xu et al. (2000) Cell Immunol 200:16-26. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 с одной или несколькими мутациями в константной области тяжелой цепи, включая мутацию Ala-Ala, обладает сниженной эффекторной функцией или не имеет ее. В соответствии с этими вариантами осуществления константная область антитела к CD19, описанная в настоящем документе, может содержать замену аланина в положении 234 и/или мутацию аланина в положении 235 (нумерация EU).

**[0109]** Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность константного домена тяжелой цепи можно легко комбинировать, например, методами молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, представленными в настоящем документе или иным образом известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники.

### **Вариабельная область легкой цепи**

**[0110]** В настоящем изобретении дополнительно предложено антитело к CD19 или его фрагмент, содержащее различные указанные последовательности в одном или нескольких переменных областях легкой цепи, в том числе в определяющих комплементарность областях легкой цепи LCDR1-3. В различных вариантах осуществления молекулы с указанными переменными областями легкой цепи снабжены последовательностями тяжелой цепи, как обсуждалось выше. В некоторых вариантах осуществления CDR идентифицируют в соответствии с системой нумерации Kabat.

**[0111]** Таким образом, в одном аспекте в настоящем изобретении предложено антитело к CD19 или его фрагмент, содержащее последовательности определяющей комплементарности области (CDR) переменной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и последовательности определяющей комплементарности области (CDR) переменной области легкой цепи RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

**[0112]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).

**[0113]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

**[0114]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPTYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).

**[0115]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

**[0116]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT

(SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPFT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).

**[0117]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарности области (CDR) переменной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и переменную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарности области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).

**[0118]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарности области (CDR) переменной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и переменную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарности области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).

**[0119]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержит переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 20; и переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5.

**[0120]** В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителу к CD19 или его фрагменту, содержащему переменную область легкой цепи (VL) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 20-27; и переменную область тяжелой цепи (VH) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления область VL содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 20-27.

**[0121]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержат последовательности определяющей комплементарности области (CDR) переменной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3) и/или содержат последовательности определяющей комплементарности области

(CDR) варибельной области легкой цепи (vL), показанные в таблице 1. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержит последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области легкой цепи (vL), показанные в таблице 1:

**Таблица 1. CDR варибельной области легкой цепи антитела к CD19**

Антитело к CD19	CDR1 vL	CDR2 vL	CDR3 vL
Антитело 2	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7)	GASSRAT (SEQ ID NO: 9)	QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12)
Антитело 4	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7)	GASSRAT (SEQ ID NO: 9)	QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13)
Антитело 5	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7)	GASSRAT (SEQ ID NO: 9)	QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14)
Антитело 8	RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8)	GASSRAT (SEQ ID NO: 9)	QQLFDSPYT (SEQ ID NO: 15)
Антитело 6	RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8)	GASSRAT (SEQ ID NO: 9)	QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16)
Антитело 7	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7)	GASSRAT (SEQ ID NO: 9)	QQAGGVPFPT (SEQ ID NO: 17)
Антитело 1	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7)	GASNRAT (SEQ ID NO: 10)	QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18)
Антитело 15	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7)	GASRRAT (SEQ ID NO: 11)	QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19)

**[0122]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержит варибельную область легкой цепи (vL) с аминокислотными

последовательностями или кодируется нуклеотидной последовательностью, показанной в таблице 2.

**Таблица 2. Последовательности переменной области легкой цепи**

Антител о к CD19	Аминокислотная последовательность vL	Нуклеотидная последовательность vL
Антител о 2	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA                      SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI                      YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL                      TISRLEPEDFAVYYCQQAGAVPITF                      GGGTKVEIK                      (SEQ ID NO: 20)</p>	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA                      GGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG                      GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG                      GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCA                      GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG                      AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT                      CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG                      GGCCACTGGCATCCCAGACAGGT                      TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA                      GACTTCACTCTCACCATCAGCAGA                      CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT                      GTATTACTGTCAGCAGGCCGGAG                      CCGTCCCTATCACTTTTGGCGGAG                      GGACCAAGGTTGAGATCAAA                      (SEQ ID NO: 28)</p>
Антител о 4	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA                      SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI                      YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL                      TISRLEPEDFAVYYCQQVDSLHPFT                      FGGGTKVEIK                      (SEQ ID NO: 21)</p>	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA                      GGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG                      GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG                      GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCA                      GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG                      AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT                      CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG                      GGCCACTGGCATCCCAGACAGGT                      TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA                      GACTTCACTCTCACCATCAGCAGA                      CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT                      GTATTACTGTCAGCAGGTCGACA</p>

		<p>GTCTCCATCCTTTCACTTTTGGCG GAGGGACCAAGGTTGAGATCAA (SEQ ID NO: 29)</p>
<p>Антител о 5</p>	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQAGGVPPL TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 22)</p>	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCA GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT GTATTACTGTCAGCAGGCCGGAG GCGTCCCTCCTCTCACTTTTGGCG GAGGGACCAAGGTTGAGATCAA (SEQ ID NO: 30)</p>
<p>Антител о 8</p>	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVRSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQLEFDSPTYF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)</p>	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTTAGGAGCA GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT GTATTACTGTCAGCAGCTCTTCGA CAGTCCTTACACTTTTGGCGGAGG GACCAAGGTTGAGATCAA</p>

		(SEQ ID NO: 31)
Антител о 6	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVRSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQAGVPPLTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24)	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA GGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTTAGGAGCA GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGGTGCATCCAGCAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT GTATTACTGTCAGCAGGCCGGAG TCCCCCTCTCACTTTTGGCGGAG GGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 32)
Антител о 7	EIVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQAGGVPPF TFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)	GAAATTGTGATGACGCAGTCTCC AGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGC AGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGC TCCTCATCTATGGTGCATCCAGCA GGGCCACTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC AGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGGCCGGA GGCGTCCCTCCTTTCACTTTTGGC GGAGGGACCAAGGTTGAGATCAA A (SEQ ID NO: 33)

<p>Антител о 1</p>	<p>EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQAGVFPFTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 26)</p>	<p>GAAATTGTGATGACGCAGTCTCC AGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCA GGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGC AGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGC TCCTCATCTATGGTGCATCCAACA GGGCCACTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGAC AGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAG TGTATTACTGTCAGCAGGCCGGA GTCTTCCCTTTCACCTTTTGGCGGA GGGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 34)</p>
<p>Антител о 15</p>	<p>EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLI YGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQAGIPPYTF GGGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)</p>	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCA GGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAG GGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCA GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCT CCTCATCTATGGTGCATCCAGAAG GGCCACTGGCATCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACA GACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGT GTATTACTGTCAGCAGGCCGGCA TCCCCCTTACACTTTTGGCGGAG GGACCAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 35)</p>

[0123] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит

аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20-27.

**[0124]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20-27, а также включает одну или несколько последовательностей CDR1 vL, CDR2 vL и/или CDR3 vL, описанных в настоящем документе.

**[0125]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержит аминокислотную последовательность легкой цепи, идентичную SEQ ID NO: 20-27. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 содержит не более 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных замен относительно SEQ ID NO: 20-27.

**[0126]** В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность по настоящему изобретению кодирует антитело к CD19, содержащее аминокислотную последовательность легкой цепи, имеющую по меньшей мере 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 20-27, а также включает одну или несколько последовательностей CDR1 vL, CDR2 vL и/или CDR3 vL, описанных в настоящем документе.

**[0127]** Как будет понятно специалистам в данной области техники, любую такую последовательность CDR легкой цепи можно легко комбинировать, например, методами молекулярной биологии, с любыми другими последовательностями или доменами антител, представленными в настоящем документе или иным образом известными в данной области техники, включая любые каркасные области, CDR или константные домены, или их части, описанные в настоящем документе или иным образом известные в данной области техники, которые могут присутствовать в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте любого формата, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники.

**[0128]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, включает легкую цепь, которая включает любую последовательность константного домена легкой цепи, например, константную последовательность легкой цепи, известную специалистам в данной области техники. Как известно специалистам в данной области техники, константный домен легкой цепи может

представлять собой константный домен легкой каппа-цепи или константный домен легкой лямбда-цепи. В некоторых вариантах осуществления константный домен легкой цепи, как описано в настоящем документе, представляет собой константный домен легкой каппа-цепи. В различных вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, включает константный домен легкой цепи.

### **Типовые антитела**

**[0129]** Сконструированные антитела могут включать различные тяжелые цепи и легкие цепи, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 может включать две тяжелые цепи и две легкие цепи. В различных вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает антитело, включающее по меньшей мере одну тяжелую цепь и/или легкую цепь, как описано в настоящем документе, по меньшей мере один каркасный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе, по меньшей мере один CDR переменного домена тяжелой цепи и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе, и/или любой константный домен тяжелой цепи и/или легкой цепи, как описано в настоящем документе.

**[0130]** В различных вариантах осуществления антитело к CD19, описано в настоящем документе, представляет собой гомодимерное моноклональное антитело. В различных вариантах осуществления антитело к CD19, описано в настоящем документе, представляет собой гетеродимерное антитело. В различных вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой, например, типичное антитело или диатело, триатело, тетратело, минитело, макситело, тандемное диатело (tandab), DVD, BiTe, scFv, четырехвалентное тандемное антитело (TandAb), scFv, Fab, Fab<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, F(ab')<sub>2</sub> и т.п., или любую их комбинацию.

**[0131]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к слитым белкам, содержащим один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, как описано в настоящем документе, или их часть, и один или несколько дополнительных полипептидов.

### **Примеры одноцепочечных переменных фрагментов**

**[0132]** В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен одноцепочечный переменный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления scFv представляет собой scFv человека. «Одноцепочечный переменный фрагмент» или «scFv» относится к слитому белку переменных областей тяжелой (V<sub>H</sub>) и легкой (V<sub>L</sub>) цепей

иммуноглобулина (например, мышиноного или человеческого), ковалентно связанных с образованием гетеродимера  $V_H::V_L$ . Тяжелая ( $V_H$ ) и легкая цепи ( $V_L$ ) либо соединены напрямую, либо соединены кодирующим пептид линкером (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), который соединяет N-конец  $V_H$  с C-концом  $V_L$  или C-конец  $V_H$  с N-концом  $V_L$ . Линкер обычно обогащен глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. Линкер может связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена. Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal. Chem. 80(6):1910-1917 (2008) и WO 2014/087010, содержание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер G4S (SEQ ID NO: 46).

**[0133]** Альтернативно или дополнительно, scFv может быть получен из Fab (вместо антитела, например, получен из библиотек Fab). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой Fab. В некоторых вариантах осуществления Fab является перекрестно связанным. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой F(ab)<sub>2</sub>. Любая из вышеуказанных молекул может быть включена в состав слитого белка с гетерологичной последовательностью для образования антитела к антигену CD19 или его антигенсвязывающего фрагмента.

**[0134]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации (Kd) по меньшей мере около  $1 \times 10^{-6}$  M, по меньшей мере около  $1 \times 10^{-7}$  M, по меньшей мере около  $1 \times 10^{-8}$  M, по меньшей мере около  $1 \times 10^{-9}$  M или по меньшей мере около  $1 \times 10^{-10}$  M. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации (Kd) по меньшей мере около  $2 \times 10^{-8}$  M. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации (Kd) от около  $2 \times 10^{-8}$  M до около  $8 \times 10^{-9}$  M.

**[0135]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации (Kd) от около 1 нМ до 50 нМ, от около 5 нМ до 30 нМ, от около 5 нМ до 25 нМ, или от около 8 нМ до 20 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент связывается с CD19 (например, CD19 человека) с константой диссоциации (Kd) по меньшей мере около 50 нМ, по меньшей мере около 40 нМ, по меньшей мере около 35 нМ, по меньшей мере

около 30 нМ, по меньшей мере около 25 нМ, по меньшей мере около 20 нМ, по меньшей мере около 19 нМ, по меньшей мере около 18 нМ, по меньшей мере около 17 нМ, по меньшей мере около 16 нМ, по меньшей мере около 15 нМ, по меньшей мере около 14 нМ, по меньшей мере около 13 нМ, по меньшей мере около 12 нМ, по меньшей мере около 11 нМ, по меньшей мере около 10 нМ, по меньшей мере около 9 нМ, по меньшей мере около 8 нМ, по меньшей мере около 7 нМ, по меньшей мере около 6 нМ, по меньшей мере около 5 нМ.

**[0136]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID No: 1-4. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую одну или несколько последовательностей CDR, представленных в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую одну или несколько последовательностей легкой цепи, представленных в Таблице 2.

**[0137]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит линкер, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 36, которая представлена ниже:

GGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 36]

**[0138]** В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 37, которая представлена ниже:

GGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 37]

**[0139]** В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 38, которая представлена ниже:

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 38]

**[0140]** В некоторых вариантах осуществления линкер содержит или состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 39, которая представлена ниже:

GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 39]

**[0141]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 или его фрагмент содержит консервативную модификацию последовательности (например, антитело к CD19 или его фрагмент, описанные в настоящем документе). В некоторых вариантах

осуществления модификация консервативной последовательности представляет собой аминокислотную модификацию, которая существенно не влияет или не изменяет характеристики связывания описанного в настоящем документе антитела к CD19 или его фрагмента (например, антитела или его фрагмента), содержащего аминокислотную последовательность. Консервативные модификации могут включать аминокислотные замены, вставки и делеции. Модификации могут быть введены в антитела к CD19 или их фрагменты стандартными методами, известными в данной области техники, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Аминокислоты можно разделить на группы в соответствии с их физико-химическими свойствами, такими как заряд и полярность. Консервативные аминокислотные замены — это замены аминокислотного остатка на аминокислоту из той же группы. Например, аминокислоты можно классифицировать по заряду: положительно заряженные аминокислоты включают лизин, аргинин, гистидин, отрицательно заряженные аминокислоты включают аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аминокислоты с нейтральным зарядом включают аланин, аспарагин, цистеин, глутамин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин. Кроме того, аминокислоты можно классифицировать по полярности: к полярным аминокислотам относятся аргинин (основные полярные), аспарагин, аспарагиновая кислота (кислотные полярные), глутаминовая кислота (кислотные полярные), глутамин, гистидин (основные полярные), лизин (основные полярные), серин, треонин и тирозин; неполярные аминокислоты включают аланин, цистеин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в области CDR могут быть заменены другими аминокислотными остатками из той же группы, и измененное антитело может быть проверено на сохранение функции. В некоторых вариантах осуществления изменено не более одного, не более двух, не более трех, не более четырех, не более пяти остатков в указанной последовательности или области CDR.

**[0142]** В некоторых вариантах осуществления легкая цепь и/или тяжелая цепь scFv к CD19 содержат сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологии или идентичности с аминокислотной последовательностью MDMRVPAQLLGLLLLWLPDTRC (SEQ ID NO: 40) или

MEFGLSWVFLVALLRGVQC (SEQ ID NO: 41).

**[0143]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.  
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD  
RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQAGAVPITFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG  
GSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALIWYDG  
SNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRGFDYWGQ  
GTLVTVSS [SEQ ID NO: 42]

**[0144]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % гомологии или идентичности с SEQ ID NO: 42.

**[0145]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43.

**[0146]** EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG  
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQLFDSPTYTFGGGKTKVEIKGGGG  
SGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLE  
WVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGL  
LRGFDYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 43]

**[0147]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % гомологии или идентичности с SEQ ID NO: 43.

**[0148]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44.

**[0149]** QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV  
ALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPVEGLLRG  
FDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS  
SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQ

AGIPPYTFGGGKVEIK [SEQ ID NO: 44]

**[0150]** В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70 %, по меньшей мере 75 %, по меньшей мере 80 %, по меньшей мере 85 %, по меньшей мере 90 %, по меньшей мере 91 %, по меньшей мере 92 %, по меньшей мере 93 %, по меньшей мере 94 %, по меньшей мере 95 %, по меньшей мере 96 %, по меньшей мере 97 %, по меньшей мере 98 % или по меньшей мере 99 % гомологии или идентичности с SEQ ID NO: 44.

### **Нуклеотидные последовательности**

**[0151]** Настоящее изобретение включает нуклеотидные последовательности, кодирующие одну или несколько тяжелых цепей, переменные домены тяжелой цепи, каркасные области тяжелой цепи, CDR тяжелой цепи, константные домены тяжелой цепи, легкие цепи, переменные домены легкой цепи, каркасные области легкой цепи, CDR легкой цепи, константные домены легкой цепи или другие иммуноглобулиноподобные последовательности или антитела, описанные в настоящем документе. В различных вариантах осуществления такие нуклеотидные последовательности могут присутствовать в векторе. В различных вариантах осуществления такие нуклеотиды могут присутствовать в геноме клетки, например, клетки субъекта, нуждающегося в лечении, или клетки для продукции антитела, например, клетке млекопитающего для продукции антитела.

### **Сконструированные антитела и слитые белки**

**[0152]** В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предложены слитые белки, содержащие (i) одну или несколько антигенсвязывающих областей, описанных в настоящем документе (например, антигенсвязывающую область иммуноглобулина, антитело с тяжелой цепью, антитело с легкой цепью, антитело на основе LRR или другой белковый каркас с антителоподобными свойствами, а также другие антигенсвязывающие фрагменты, известные в данной области техники, включая, например, Fab, Fab', Fab'2, Fab<sub>2</sub>, Fab<sub>3</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv, Feb, scFv, SMIP, антитело, диатело, триатело, тетратело, минитело, макситело, тандемное диатело (tandab), DVD, BiTe, тандемное диатело (TandAb), и т.п.), например, один или несколько переменных доменов, описанных в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) и (ii) один или несколько дополнительных полипептидов. Например, альбумин является широко распространенным сывороточным

белком, который защищен от деградации за счет pH-зависимой рециркуляции, опосредованной взаимодействием с FcRn. В некоторых вариантах осуществления один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, как описано в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) сливают с альбумином, его частью (например, частью альбумина, которая связывается с FcRn) и/или сконструированным вариантом альбумина, который связывается с FcRn с повышенной аффинностью. В других случаях один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, описанных в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) сливают с полипептидом, который связывается с альбумином, с образованием слитого комплекса белок-альбумин, который, в свою очередь, может связываться с FcRn. В некоторых вариантах осуществления полипептид, который связывается с альбумином, представляет собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Альбумин или его часть могут включать мутацию одной или нескольких аминокислот, которая может модифицировать его связывание с FcRn. Такие мутации известны в данной области (см., например, Andersen et al., *Nature Communications* 3:610 doi: 10.1038/nocmms1607 (2012)). В других случаях один или несколько переменных доменов или сконструированных антител, описанных в настоящем документе, или их часть (например, один или несколько CDR, описанных в настоящем документе) сливают с трансферрином. Трансферрин рециркулирует путем связывания с рецептором трансферрина (см., например, Widera et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:1439-66 (2003)).

### **pH-зависимое связывание антитела к CD19 с CD19 и/или Fc-рецептором**

[0153] Сконструированные антитела, описанные в настоящем документе, могут быть сконструированы так, чтобы они проявляли pH-зависимость или повышенную pH-зависимость в отношении аффинности к CD19 (например, опосредованную одним или несколькими переменными доменами, описанными в настоящем документе) и/или измененной (например, повышенной, например, pH-зависимой) аффинности к FcRn (например, опосредованной одним или несколькими константными доменами, описанными в настоящем документе). Например, в некоторых вариантах осуществления антитело, способное связывать CD19, или переменный домен, способный связывать CD19, связывает CD19 с более высокой аффинностью при pH сыворотки (например, при нейтральном pH или при pH выше 7,4), чем при компартментальном (например, эндосомальный) pH (например, при кислом pH или при pH, равном или меньшем, чем pH

6,0). В различных вариантах осуществления, в которых CD19 связывается с антителом, связывающим CD19 в зависимости от pH, переход pH от pH сыворотки к компартментальному pH (например, от сыворотки к эндосоме) облегчает разделение CD19 и антитела (т. е. «отделение») при компартментальном pH и/или в конкретном компартменте, например, эндосоме. В различных вариантах осуществления такое pH-зависимое связывание может опосредовать рециркуляцию антител и/или деградацию CD19. В конкретных случаях переход от pH сыворотки к компартментальному pH (например, от сыворотки к эндосоме) облегчает разделение CD19 и антитела (т. е. «отделение») при компартментальном pH и/или в конкретном компартменте, например, эндосоме, так что антитело рециркулируется с помощью FcRn, а антиген расщепляется в лизосоме. В некоторых таких случаях pH-зависимость связывания CD19 улучшает «процессивность» антитела, по меньшей мере, в том, что после повторного использования антитело возвращается в сыворотку и свободно связывается с циркулирующим CD19-мишенью. В некоторых случаях рециркуляция антитела, проявляющего pH-зависимое связывание с CD19, может продолжаться до тех пор, пока антитело в конечном итоге не разрушится или не распадется, и к этому времени одна молекула антитела может связать и опосредовать инактивацию множества молекул CD19, а не только одной.

**[0154]** В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем документе антитело к CD19 включает константный домен (например, Fc-домен), проявляющий повышенную аффинность по сравнению с контролем в отношении Fc-рецептора, такого как FcRn. В некоторых вариантах осуществления такая повышенная аффинность по сравнению с контролем достигается при значении pH сыворотки (например, pH выше 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2 или выше). В некоторых вариантах осуществления такая повышенная аффинность по сравнению с контролем достигается при компартментальном pH (например, pH ниже 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 или ниже). В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем документе антитело к CD19 включает константный домен (например, Fc-домен), проявляющий pH-зависимость (или повышенную pH-зависимость по сравнению с контролем в отношении аффинности к Fc-рецептору, такому как FcRn. Неонатальный Fc-рецептор (FcRn) представляет собой молекулу, подобную ГКГС класса I, которая функционирует для защиты IgG и альбумина от катаболизма, опосредует транспорт IgG через эпителиальные клетки и участвует в презентации антигена профессиональными антигенпрезентирующими клетками. Подтипы антител IgG демонстрируют длительный период полужизни в сыворотке, в первую очередь из-за удаления антител из эндосом с помощью FcRn, который рециркулирует IgG обратно из

клеток.

**[0155]** В некоторых вариантах осуществления время полужизни антитела к CD19 в сыворотке увеличивается. Например, связывание антитела к CD19 с FcRn увеличивает время полужизни антитела в сыворотке от около 4 дней до около 45 дней, например, от около 5 дней до около 30 дней, от около 10 дней до около 30 дней или около 20 дней. дней до около 30 дней. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, имеет период полужизни в сыворотке около 5 дней, около 10 дней, около 15 дней, около 20 дней, около 25 дней, около 30 дней, около 35 дней, около 40 дней, около 45 дней, около 50 дней или дольше.

**[0156]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, проявляет pH-зависимое изменение в отношении аффинности к CD19. Аффинность может быть измерена как  $K_D$ , равновесная константа диссоциации антитела и антигена;  $K_D$  и аффинность обратно пропорциональны. В различных вариантах осуществления,  $K_D$  антитела к CD19, как описано в настоящем документе, и CD19 при pH сыворотки (например, pH выше 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2 или выше) или в условиях сыворотки составляет меньше около  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-14}$  или  $10^{-15}$  М. В некоторых случаях  $K_D$  описанного в данном документе антитела и CD19 при pH сыворотки составляет от 0,001 до 1 нМ, например, 0,001 нМ, 0,005 нМ, 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ или 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  CD19 при компартментальном pH (например, pH ниже 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 или ниже) или в условиях компартмента выше, чем  $K_D$  того же антитела к CD19 при pH сыворотки или в условиях сыворотки (и/или аффинность антитела к CD19 при компартментальном pH или в условиях компартмента может быть снижено по сравнению с аффинностью при pH сыворотки или в условиях сыворотки), например, по меньшей мере в 2 раза, например, в 2 раза, в 3 раза, в 4 раза, в 5 раз, в 6 раз, в 7 раз, в 8 раз, в 9 раз, в 10 раз, в 20 раз, в 30 раз, в 40 раз, в 50 раз, в 75 раз, в 100 раз, в 150 раз, в 200 раз, в 250 раз, в 300 раз, в 350 раз, в 400 раз, в 450 раз, в 500 раз, в 600 раз, в 700 раз, в 800 раз, в 900 раз, в 1000 раз, в 2000 раз, в 3000 раз, в 4000 раз, в 5000 раз, в 6000 раз, в 7000 раз, в 8000 раз, в 9000 раз, в 10000 раз или более. В некоторых вариантах осуществления  $K_D$  CD19 при компартментальном pH (например, pH ниже 7,2, 7,1, 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 или ниже) или в компартментальных условиях может составлять, например, более  $10^{-15}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-13}$ ,  $10^{-12}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  или  $10^{-3}$  М. В некоторых случаях  $K_D$  описанного в данном документе антитела к CD19 при

компаратментальном рН или в компартментальных условиях может быть, например, равным или составлять более 1 нМ, например, 1 нМ, 2 нМ, 3 нМ, 4 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1 мМ или более.

**[0157]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, имеет более длительный период полужизни, чем эталонное антитело (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19) при введении субъекту, например, в сыворотке субъекта. В различных вариантах осуществления период полужизни эталонного антитела (например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19) в сыворотке может составлять, например, от 250 до 300 часов. В различных вариантах осуществления период полужизни в сыворотке антитела к CD19, как описано в настоящем документе, может составлять, например, по меньшей мере 250 часов, например, по меньшей мере 260, 270, 280, 290 или 300 часов. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке антитела к CD19, как описано в настоящем документе, может составлять по меньшей мере 300 часов, например, по меньшей мере 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 часов. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке антитела к CD19, как описано в настоящем документе, может составлять по меньшей мере 1000 часов, например, по меньшей мере 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000 или 15000 часов или более. В различных вариантах осуществления период полужизни в сыворотке антитела к CD19, как описано в настоящем документе, может составлять по меньшей мере 12 дней, 15 дней, 20 дней, 25 дней, 30 дней, 35 дней, 40 дней, 45 дней, 50 дней, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев и более. В различных вариантах осуществления период полужизни в сыворотке антитела к CD19, как описано в настоящем документе, может быть увеличен по сравнению с эталонным антителом (например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19) по меньшей мере, например, в 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз и более.

**[0158]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, демонстрирует увеличенный период полужизни в плазме, увеличенное среднее время удерживания в плазме и/или повышенный уровень клиренса CD19 (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание CD19). Эти параметры могут быть определены способами, известными специалистам в данной области техники (например, как описано в Nestorov et al., J. Clin. Pharmacol. 48:406-417 (2008);

Leveque et al., *Anticancer Research* 25:2327-2344 (2005); Igawa et al., *PLoS One* 8: e63236. doi: 10.1371/journal.pone.0063236 (2013)). Например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе (например, разовая доза такого антитела к CD19), снижает уровень CD19 в плазме по меньшей мере в 10 раз, 50 раз, 100 раз, 250 раз, 500 раз, 750 раз, 1000 раз, 1500 раз или более относительно эталонного антитела.

### **Сконструированные антитела и их фрагменты**

**[0159]** Антитела к CD19 и их фрагменты в соответствии с настоящим изобретением сконструированы так, чтобы включать один или несколько связывающих фрагментов, которые специфически связывают одну или несколько представляющих интерес мишеней рН-зависимым образом. Антитела к CD19 и их фрагменты включают нуклеиновые кислоты (например, РНК и ДНК), белки (например, антитела) и их комбинации. рН-зависимые связывающие фрагменты могут представлять собой или включать, например, нуклеиновые кислоты (например, РНК и ДНК) и аптамеры, полипептиды (например, антитела или их фрагменты, альбумин, рецепторы, лиганды, сигнальные пептиды, авидин и белок А), полисахариды, биотин, гидрофобные группы, гидрофильные группы, лекарственные средства и любые органические молекулы, которые связываются с рецепторами.

#### *Антитело или его фрагмент в качестве связывающих фрагментов*

**[0160]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, представляют собой антитело к CD19. В некоторых случаях один или несколько связывающих фрагментов, описанных в настоящем документе, представляют собой или включают антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и/или их Fc-области (или Fc-фрагменты). Основная структура антитела IgG состоит из двух идентичных полипептидных легких цепей и двух идентичных полипептидных тяжелых цепей, связанных вместе дисульфидными связями. Первый домен, расположенный на амино-конце каждой цепи, имеет вариабельную аминокислотную последовательность, обеспечивающую специфичность связывания антител, характерную для каждого отдельного антитела. Они известны как вариабельные области тяжелой (VH) легкой (VL) цепи. Другие домены каждой цепи относительно инвариантны в аминокислотной последовательности и известны как константные области тяжелой (CH) и легкой (CL) цепи. Для антитела IgG легкая цепь включает одну вариабельную область (VL) и одну константную область (CL). Тяжелая цепь IgG включает вариабельную область (VH),

первую константную область (СН1), шарнирную область, вторую константную область (СН2) и третью константную область (СН3). В антителах IgE и IgM тяжелая цепь включает дополнительную константную область (СН4).

**[0161]** Антитела могут включать, например, моноклональные антитела, рекомбинантно полученные антитела, моноспецифические антитела, мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела), человеческие антитела, сконструированные антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, иммуноглобулины, синтетические антитела, тетрамерные антитела, содержащие две молекулы тяжелой цепи и две молекулы легкой цепи, мономер легкой цепи антитела, мономер тяжелой цепи антитела, димер легкой цепи антитела, димер тяжелой цепи антитела, пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела, интратела, слитые антитела (иногда называемые в данном документе «конъюгатами антител»), гетероконъюгированные антитела, однодоменные антитела, моновалентные антитела, одноцепочечные антитела или одноцепочечные Fv (scFv), верблюжки антитела, аффитела, фрагменты Fab, фрагменты F(ab')<sub>2</sub>, дисульфид-связанные Fv (sdFv), антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела), минитела, однодоменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител») и антигенсвязывающие фрагменты любого из вышеперечисленных. В определенных вариантах осуществления антитела, описанные в данном документе, относятся к популяциям поликлональных антител.

**[0162]** Термин «Fc-фрагмент», используемый в настоящем документе, относится к одному или нескольким фрагментам Fc-области, которые сохраняют функцию и/или активность Fc, описанные в настоящем документе, такие как связывание с Fc-рецептором. Используемый в данном документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, включают Fab-фрагмент, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, scFv-фрагмент, dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546) и выделенную определяющую комплементарную область (CDR). Эти фрагменты антител могут быть получены с использованием общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты могут быть подвергнуты скринингу на функциональность таким же образом, что и для интактных антител.

**[0163]** В некоторых аспектах в настоящем изобретении предложены антитела или их

фрагменты, которые связываются с CD19 человека, содержащие константные области тяжелой и/или легкой цепи человека, где константная область тяжелой цепи человека содержит изотипический вариант, содержащий Fc-область IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека или IgG4 человека.

**[0164]** В еще одном аспекте в настоящем изобретении предложено гуманизованное антитело или его фрагмент, которое связывается с CD19 человека, где антитело содержит вариант Fc-области IgG человека, который содержит аминокислотную замену S324N, заменяющую серин в положении аминокислоты 324 исходного антитела на аспарагин, тогда как антитело, содержащее вариант Fc-области IgG человека, проявляет улучшенную комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ) по сравнению с исходным антителом.

**[0165]** Антитела или их фрагменты могут быть получены любым известным в данной области способом синтеза антител (см., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; WO 92/22324; WO 98/46645). Химерные антитела могут быть получены способами, описанными, например, в Morrison, 1985, *Science* 229:1202, а гуманизованные антитела способами, описанными, например, в патенте США № 6180370.

**[0166]** Дополнительные композиции и способы, описанные в настоящем документе, представляют собой биспецифические антитела и мультивалентные антитела, как описано, например, в Segal et al., *J. Immunol. Methods* 248:1-6 (2001) и Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

#### *Сконструированные антигенсвязывающие области*

**[0167]** В некоторых вариантах осуществления связывающий фрагмент представляет собой или включает антитело (например, антитело IgG, например, антитело IgG1, IgG2 или IgG3) или антигенсвязывающий фрагмент, сконструированный для связывания с мишенью (т.е. антигеном) измененным образом (например, чувствительным к pH образом, например, более или менее чувствительным к pH образом) по сравнению с эталонным антителом или антигенсвязывающим фрагментом. Например, антитело можно сконструировать путем модификации (например, путем вставки, удаления или замены) аминокислоты в одном или нескольких CDR антитела и/или в положении, вовлеченном в структуру CDR антитела. Примерные неограничивающие сайты антитела, которые можно модифицировать,

включают следующие (положения аминокислот указаны на основе нумерации по Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH)).

**[0168]** Тяжелая цепь: H27, H31, H32, H33, H35, H50, H58, H59, H61, H62, H63, H64, H65, H99, H100b и H102.

**[0169]** Легкая цепь: L24, L27, L28, L32, L53, L54, L56, L90, L92 и L94.

**[0170]** В некоторых вариантах осуществления одна или несколько из этих описанных аминокислот могут быть заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что замена аминокислоты в одном или нескольких из этих положений на гистидин может привести к получению антитела, обладающего рН-зависимыми антигенсвязывающими свойствами. В некоторых вариантах осуществления остаток негистидина заменен остатком гистидина. В некоторых вариантах осуществления остаток гистидина заменен остатком негистидина. Дополнительные сконструированные антигенсвязывающие области включают области, описанные, например, в публикации патента США № 20110229489.

#### *Сконструированные константные области*

**[0171]** В некоторых случаях связывающий фрагмент представляет собой или включает константную область антитела, Fc-область или Fc-фрагмент, который связывает один или несколько Fc-рецепторов (например, рецептор FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIV или FcRn). В некоторых вариантах осуществления константная область, Fc-область или Fc-фрагмент сконструированы таким образом, чтобы связываться с мишенью (например, Fc-рецептором) измененным образом (например, чувствительным к рН образом например, более или менее чувствительным к рН образом) по сравнению с эталонной константной областью, Fc-областью или Fc-фрагментом.

**[0172]** В некоторых случаях связывающий фрагмент может представлять собой или включать константную область, Fc-область или Fc-фрагмент антитела IgG, сконструированные таким образом, чтобы они включали вставку, делецию или замену аминокислоты одного или нескольких аминокислотных остатков, описанных в настоящем документе (например, 251-256, 285- 290, 308-314, 385-389 и 428-436 (нумерация по Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, NIH))).

#### *Получение антител к CD19 и их фрагментов*

**[0173]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент,

описанные в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы они включали один или несколько связывающих фрагментов, которые проявляют чувствительное к рН связывание с одной или несколькими мишенями, путем мутагенеза с использованием известных методов. Например, можно получить последовательность эталонного полипептида (например, терапевтического антитела или терапевтического слитого белка), и можно вставить, удалить или заменить один или несколько аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков могут быть заменены гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот заменены на гистидин. Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что замена аминокислотного остатка на гистидин приводит к вставке сайта протонирования, что может повысить чувствительность связывающего фрагмента к рН. Полипептиды можно получать с использованием стандартных способов и анализировать на связывание с интересующими мишенями, как описано в настоящем документе. Дополнительные способы повышения чувствительности связывающего фрагмента к рН описаны, например, в Sarkar et al., *Nature Biotechnology* 20:908-913 (2002); Murtaugh et al., *Protein Science* 20:1619-1631 (2011) и публикации патента США № 20110229489.

**[0174]** В некоторых вариантах осуществления выбирают первую представляющую интерес мишень, и обеспечивают, получают и/или продуцируют антитело, которое избирательно связывается с мишенью (например, с использованием известных способов, описанных в настоящем документе). Одну или несколько аминокислот антигенсвязывающей области и/или Fc-участка заменяют (например, гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином), и определяют чувствительность связывания с мишенью к рН (и, дополнительно или альтернативно, с FcRn).

**[0175]** В некоторых вариантах осуществления обеспечивают, получают и/или продуцируют полипептид, который естественным образом связывается с представляющей интерес мишенью. Полипептид конъюгируют с Fc-областью или Fc-фрагментом, описанными в настоящем документе (например, который связывается с FcRn с желаемой аффинностью связывания) с использованием известных способов. Например, полипептид и Fc-область или Fc-фрагмент можно конъюгировать химическими средствами или с помощью рекомбинантной экспрессии в виде слитого белка. Дополнительно или альтернативно одна или несколько аминокислот полипептида могут быть заменены

(например, гистидином, аргинином, лизином, аспарагиновой кислотой, глутаминовой кислотой, серином, треонином, аспарагином или глутамином), и определяют чувствительность связывания полипептида и мишени к рН.

**[0176]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, сконструированы таким образом, чтобы включать один или несколько связывающих фрагментов, идентифицированных и/или отобранных путем скрининга. Например, антигенсвязывающий фрагмент, который связывает антиген чувствительным к рН образом, может быть идентифицирован с использованием библиотеки, например, фаговой библиотеки, экспрессирующей антигенсвязывающие фрагменты. Такую библиотеку можно подвергнуть скринингу на наличие антигенсвязывающих фрагментов, обладающих первой аффинностью к антигену при первом рН (например, при рН 7,4) и второй аффинностью к антигену при втором рН (например, при рН 5,5). Антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе, могут быть сконструированы таким образом, чтобы они включали такие идентифицированные рН-чувствительные антигенсвязывающие фрагменты. Дополнительно и/или альтернативно FcRn-связывающий фрагмент, который связывает FcRn чувствительным к рН образом, может быть идентифицирован с использованием библиотеки. Известны способы скрининга библиотек рекомбинантных антител (см., например, Hoogenboom, Nature Biotech. 23:1105-1116 (2005); патент США № 5837500; патент США № 5571698; WO 2012/044831).

### **ПЭГилирование**

**[0177]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, как описано в настоящем документе, может быть ПЭГилировано для включения моно- или поли- (например, 2-4) фрагментов ПЭГ. Такие ПЭГилированные антитела могут демонстрировать увеличенный период полужизни по сравнению с не-ПЭГилированным эталонным антителом, например, антителом, имеющим ту же аминокислотную последовательность, но другую степень ПЭГилирования или отсутствие ПЭГилирования.

**[0178]** ПЭГилирование можно проводить любой подходящей реакцией, известной в данной области техники. Способы получения ПЭГилированного белка обычно могут включать (а) взаимодействие полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, при которых полипептид становится присоединенным к одной или нескольким группам ПЭГ; и (b) получение продукта(ов) реакции. Как правило, условия реакций можно определять в

каждом конкретном случае на основе известных параметров и желаемого результата.

**[0179]** Существует ряд способов присоединения ПЭГ, доступных специалистам в данной области техники. Например, стадия ПЭГилирования антитела или его фрагмента, описанная в настоящем документе, может быть осуществлена посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой полиэтиленгликоля.

### **Измерение взаимодействия связывающих фрагментов и мишеней**

**[0180]** Связывающие свойства описанного в настоящем документе антитела или его фрагмента (например, антитела к CD19, описанного в настоящем документе) с мишенью (например, CD19 и/или FcRn) можно измерить способами, известными в данной области техники, например, одним из следующих методов: анализ VIACORE, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), рентгеновская кристаллография, анализ последовательности и сканирующий мутагенез. Связывающее взаимодействие антитела и CD19 и/или FcRn можно анализировать с помощью поверхностного плазмонного резонанса (ППР). ППР или анализ биомолекулярных взаимодействий (АБВ) выявляет биоспецифические взаимодействия в режиме реального времени без мечения каких-либо взаимодействующих веществ. Изменения массы на поверхности связывания (свидетельствующие о событии связывания) чипа АБВ приводят к изменению показателя преломления света вблизи поверхности. Изменения рефракции генерируют обнаруживаемый сигнал, который измеряется как показатель реакций в реальном времени между биологическими молекулами. Способы использования ППР описаны, например, в патенте США № 5641640; Raether (1988) Surface Plasmons Springer Verlag; Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345; Szabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705 и онлайн-ресурсах, предоставленных VIAcore International AB (Uppsala, Sweden). Кроме того, также можно использовать анализ KinExA® (анализ кинетического исключения), доступный от Sapidyne Instruments (Бойсе, штат Айдахо).

**[0181]** Информация по результатам ППР может быть использована для точного и количественного измерения равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) и кинетических параметров, включая  $K_{on}$  и  $K_{off}$ , для связывания связывающего фрагмента с мишенью (например, антитела к CD19 с CD19 и/или FcRn). Такие данные можно использовать для сравнения различных молекул. Информация по результатам ППР также может использоваться для разработки отношений структура-активность (ОСА). Например, можно

оценить кинетические и равновесные параметры связывания конкретных фрагментов связывания с мишенями при различных уровнях pH. Могут быть идентифицированы варианты аминокислот в заданных положениях, которые коррелируют с конкретными параметрами связывания, например, высокой аффинностью, низкой аффинностью и медленным  $K_{off}$ , при определенных уровнях pH.

### **Способы лечения**

**[0182]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, как описано в настоящем документе), применяют в способе лечения одного или нескольких состояний, связанных с CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, как описано в настоящем документе), предназначены для применения в качестве лекарственного средства. Состояния, связанные с CD19, могут включать, без ограничения, состояния, которые вызваны, включают, включают симптомы, возникающие полностью или частично в результате или, как известно, возникающие в связи с экспрессией CD19.

**[0183]** В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение агента, который специфически связывает CD19 (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе, или его фрагмент). Рак представляет собой широкую группу различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и также могут метастазировать в отдаленные части тела по лимфатической системе или кровотоку. В некоторых вариантах осуществления «рак» или «раковая ткань» включает солидную опухоль. Примеры рака, который можно лечить посредством способов по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, рак иммунной системы, включая лимфому, лейкоз, миелому и другие злокачественные лейкоцитарные заболевания. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой В-клеточную лимфому.

**[0184]** В некоторых вариантах осуществления В-клеточная лимфома выбрана из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), СПИД-ассоциированной лимфомы, ALK-положительной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, лимфомы Беркитта, хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), классической лимфомы Ходжкина, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВКЛ), фолликулярной лимфомы, внутрисосудистой крупноклеточной В-клеточной лимфоме, крупноклеточной В-клеточной

лимфомы, возникающей при мультицентрической болезни Кастанелана, ассоциированной с HHV8, лимфоматоидного гранулематоза, лимфоплазмочитарной лимфомы, лимфомы мантийных клеток (ЛМК), В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы лимфатической ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (ЛТАС), узловой В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (УЛМЗ), лимфомы Ходжкина с преобладанием узловых лимфоцитов, неходжкинской лимфомы, плазмобластной лимфомы, первичной лимфомы центральной нервной системы, первичной выпотной лимфомы, лимфомы маргинальной зоны селезенки (ЛМЗС) и макроглобулинемии Вальденстрема. В некоторых вариантах осуществления В-клеточная лимфома выбрана из группы, состоящей из острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ), хронического лимфолейкоза (ХЛЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВКЛ), фолликулярной лимфомы, лимфомы мантийных клеток (ЛМК), В-клеточной лимфомы маргинальной зоны (ЛМЗ), лимфомы лимфатической ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (ЛТАС) и неходжкинской лимфомы. В некоторых вариантах осуществления В-клеточная лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому.

**[0185]** В различных вариантах осуществления введение антитела или его фрагмента, описанного в настоящем документе (например, антитела к CD19, описанного в настоящем документе, или его фрагмента), приводит к снижению распространенности, частоты, уровня и/или количества одного или нескольких симптомов или биомаркеров состояния, связанного с CD19, как описано в настоящем документе или иным образом известно в данной области техники, например, снижение по меньшей мере на 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или 100% одного или нескольких симптомов или биомаркеров по сравнению с предыдущим измерением у субъекта или с эталонным значением.

**[0186]** В некоторых вариантах осуществления введение антитела или его фрагмента, описанного в настоящем документе (например, антитела к CD19, описанного в настоящем документе), субъекту, страдающему раком, приводит к большему уменьшению или улучшению одного или нескольких симптомов или биомаркеров рака, чем эталонное антитело, например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание CD19 в сопоставимых условиях.

**[0187]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, как описано в настоящем документе), проявляет пониженную эффективную дозу по сравнению с эталонным белком (например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19). Например,

эффективная доза антитела к CD19, как описано в настоящем документе, может составлять, например, менее 1000 мг/дозу, например, менее 900 мг/дозу, 800 мг/дозу, 700 мг/дозу, 600 мг/дозу, 500 мг/дозу, 550 мг/дозу, 400 мг/дозу, 350 мг/дозу, 300 мг/дозу, 200 мг/дозу, 100 мг/дозу, 50 мг/дозу, 25 мг/дозу или менее. В некоторых случаях эффективная доза антитела к CD19, как описано в настоящем документе, ниже, чем эффективная, рекомендуемая или утвержденная доза эталонного антитела, причем эта доза эталонного антитела может составлять, например, 900 мг/дозу или 600 мг/дозу. В качестве альтернативы или в сочетании с дозировкой, описанной в настоящем документе, антитело к CD19, описанное в настоящем документе, можно эффективно или с пользой вводить с частотой реже одного раза в неделю, например, реже одного раза в неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 7 недель, 8 недель, 9 недель, 10 недель, 11 недель, 12 недель, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев или год. В некоторых случаях эффективная или полезная частота введения антитела к CD19, как описано в настоящем документе, ниже, чем эффективная, рекомендуемая или одобренная частота введения эталонного антитела, при этом частота введения может быть еженедельной (например, в дозе 300-600 мг, в зависимости от массы субъекта) или каждые две недели (например, в дозе 300-1200 мг, в зависимости от массы субъекта).

**[0188]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), можно вводить в уменьшенной дозе по сравнению с эталонным белком, например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19, в то время как достижение равного, равноэффективного, сравнительно эффективного или существенно эффективного результата, когда антитело к CD19 вводят в идентичном, эквивалентном или практически эквивалентном составе и/или с помощью идентичного, эквивалентного или практически эквивалентного способа введения, что и эталонное (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание CD19). В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, можно вводить с увеличенным интервалом по сравнению с эталонным антителом (например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19), в то время как достижение равного, равноэффективного, сравнительно эффективного или существенно эффективного результата, когда антитело к CD19 вводят в идентичном, эквивалентном или практически эквивалентном составе и/или с помощью идентичного, эквивалентного или практически эквивалентного способа введения, что и эталонное. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, можно вводить в меньшем количестве разовых доз и/или в течение меньшего периода лечения по сравнению

с эталонным антителом, в то время как достижение равного, равноэффективного, сравнительно эффективного или существенно эффективного результата, когда антитело к CD19 вводят в идентичном, эквивалентном или практически эквивалентном составе и/или с помощью идентичного, эквивалентного или практически эквивалентного способа введения, что и эталонное (например, антитело, которое перекрестно конкурирует за связывание CD19).

**[0189]** В соответствии с некоторыми такими вариантами осуществления введенная доза антитела к CD19, описанного в настоящем документе, может с меньшей вероятностью вызывать неблагоприятный ответ при введении субъекту, например, неблагоприятный иммунный ответ, чем эффективная доза эталонного антитела, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19. Соответственно, в различных вариантах осуществления антитело к CD19, как описано в настоящем документе, может с меньшей вероятностью, чем эталонное антитело, на введенную единицу активности вызвать неблагоприятную реакцию или побочный эффект. В различных вариантах осуществления описанное в настоящем документе антитело к CD19 может с меньшей вероятностью, чем эталонное антитело, на введенную единицу активности вызвать неблагоприятную реакцию или побочный эффект, имеющий определенную степень тяжести. В различных вариантах осуществления описанное в настоящем документе антитело к CD19 может вызывать одну или несколько неблагоприятных реакций или побочных эффектов в меньшей степени или у меньшего числа пациентов, чем эталонное антитело, на введенную единицу активности. Примеры неблагоприятных реакций или побочных эффектов, которые могут быть связаны с введением антитела, способного связывать CD19, могут включать головную боль, назофарингит, боль в спине, тошноту, диарею, гипертонию, инфекцию верхних дыхательных путей, боль в животе, рвоту, анемию, кашель, периферические отеки и/или инфекции мочевыводящих путей.

**[0190]** В некоторых вариантах осуществления при введении субъекту (например, в виде разовой дозы), антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), измеряют на повышенном уровне в плазме в определенное время после введения (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) по сравнению с уровнем контроля в то же определенное время (например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19). Например, в определенное время после введения разовой дозы уровень антитела к CD19, описанного в настоящем документе, составляет по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% выше, чем соответствующий уровень

эталонного антитела.

**[0191]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), измеряют на повышенном уровне в плазме в определенное время (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) после введения (например, разовой дозы) по сравнению с уровнем контроля в то же определенное время. Например, в определенное время после введения уровень антитела к CD19, описанного в настоящем документе, составляет по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% или 500% выше, чем соответствующий уровень эталонного антитела.

**[0192]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, имеет увеличенный период полужизни (например, по сравнению с контролем, например, эталонным антителом, например, антителом, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19), и, таким образом, антитело к CD19 можно вводить субъекту с увеличенными интервалами между дозами. Например, антитело к CD19 можно вводить один раз в неделю, каждые две недели, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые 6 недель, каждые 8 недель или дольше.

**[0193]** В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество антитела или его фрагмента, описанного в настоящем документе (например, антитела к CD19, описанного в настоящем документе), составляет примерно 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% от эффективного количества эталонного терапевтического белка, например, антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19). В некоторых вариантах осуществления разовая доза антитела к CD19, описанного в настоящем документе, обеспечивает сравнимый терапевтический эффект с двумя или более дозами эталонного антитела.

**[0194]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), вводят в дозе, которая составляет около 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% от концентрации целевого антигена (например, CD19) у субъекта.

**[0195]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), могут быть физически введены субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники.

Типичные способы введения раскрытых в данном документе составов включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. В контексте настоящего документа фраза «парентеральное введение» означает режимы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включают, но не ограничиваясь ими, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления состав вводят непарентеральным путем, включая местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или большего количества продолжительных периодов.

**[0196]** В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), можно использовать в ряде диагностических и терапевтических применений. Например, детектируемо-меченые версии сконструированных антител, как описано в настоящем документе, можно использовать в анализах для обнаружения присутствия или количества CD19 в образце (например, биологическом образце). Описанные в данном документе сконструированные антитела можно использовать в анализах *in vitro* для изучения связывания с CD19. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19, описанное в настоящем документе, можно использовать в качестве положительного контроля в анализе, предназначенном для выявления дополнительных новых соединений, которые в остальном пригодны для лечения расстройств, связанных с CD19. Например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе, можно использовать в качестве положительного контроля в анализе для идентификации дополнительных соединений (например, низкомолекулярных соединений, аптамеров или антител), которые связываются с CD19.

**[0197]** Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, можно использовать для наблюдения за субъектом, например, субъектом, имеющим, подозреваемым в наличии, подверженным риску развития или находящимся на

лечении одного или нескольких состояний, связанных с CD19. Мониторинг может включать определение количества или активности CD19 у субъекта, например, в сыворотке субъекта. В некоторых вариантах осуществления оценку проводят не менее одного (1) часа, например, не менее 2, 4, 6, 8, 12, 24 или 48 часов, или не менее 1 дня, 2 дней, 4 дней, 10 дней, 13 дней, 20 дней или более, или по меньшей мере 1 неделю, 2 недели, 4 недели, 10 недель, 13 недель, 20 недель или более после введения антитела к CD19, как описано в настоящем документе. Субъекта можно оценивать в один или несколько из следующих периодов: до начала лечения; во время лечения; или после введения одного или нескольких элементов лечения. Оценка может включать оценку необходимости дальнейшего лечения, например, оценку необходимости изменения дозировки, частоты введения или продолжительности лечения. Это также может включать оценку необходимости добавления или исключения выбранного терапевтического воздействия, например, добавления или исключения любого из описанных в данном документе способов лечения расстройства, связанного с CD19.

### **Составы и введение**

**[0198]** В различных вариантах осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), могут быть включены в фармацевтическую композицию. Такая фармацевтическая композиция может быть применима, например, для профилактики и/или лечения заболеваний, например, расстройства, связанного с CD19. Фармацевтические композиции могут быть приготовлены способами, известными специалистам в данной области (например, описанными в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1985)).

**[0199]** Подходящее средство введения может быть выбрано в зависимости от возраста и состояния субъекта. Разовая доза фармацевтической композиции, содержащей антитело или его фрагмент, описанные в настоящем документе (например, антитело к CD19, описанное в настоящем документе), может быть выбрана из диапазона от 0,001 до 1000 мг/кг массы тела. С другой стороны, доза может быть выбрана в диапазоне от 0,001 до 100000 мг/кг массы тела, но настоящее изобретение не ограничивается такими диапазонами. Доза и способ введения варьируются в зависимости от массы тела, возраста, состояния и т.п. пациента и могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области техники.

**[0200]** В различных вариантах осуществления можно составить фармацевтическую

композицию, включающую фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и т. п., которые являются физиологически совместимыми. Композиции по данному изобретению могут включать фармацевтически приемлемую соль, например, соль присоединения кислоты или соль присоединения основания.

**[0201]** В различных вариантах осуществления композиция, содержащая описанное в данном документе анти тело, например, стерильный состав для инъекций, может быть составлена в соответствии с традиционной фармацевтической практикой с использованием дистиллированной воды для инъекций в качестве носителя. Например, физиологический раствор или изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие добавки, такие как D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия, можно использовать в качестве водного раствора для инъекций, необязательно в комбинации с подходящим солюбилизующим агентом, например, спиртом, таким как этанол, и полиспиртом, таким как пропиленгликоль или полиэтиленгликоль, и неионогенным поверхностно-активным веществом, таким как полисорбат 80™, HCO-50 и т. п.

**[0202]** Как описано в данном документе, фармацевтическая композиция может находиться в любой форме, известной в данной области техники. Такие формы включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории.

**[0203]** Выбор или применение любой конкретной формы может частично зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Например, композиции, содержащие композицию, предназначенную для системной или местной доставки, могут быть в форме растворов для инъекций или инфузий. Соответственно, композиции могут быть составлены для введения парентеральным способом (например, внутривенной, подкожной, внутрибрюшинной или внутримышечной инъекцией). В контексте данного документа парентеральное введение относится к способам введения, отличным от энтерального и местного, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, интраназальную, интраокулярную, легочную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, интракардиальную, интрадермальную, внутрилегочную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную,

субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную, интрацеребральную, интракраниальную, интракаротидную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

**[0204]** Путь введения может представлять собой парентеральным, например, введение путем инъекции, трансназальное введение, транспульмональное введение или чрескожное введение. Введение может быть системным или местным, осуществляемым путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, внутривентрикулярной инъекции, подкожной инъекции.

**[0205]** В различных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для стабильного хранения при высокой концентрации. Стерильные растворы для инъекций могут быть изготовлены путем включения композиции, описанной в данном документе, в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. В общем случае дисперсии готовят путем включения композиции, описанной в данном документе, в стерильную несущую среду, которая содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для изготовления стерильных растворов для инъекций, способы изготовления включают вакуумную сушку и сублимационную сушку, которая приводит к получению порошка композиции, описанной в данном документе, плюс любого дополнительного необходимого ингредиента (смотрите ниже) из предварительно стерильно профильтрованного раствора. Надлежащую текучесть раствора можно поддерживать, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание инъекционных композиций можно обеспечить путем включения в композицию реагента, который замедляет всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

**[0206]** Фармацевтическую композицию можно вводить парентерально в форме инъекционной композиции, содержащей стерильный раствор или суспензию в воде или другой фармацевтически приемлемой жидкости. Например, фармацевтическая композиция может быть составлена путем подходящего объединения терапевтической молекулы с фармацевтически приемлемыми носителями или средами, такими как стерильная вода и физиологический раствор, растительное масло, эмульгатор, суспендирующий агент,

поверхностно-активное вещество, стабилизатор, ароматизирующий эксципиент, разбавитель, носитель, консервант, связующее вещество, с последующим смешиванием в форме единичной дозы, необходимой в рамках общепринятой фармацевтической практики. Количество фармацевтической композиции, включенной в фармацевтические препараты, является таким, чтобы обеспечить подходящую дозу в указанном диапазоне. Неограничивающие примеры масляной жидкости включают кунжутное масло и соевое масло, которые можно комбинировать с бензилбензоатом или бензиловым спиртом в качестве солюбилизующего агента. Другие элементы, которые могут быть включены в состав, включают буфер, такой как фосфатный буфер или буфер на основе ацетата натрия, успокаивающий агент, такой как гидрохлорид прокаина, стабилизатор, такой как бензиловый спирт или фенол, и антиоксидант. Состав для инъекций может быть упакован в подходящую ампулу.

**[0207]** В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена для хранения при температуре ниже 0°C (например, -20°C или -80°C). В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена для хранения до 2 лет (например, в течение одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев, шести месяцев, семи месяцев, восьми месяцев, девяти месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 1 года, 11/2 года или 2 лет) при 2–8°C (например, 4°C). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе композиции стабильны при хранении в течение по меньшей мере 1 года при 2-8°C (например, 4°C).

**[0208]** В конкретных случаях фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде раствора. В некоторых вариантах осуществления композиция может быть составлена, например, в виде забуференного раствора подходящей концентрации и подходящего для хранения при 2-8°C (например, 4°C).

**[0209]** Композиции, включающие одно или несколько сконструированных антител, как описано в настоящем документе, могут быть включены в состав иммунолипосомных композиций. Такие составы могут быть приготовлены способами, известными в данной области. Липосомы с увеличенным временем циркуляции раскрыты, например, в патенте США № 5013556.

**[0210]** В определенных вариантах осуществления композиции могут быть составлены с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, таким как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая

кислота, коллаген, сложные полиортоэфиры и полимолочная кислота. Многие методы приготовления таких составов известны в данной области. См., например, J. R. Robinson (1978) "*Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*," Marcel Dekker, Inc., New York.

**[0211]** В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены в виде композиции, подходящей для внутрилегочного введения (например, для введения через ингалятор или небулайзер) млекопитающему, такому как человек. Способы составления таких композиций хорошо известны в данной области. Составы для ингаляторов сухого порошка и подходящие системы для введения составов также известны в данной области. Легочное введение может быть пероральным и/или назальным. Примеры фармацевтических устройств для доставки в легкие включают дозирующие ингаляторы, ингаляторы сухого порошка (DPI — англ.: dry powder inhaler) и небулайзеры. Например, описанная в данном документе композиция может быть введена в легкие субъекта с помощью ингалятора сухого порошка. Эти ингаляторы представляют собой устройства без пропеллента, которые доставляют диспергируемые и стабильные сухие порошковые композиции в легкие. Ингаляторы сухого порошка хорошо известны в области медицины и включают, без ограничения: TURBOHALER® (AstraZeneca; Лондон, Англия), ингалятор AIR® (ALKERMES®; Кембридж, штат Массачусетс); ROTALHALER® (GlaxoSmithKline; Лондон, Англия); и ECLIPSE™ (Sanofi-Aventis; Париж, Франция). См. также, например, публикации РСТ № WO 04/026380, WO 04/024156 и WO 01/78693. Устройства DPI использовались для легочного введения полипептидов, таких как инсулин и гормон роста. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе композиция может вводиться внутрилегочно с помощью ингалятора с отмеренной дозой. В этих ингаляторах для доставки дискретной дозы соединения в легкие используется пропеллент. Дополнительные устройства и способы внутрилегочного введения изложены, например, в публикациях патентных заявок США №№ 20 050 271 660 и 20 090 110 679, раскрытия каждого из которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

**[0212]** В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены для доставки в глаз, например, в форме фармацевтически приемлемого раствора, суспензии или мази. Препарат для лечения глаз может быть в форме стерильного водного раствора, содержащего, например, дополнительные ингредиенты, такие как, помимо прочего, консерванты, буферы, тонизирующие агенты, антиоксиданты и стабилизаторы, неионные смачивающие или осветляющие агенты и агенты, повышающие вязкость. Препарат, описанный в данном документе, можно вводить местно в глаз субъекта, нуждающегося в

лечении (например, субъекта, страдающего ВМД), обычными способами, например, в форме капель или ванночек для глаз с применением терапевтического раствора, содержащего одну или более композиций.

**[0213]** В определенных вариантах осуществления для введения композиции, описанной в данном документе, могут подходить различные устройства для введения лекарственных средств в витреальную полость глаза. Например, в публикации США № 2002/0026176 описан obturator слезного канальца, содержащий фармацевтический препарат, который можно вводить через склеру таким образом, чтобы он выступала в полость стекловидного тела и доставлял фармацевтический препарат в полость стекловидного тела. В другом примере в патенте США № 5443505 описано имплантируемое устройство для введения в супрахориоидальное пространство или бессосудистую область для замедленного высвобождения лекарственного средства во внутренние структуры глаза. Каждый из патентов США №№ 5 773 019 и 6 001 386 раскрывает имплантируемое устройство для доставки лекарственного средства, прикрепляемое к склеральной поверхности глаза. Дополнительные способы и устройства (например, транссклеральный пластырь и доставка через контактные линзы) для доставки терапевтического средства в глаз описаны, например, у Ambati and Adamis (2002) *Prog Retin Eye Res* 21(2):145-151; Ranta and Urtili (2006) *Adv Drug Delivery Rev* 58(11):1164-1181; Barocas and Balachandran (2008) *Expert Opin Drug Delivery* 5(1):1-10(10); Gulsen and Chauhan (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2342-2347; Kim et al. (2007) *Ophthalmic Res* 39:244-254; и в публикации PCT № WO 04/073551, описания которых полностью включены в данный документ посредством ссылки.

**[0214]** В некоторых вариантах осуществления введение антитела, как описано в настоящем документе, достигается путем введения субъекту нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Нуклеиновые кислоты, кодирующие терапевтическое антитело, описанное в настоящем документе, могут быть включены в генную конструкцию для использования в качестве части протокола генной терапии для доставки нуклеиновых кислот, которые можно использовать для экспрессии и продукции антитела внутри клеток. Конструкции экспрессии таких компонентов можно вводить в любом терапевтически эффективном носителе, например любом составе или композиции, способных эффективно доставлять компонентный ген в клетки *in vivo*. Подходы включают вставку рассматриваемого гена в вирусные векторы, включая рекомбинантные ретровирусы, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, лентивирусы и вирус простого герпеса-1 (HSV-1), или рекомбинантные бактериальные или эукариотические плазмиды. Вирусные

векторы могут напрямую трансфицировать клетки; плазмидная ДНК может быть доставлена с помощью, например, катионных липосом (липофектин) или дериватизированных, полилизинных конъюгатов, грамицидина S, искусственных вирусных оболочек или других подобных внутриклеточных носителей, а также прямого введения генной конструкции или преципитации CaPO<sub>4</sub> (см., например, WO04/060407). Примеры подходящих ретровирусов включают pLJ, pZIP, pWE и pEM, которые известны специалистам в данной области техники (см., например, Eglitis et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc Natl Acad Sci USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J Immunol* 150:4104-4115; патенты США №№ 4868116 и 4980286; и публикации PCT №№ WO89/07136, WO89/02468, WO89/05345 и WO92/07573). В другой системе доставки вирусного гена используют векторы, полученные из аденовируса (см., например, Berkner et al. (1988) *BioTechniques* 6:616; Rosenfeld et al. (1991) *Science* 252:431-434 и Rosenfeld et al. (1992) *Cell* 68:143-155). Подходящие аденовирусные векторы, полученные из штамма аденовируса Ad типа 5 dl324 или других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т. д.), известны специалистам в данной области техники. Еще одной вирусной векторной системой, пригодной для доставки гена субъекта, является аденоассоциированный вирус (AAV). См., например, Flotte et al. (1992) *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:349-356; Samulski et al. (1989) *J Virol* 63:3822-3828 и McLaughlin et al. (1989) *J Virol* 62:1963-1973.

**[0215]** В различных вариантах осуществления подкожное введение может осуществляться с помощью устройства, такого как шприц, предварительно заполненный шприц, автоинжектор (например, одноразовый или многоразовый), шприц-ручка, пластыревый инжектор, портативный инжектор, амбулаторный шприцевой инфузионный насос с наборами для подкожной инфузии или другого устройства для комбинирования с антителом для подкожной инъекции.

**[0216]** В инъекционной системе по настоящему изобретению может использоваться ручка для доставки, как описано в патенте США № 5308341. Шприц-ручка, наиболее часто используемые для самостоятельной доставки инсулина пациентам с диабетом, хорошо известны в данной области техники. Такие устройства могут содержать по меньшей мере одну инъекционную иглу (например, иглу 31-го размера длиной от 5 до 8 мм), обычно

предварительно заполненную одной или несколькими терапевтическими разовыми дозами терапевтического раствора, и их можно использовать для быстрой доставки раствора к субъекту с минимально возможной болью. Одна ручка для доставки лекарств включает в себя держатель флакона, в который может быть помещен флакон с терапевтическим или другим лекарством. Ручка может быть полностью механическим устройством или может быть объединена с электронной схемой для точной установки и/или индикации дозировки лекарства, вводимого пользователю. См., например, патент США № 6192891. В некоторых вариантах осуществления игла шприц-ручки является одноразовой, и наборы включают одну или несколько сменных игл одноразового использования. Шприц-ручки, подходящие для доставки любой из представленных композиций, также описаны, например, в патенте США №№ 6277099; 6200296 и 6146361, описание каждого из которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки. Шприц-ручка на основе микроиглы описана, например, в патенте США № 7556615, описание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылки. См. также устройство Precision Pen Injector (PPI), MOLLY™, производства компании Scandinavian Health Ltd.

**[0217]** В некоторых вариантах осуществления композиция, описанная в настоящем документе, может быть терапевтически доставлена субъекту посредством местного введения. В контексте данного документа термины «местное введение» или «местная доставка» могут относиться к доставке, которая не зависит от переноса композиции или агента в предполагаемые целевые ткани или участок через сосудистую систему. Например, композицию можно доставлять путем инъекции или имплантации композиции или агента или путем инъекции или имплантации устройства, содержащего композицию или агент. В определенных вариантах осуществления после местного введения вблизи целевых тканей или участка композиция или агент, или один или более из их компонентов, могут диффундировать к предполагаемым целевым тканям или участку, которые не являются местом введения.

**[0218]** В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе композиции представлены в виде единичной лекарственной формы, причем единичная лекарственная форма может подходить для самостоятельного введения. Такая единичная лекарственная форма может поставляться в контейнере, как правило, например, во флаконе, картридже, предварительно заполненном шприце или одноразовом шприце-ручке. Дозатор, такой как дозирующее устройство, описанное в патенте США №№ 6302855, также может быть использован, например, с системой инъекции, как описано в данном документе.

**[0219]** Подходящая доза композиции, описанной в данном документе, которая

способна лечить или предотвращать расстройство у субъекта, может зависеть от множества факторов, включая, например, возраст, пол и массу тела субъекта, подлежащего лечению, и конкретное используемое соединение-ингибитор. Например, для лечения субъекта с расстройством, связанным с CD19, может потребоваться другая доза одной композиции, включающей антитело, как описано в настоящем документе, по сравнению с дозой другого состава этого антитела. Другие факторы, влияющие на дозу, вводимую субъекту, включают, например, тип или тяжесть расстройства. Например, субъекту с одним расстройством, связанным с CD19, может потребоваться введение другой дозы, чем субъекту с другим расстройством, связанным с CD19. Другие факторы могут включать, например, другие медицинские расстройства, одновременно или ранее поражающие субъекта, общее состояние здоровья субъекта, генетическую предрасположенность субъекта, рацион питания, время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных препаратов и любых других дополнительных терапевтических средств, которые вводятся субъекту. Также следует понимать, что конкретная дозировка и схема лечения для любого конкретного субъекта также могут быть скорректированы на основании заключения лечащего врача.

**[0220]** Композицию, описанную в данном документе, можно вводить в виде фиксированной дозы или в дозе миллиграмм на килограмм (мг/кг). В некоторых вариантах осуществления доза также может быть выбрана для снижения или предотвращения выработки антител или других иммунных ответов хозяина против одного или нескольких антител или их антигенсвязывающих фрагментов в композиции. Хотя это никоим образом не предназначено для ограничения, примерные дозы антитела, такого как композиция, описанная в настоящем документе, включают, например, 1-1000 мг/кг, 1-100 мг/кг, 0,5-50 мг/кг, 0,1-100 мг/кг, 0,5-25 мг/кг, 1-20 мг/кг и 1-10 мг/кг. Примеры дозировок описанной в данном документе композиции включают, без ограничения, 0,1 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1,0 мг/кг, 2,0 мг/кг, 4 мг/кг, 8 мг/кг или 20 мг/кг.

**[0221]** Фармацевтический раствор может содержать терапевтически эффективное количество описанной в данном документе композиции. Специалист в данной области техники может легко определить такие эффективные количества, частично на основании эффекта вводимой композиции или комбинированного эффекта композиции и одного или более дополнительных активных агентов, если используют более одного агента. Терапевтически эффективное количество композиции, описанной в настоящем документе, также может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние болезни, возраст, пол и вес индивидуума, а также способности композиции (и одного или нескольких

дополнительных активных агентов) вызывать желаемый ответ у индивидуума, например, улучшение по меньшей мере одного параметра состояния, например, улучшение по меньшей мере одного симптома расстройства, связанного с CD19. Например, терапевтически эффективное количество композиции, описанной в настоящем документе, может ингибировать (уменьшать тяжесть или устранять возникновение) и/или предотвращать конкретное расстройство и/или любой из симптомов конкретного расстройства, известных в данной области, или описанного в данном документе. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты композиции перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

**[0222]** Подходящие для человека дозы любой из композиций, описанных в настоящем документе, могут быть дополнительно оценены, например, в исследованиях фазы I с повышением дозы. См., например, van Gurp et al. (2008) *Am J Transplantation* 8(8):1711-1718; Hanouska et al. (2007) *Clin Cancer Res* 13(2, part 1):523-531 и Hetherington et al. (2006) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(10): 3499-3500.

**[0223]** Токсичность и терапевтическую эффективность композиций можно определить с помощью известных фармацевтических процедур в клеточных культурах или на экспериментальных животных (например, на животных моделях любых расстройств, связанных с CD19). Эти процедуры можно использовать, например, для определения LD<sub>50</sub> (доза, смертельная для 50% популяции) и ED<sub>50</sub> (терапевтически эффективная доза для 50% популяции). Дозовое соотношение между токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс и может быть выражено как соотношение LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Композиция, описанная в данном документе, которая демонстрирует высокий терапевтический индекс, является предпочтительной. Хотя можно использовать композиции, которые проявляют токсические побочные эффекты, следует позаботиться о разработке системы доставки, которая нацеливает такие соединения на участок пораженной ткани и сводит к минимуму потенциальное повреждение нормальных клеток и, таким образом, уменьшает побочные эффекты.

**[0224]** Специалистам в данной области техники будет понятно, что данные, полученные в результате анализов клеточных культур и исследований на животных, могут быть использованы для определения диапазона дозировок для применения у людей. Соответствующие дозировки композиций, описанных в настоящем документе, обычно находятся в диапазоне циркулирующих концентраций композиций, которые включают ED<sub>50</sub> с небольшой токсичностью или без нее. Дозировка может варьироваться в пределах

этого диапазона в зависимости от применяемой дозированной формы и используемого пути введения. Для композиции, описанной в настоящем документе, терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена на основе анализов клеточных культур. Доза может быть составлена в животных моделях для достижения диапазона циркулирующей плазменной концентрации, который включает  $I_0$  (т. е. концентрацию антитела, которая обеспечивает полумаксимальное ингибирование симптомов), определенную в клеточной культуре. Такую информацию можно использовать для более точного определения доз, пригодных для людей. Уровни в плазме могут быть измерены, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В некоторых вариантах осуществления, например, когда желательна местное введение (например, в глаз или сустав), можно использовать клеточную культуру или моделирование на животных для определения дозы, необходимой для достижения терапевтически эффективной концентрации в локальном участке.

### **Комбинированная терапия**

**[0225]** В различных вариантах осуществления антитело к CD19, как описано в настоящем документе, может быть включено в курс лечения, который дополнительно включает введение субъекту по меньшей мере одного дополнительного агента. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом к CD19, как описано в настоящем документе, может представлять собой химиотерапевтический агент. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом, как описано в настоящем документе, может представлять собой агент, ингибирующее воспаление.

**[0226]** В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) со специфичностью в отношении CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления scFv к CD19 может быть конъюгирован (например, связан) с терапевтическим агентом (например, химиотерапевтическим агентом и радиоактивным атомом) для связывания с раковой клеткой, доставки терапевтического агента в раковую клетку и уничтожения раковой клеткой, которая экспрессирует CD19 человека. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD19 связано с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, цитокин, радиоактивный атом, миРНК или токсин. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления агент

представляет собой радиоактивный атом.

**[0227]** В некоторых вариантах осуществления способы можно применять в сочетании с другими видами терапии расстройств, связанных с CD19. Например, композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после химиотерапии. В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить субъекту одновременно, до или после метода адоптивной терапии.

**[0228]** В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом к CD19, как описано в настоящем документе, можно вводить одновременно с антителом к CD19, в тот же день, что и антитело к CD19, или в ту же неделю, что и антитело к CD19. В различных вариантах осуществления дополнительный агент, вводимый в комбинации с антителом к CD19, как описано в настоящем документе, может вводиться в одном составе с антителом к CD19. В некоторых вариантах осуществления дополнительный агент вводят способом, временно отделенным от введения антитела к CD19, как описано в настоящем документе, например, за один или несколько часов до или после, за один или несколько дней до или после, за одну или несколько недель до или после или за один или несколько месяцев до или после введения антитела к CD19. В различных вариантах осуществления частота введения одного или нескольких дополнительных агентов может быть такой же, аналогичной или отличной от частоты введения антитела к CD19, как описано в настоящем документе.

**[0229]** В состав комбинированной терапии входит схема лечения, включающая введение двух различных антител, как описано в настоящем документе, и/или схема лечения, включающая введение антитела, как описано в настоящем документе, в виде множества составов и/или способов введения.

**[0230]** В некоторых вариантах осуществления композиции могут быть составлены с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, например, дополнительными терапевтическими средствами для лечения или профилактики расстройства, связанного с CD19 (например, рака или аутоиммунного расстройства), у субъекта. Дополнительные агенты для лечения расстройства, связанного с CD19, у субъекта будут варьироваться в зависимости от конкретного расстройства, которое лечат, но могут включать, помимо прочего, ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин, винкристин, преднизолон, осфамид, карбоплатин, этопозид, дексаметазон, цитарабин, цисплатин, циклофосфамид или флударабин.

**[0231]** Композиция, описанная в настоящем документе, может заменить или

дополнить ранее или в настоящее время применяемую терапию. Например, при лечении композицией, описанной в настоящем документе, введение одного или нескольких дополнительных активных агентов может быть прекращено или уменьшено, например, может быть введено при более низких уровнях, например, при более низких уровнях эталонного антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с CD19, после введения антитела к CD19, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления можно поддерживать предыдущую терапию. В некоторых вариантах осуществления предыдущую терапию будут поддерживать до тех пор, пока уровень композиции не достигнет уровня, достаточного для обеспечения терапевтического эффекта. Эти две терапии можно применять в комбинации.

### ***Рекомбинантная генная технология***

**[0232]** В соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы традиционные методы молекулярной биологии, микробиологии и рекомбинантной ДНК, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы описаны в литературе (см., *например*, Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; *DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II* (D. N. Glover ed. 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed. 1984); *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)); *Transcription And Translation* (B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)); *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. (1986)); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986)); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F. M. Ausubel *et al.* (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

**[0233]** Рекомбинантная экспрессия гена, такого как нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, такой как антитело к CD19, описанное в настоящем документе, может включать конструирование вектора экспрессии, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид. После получения полинуклеотида вектор для продукции полипептида может быть получен с помощью технологии рекомбинантной ДНК с использованием методов, известных в данной области техники. Известные способы можно использовать для конструирования векторов экспрессии, содержащих последовательности, кодирующие полипептид, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают, например, методы рекомбинантной ДНК *in vitro*, синтетические методы и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

**[0234]** Вектор экспрессии может быть перенесен в клетку-хозяин обычными методами, а затем трансфицированные клетки могут быть культивированы обычными методами для получения полипептидов.

**[0235]** Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылки, упомянутые в данном документе, полностью включены посредством ссылки. Кроме того, материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не носят ограничительного характера. Если не указано иное, все употребляемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается рядовым специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, можно использовать на практике или при тестировании данного изобретения, подходящие способы и материалы описаны в данном документе.

## **ПРИМЕРЫ**

**[0236]** В следующих примерах описываются некоторые из предпочтительных способов получения и применения настоящего изобретения. Однако следует понимать, что эти примеры предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема изобретения.

### Пример 1. Идентификация и характеристика антител к CD19

**[0237]** Данный пример демонстрирует характеристики антител к CD19. Антитела человека к CD19 были получены из дрожжей Adimab и продуцированы ими. Антигены биотинилировали с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Thermo Scientific, кат. № 21425). Антигены концентрировали до около 1 мг/мл и буфер заменяли на ФСБ перед добавлением реагента для биотинилирования в молярном соотношении 1:7,5. Смесь выдерживали при 4°C в течение ночи перед очередной заменой буфера для удаления свободного биотина из раствора. Биотинилирование было подтверждено посредством связывания стрептавидинового сенсора с мечеными белками на ForteBio.

**[0238]** Восемь наивных синтетических дрожжевых библиотек человека, каждая из которых содержит  $\sim 10^9$  вариантов, размножали, как описано ранее (см., например, Y. Xu et al, PDS 26(10), 663-70 (2013); WO2009036379; WO2010105256 и WO2012009568).

**[0239]** Для первых двух раундов отбора была выполнена методика магнитной сортировки гранул с использованием системы Miltenyi MACS, как описано ранее (см.,

например, Siegel et al, J Immunol Methods 286(1-2), 141-153 (2004).) Вкратце, дрожжевые клетки (~ 10<sup>10</sup> клеток/библиотеку) инкубировали с биотинилированным антигеном в течение 30 минут при 30°C в промывочном буфере (фосфатно-солевой буфер (ФСБ)/0,1% бычий сывороточный альбумин (БСА)). После однократного промывания 40 мл ледяного промывочного буфера осадок клеток ресуспендировали в 20 мл промывочного буфера, к дрожжам добавляли стрептавидиновые микрогранулы (500 мкл) и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Затем дрожжи осаждали, ресуспендировали в 5 мл промывочного буфера и наносили на колонку Miltenyi LS. После загрузки 5 мл на колонку, ее промывали 3 раза 3 мл промывочного буфера. Колонку затем удаляли из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл питательной среды и затем выращивали в течение ночи.

**[0240]** Третий раунд отбора проводили с использованием проточной цитометрии (FACS). Приблизительно 2×10<sup>7</sup> дрожжей осаждали, трижды промывали промывочным буфером и инкубировали при 30°C с 100-200 нМ биотинилированного антигена в равновесных условиях. Четвертый и пятый раунды отбора проводили путем инкубации биотинилированных клеток NALM-6 и Raji с отобранными дрожжами, полученными из FACS раунда 3. После инкубации предварительно промытые стрептавидиновые гранулы Dynabeads M-280 (кат. № 60210) добавляли к комплексам дрожжи/клетки млекопитающих и инкубировали. Далее комплексы разделяли с помощью магнита DynaMag-2 и удаляли несвязывающиеся супернатанты. Комплексы гранула/клетка трижды промывали 1 мл селективного буфера. Затем захваченные комплексы переносили в колбы, содержащие среду для роста дрожжей, для размножения. В шестом раунде отбора размноженные дрожжи подвергали либо дополнительному раунду отбора клеток NALM-6/Raji, либо отбору с использованием 100 нМ рекомбинантного антигена CD19, либо отрицательному отбору с помощью полиспецифического реагента (ПСП) для удаления неспецифических антител.

**[0241]** Для истощения ПСП библиотеки инкубировали с разведением 1:10 биотинилированного реагента ПСП, как описано ранее (см., например, Y. Xu et al, PEDS 26(10), 663-70 (2013).) Затем дрожжи дважды промывали промывочным буфером и окрашивали вторичными реагентами, козьим F(ab')<sub>2</sub> антителом к человеческому каппа-FITC (LC-FITC), разбавленным 1:100 (Southern Biotech, кат. № 2062-02), и либо стрептавидином-AF633 (SA -633), разбавленный 1:500 (Life Technologies, кат № S21375), либо экстравидином-фикоэртирином (EA-PE), разбавленным 1:50 (Sigma-Aldrich, кат № E4011), в течение 15 мин при 4°C. После двукратной промывки ледяным промывочным буфером осадки клеток ресуспендировали в 0,3 мл промывочного буфера и переносили в

сортирующие пробирки с сетчатыми крышками. Сортировку проводили с использованием сортировщика FACS ARIA (BD Biosciences) и определяли сортировочные интервалы для отбора антител с желаемыми характеристиками. Отборочные раунды повторяли до тех пор, пока не была получена популяция со всеми желаемыми характеристиками. После последнего раунда сортировки дрожжи высевали и отбирали отдельные колонии для характеристики.

#### Диверсификация легких цепей

**[0242]** Тяжелые цепи из наивного продукта использовали для приготовления библиотек диверсификации легких цепей, используемых для дополнительных раундов отбора. Плазмиды, кодирующие тяжелые цепи, экстрагировали из дрожжей, размножали и затем очищали от *E. coli* и трансформировали в библиотеку легких цепей с количеством вариантов  $5 \times 10^6$ . Отборы этих библиотек проводили, как описано выше, т. е. с помощью одного раунда MACS, двух раундов отбора клеток либо с клетками Raji, либо с клетками NALM-6 с последующим четвертым раундом отбора FACS с использованием рекомбинантного антигена CD19. В отношении диверсификации легких цепей отборы клеток Raji и NALM-6 включали первоначальный отрицательный отбор со сконструированными клетками Raji и NALM-6, которые подверглись целенаправленному генетическому нокауту гена CD19. После истощения нокаутными клетками CD19 проводили положительный отбор с использованием сконструированных клеток Raji и NALM-6, которые экспрессировали и сверхэкспрессировали эндогенный CD19. В различных раундах отбора FACS библиотеки оценивали на связывание ПСР (полиспецифический реагент), перекрестную реактивность видов и давление аффинности путем титрования антигена. Сортировка проводилась для получения популяции с желаемыми характеристиками. Отдельные колонии из каждого раунда отбора FACS, описанного выше, отбирали для секвенирования и характеристики.

#### Получение и очистка антител

**[0243]** Клоны дрожжей выращивали до насыщения и затем индуцировали в течение 48 ч при 30°C при встряхивании. После индукции дрожжевые клетки осаждали и супернатанты собирали для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0.

#### Измерения K<sub>d</sub> с использованием ForteBio

**[0244]** Эти антитела к CD19 тестировали на их аффинность связывания с

растворимым CD19 в системе ForteBio Octet (как правило Octet RED384, как описано ранее (см., например, Estep et al., *Mabs* 5(2), 270-278 (2013)). Вкратце, измерения аффинности с использованием ForteBio выполняли путем загрузки IgG в оперативном режиме на сенсоры АНС. Антитела были иммобилизованы на штифтах с антителами к IgG человека и связаны с растворимым слитым белком CD19-HSA (внеклеточные домены CD19, слитые с сывороточным альбумином человека). Сенсоры уравнивали в автономном режиме в буфере для анализа в течение 30 минут, а затем контролировали в оперативном режиме в течение 60 секунд для установления исходного уровня. Сенсоры с нагруженными IgG подвергали воздействию 100 нМ растворимого антигена слитого белка CD19-HSA в течение 3 минут, а затем переносили в буфер для анализа на 3 минуты для измерения скорости диссоциации. Все кинетические характеристики анализировали с использованием модели связывания 1:1. Краткая информация о кинетике связывания представлена в Таблице 3. Аффинность иллюстративных антител находится в диапазоне от 8 нМ до 20 нМ.  $\nu$ H всех антител к CD19, показанных в Таблице 3, включают последовательность  $\nu$ H SEQ ID NO: 5.

**Таблица 3. Кинетика связывания антител к CD19**

Антитело к CD19	$\nu$ L SEQ ID NO	IgG $K_D$ (M) моновалент.	$k_{on}$ (1/Mc)	$k_{off}$ (1/c)
Антитело 2	20	9,01E-09	6,15E+04	5,54E-04
Антитело 4	21	9,27E-09	2,35E+04	2,18E-04
Антитело 5	22	1,04E-08	7,56E+04	7,85E-04
Антитело 8	23	8,22E-09	5,52E+04	4,54E-04
Антитело 6	24	6,40E-09	7,56E+04	4,84E-04
Антитело 7	25	1,49E-08	7,00E+04	1,05E-03
Антитело 1	26	3,29E-08	5,34E+04	1,76E-03
Антитело 15	27	2,08E-08	6,98E+04	1,45E-03

Пример 2. Связывание антител к CD19 на клетке

[0245] Связывание антител к CD19 на клетках оценивали с помощью проточной цитометрии на эндогенных CD19-экспрессирующих клеточных линиях Raji и NALM-6. Каждое антитело тестировали как на CD19-положительных родительских линиях, так и на соответствующих CD19-нокаутных линиях Raji и NALM-6 для подтверждения специфического связывания на клетке-мишени. Хроматограммы проточной цитометрии,

показанные на Фиг. 1, демонстрируют 1-2 логарифмических сдвига на CD19-положительных линиях по сравнению с фоновым связыванием на соответствующих нокаутных клеточных линиях.

**[0246]** Результаты проточной цитометрии с серийными разведениями, показанные на Фиг. 2A-2C, демонстрируют насыщение связывания с клетками NALM-6. Значения EC50, рассчитанные по кривым, представлены в Таблице 4. Типичные антитела к CD19 связывают CD19-положительные клетки NALM-6 с высокой аффинностью по меньшей мере от 0,2 нМ. Более высокая аффинность, наблюдаемая на CD19-положительных клетках по сравнению с растворимым белком, позволяет предположить, что эти антитела связывают эпитоп, который может быть более естественно представлен на клетках, чем в слитом белке CD19-HSA.

**Таблица 4. EC50 антител к CD19 на клетках NALM6**

Антитело к CD19	vL SEQ ID NO	Аффинность связывания на клетке NALM-6, EC50 (нМ)
Антитело 2	20	0,3136
Антитело 4	21	0,5195
Антитело 5	22	0,2192
Антитело 8	23	0,2097
Антитело 6	24	0,1798
Антитело 7	25	0,2104
Антитело 1	26	0,5879
Антитело 15	27	0,2698

Пример 3. Биннинг эпитопов путем перекрестной конкуренции

**[0247]** Анализ биннинга эпитопов путем перекрестной конкуренции проводили, чтобы определить, связывается ли какое-либо из антител к CD19 с уникальным, неконкурирующим эпитопом эталонного антитела к CD19, денинтузумаба. Биннинг эпитопа/блокирование лигандов проводили с использованием сэндвич-анализа перекрестного блокирования. Контрольный анти-целевой IgG загружали на датчики АНQ, и незанятые Fc-связывающие сайты на датчике блокировали нерелевантным антителом IgG1 человека. Затем сенсоры подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена, а затем второго антитела или лиганда к мишени. Дополнительное связывание вторым антителом или лигандом после ассоциации антигена указывает на незанятый эпитоп (не конкурент), в то время как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент или блокирование лиганда).

**[0248]** Эталонное контрольное антитело к CD19, денинтузумаб, было захвачено на штифтах с антителом к IgG человека, а затем загружено растворимым CD19 в жидкой фазе. Вместо выполнения стадии диссоциации выполняли вторую загрузку каждым из тестируемых антител. Те антитела, которые связываются с неконкурирующим эпитопом денинтузумаба, будут отражать новое событие связывания в следе, в то время как антитела с тем же эпитопом блокируются денинтузумабом, что отражается однородным следом. Результаты, представленные на Фиг. 3, демонстрируют, что каждое из антител связывает эпитопы, конкурирующие с денинтузумабом. Эти результаты предполагают, что антитела связывают аналогичный эпитоп на CD19, который конкурирует с эталонным антителом к CD19, денинтузумабом.

#### Пример 4. Характеристика связывания CD19 scFv к CD19

**[0249]** Относительную конкуренцию за общий эпитоп оценивали в анализе ППР Biacore. В этом анализе scFv, содержащий vH и vL антитела 2 к CD19 (SEQ ID NO: 42), оценивали на предмет относительного конкурентного связывания со связующим CD19-T2, SJ25c1 и FMC63 (от «Tisagenlecleucel» Kymriah и «Axicabtagene ciloleucel» Yescarta). scFv антитела 2 был иммобилизован на чипе Biacore CM5, который затем был связан смесью 100 нМ CD19-HSA-his и титрованием каждого конкурентного scFv (0, 50 нМ, 100 нМ, 200 нМ и 800 нМ). После 3-минутной стадии конкурентного связывания проводили 5-минутную диссоциацию в буфере HBS-EP (300 мМ NaCl).

**[0250]** scFv антитела 1 к CD19 конкурирует со всеми эталонными антителами в этом анализе (данные не показаны). scFv FMC63 полностью конкурирует за связывание с CD19

даже при самой низкой концентрации (50 нМ). Анализ был повторен для включения 25 нМ, где сохранялась небольшая степень связывания с CD19, что позволяет предположить, что эти антитела связывают CD19 с аналогичной, но несколько более высокой аффинностью, чем scFv SJ25C1. Эти данные свидетельствуют о том, что все протестированные связующие вещества конкурируют за связывание с перекрывающимся эпитопом на CD19.

**[0251]** Для дальнейшей оценки способности антител к CD19 связывать неспецифические мембранные белки, scFv, полученные из антител к CD19, описанных в настоящем документе, оценивали в анализе с поверхностными мембранными белками (ПМБ). Анализ ПМБ представляет собой анализ на основе ИФА с клеточными мембранами НЕК-293 человека или SF9 насекомых, нанесенными на планшет, для проверки неспецифического связывания с этими мембранами тестируемых антител. Подобно анализу ППР, были включены внутренние контрольные антитела с высоким и низким неспецифическим связыванием (контроль с высоким неспецифическим связыванием, sc209, и контроль с низким неспецифическим связыванием, 5f9). Полученные результаты согласуются с описанным выше ППР-анализом с низкой активностью связывания антител к CD19 либо на мембранах НЕК-293, либо на мембранах SF9.

### **Другие варианты осуществления**

**[0252]** Хотя в данном документе описано несколько вариантов осуществления настоящего изобретения, настоящее описание и примеры могут быть изменены для предоставления других способов и композиций данного изобретения. Поэтому следует понимать, что объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения в дополнение к конкретным вариантам осуществления, которые были представлены в качестве примера. Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены в настоящий документ посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:  
последовательности определяющей комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3).
2. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:  
варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).
3. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:  
варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).
4. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:  
варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).
5. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:  
варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).
6. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:  
варибельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

7. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPFT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).
8. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).
9. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, дополнительно содержащие:

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).
10. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие  
вариабельную область легкой цепи ( $V_L$ ) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 20; и  
и вариабельную область цепи (тяжелой  $V_H$ ) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5.
11. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

вариабельную область легкой цепи ( $V_L$ ) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 20-27; и  
и вариабельную область цепи (тяжелой  $V_H$ ) иммуноглобулина, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 5.
12. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по пп. 1-11, отличающееся тем, что область  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере

мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 20-27.

13. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, отличающееся тем, что область  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 20-27.
14. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что область  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 5.
15. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что область  $V_H$  содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 5.
16. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что область  $V_L$  содержит аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 20-27, а область  $V_H$  идентична SEQ ID NO: 5.
17. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из антитела IgA, антитела IgG, антитела IgE, антитела IgM, би- или мультиспецифического антитела, Fab-фрагмента, Fab'-фрагмента, F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента, Fd'-фрагмента, Fd-фрагмента, изолированных CDR или их наборов; одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), слитого полипептид-Fc, однодоменного антитела, антитела верблюдовых; маскированного антитела, малое модульное иммунофармацевтическое средство («SMIPs™»), одноцепочечного антитела, тандемного диатела, VHH, антикалина, нанотела, минител, BiTE, белка с анкириновыми повторами, DARPIN, авимера, DART, ТКР-подобного антитела, аднектина, аффилина, транс-тела; аффитела, TrimerX, микропротеина, финомера, центирина и KALBITOR.

18. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).
19. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой антитело, содержащее константную область IgG.
20. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент представляет собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).
21. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 20, отличающиеся тем, что scFv к CD19 содержит линкерную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 36-39.
22. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 20 или 21, отличающиеся тем, что scFv к CD19 содержит сигнальный пептид, выбранный из SEQ ID NO: 40 или 41.
23. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент связывает CD19 с  $K_D$  от около 8 наномоль (нМ) до около 242 нМ.
24. Антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающиеся тем, что указанное антитело или его фрагмент связывает CD19 на клетках-мишенях с  $EC_{50}$  от около 0,1 нМ до около 2,7 нМ.
25. Способ лечения рака, включающий введение антитела к CD19 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из предыдущих пунктов субъекту, нуждающемуся в лечении.
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что рак выбран из лейкоза, лимфомы или миеломы.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент содержит:
- вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3).
28. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит
- вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).
29. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит
- вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).
30. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит
- вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).
31. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит
- вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPTYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).
32. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит
- вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей

комплементарность области (CDR) RASQSVRSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

33. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPFT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).

34. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).

35. Фармацевтическая композиция по п. 27, отличающаяся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).

36. Способ лечения рака, включающий введение антитела к CD19 или его антигенсвязывающего фрагмента субъекту, нуждающемуся в лечении, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) SYGMH (SEQ ID NO: 1) (HCDR1), LIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 2) (HCDR2) и PVEGLLRGFDY (SEQ ID NO: 3) (HCDR3).

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGAVPIT (SEQ ID NO: 12) (LCDR3).

38. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQVDSLHPFT (SEQ ID NO: 13) (LCDR3).

39. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPPLT (SEQ ID NO: 14) (LCDR3).

40. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQLFDSPTYT (SEQ ID NO: 15) (LCDR3).

41. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVRSSSYLA (SEQ ID NO: 8) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGVPPLT (SEQ ID NO: 16) (LCDR3).

42. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASSRAT (SEQ ID NO: 9) (LCDR2) и QQAGGVPFPT (SEQ ID NO: 17) (LCDR3).

43. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

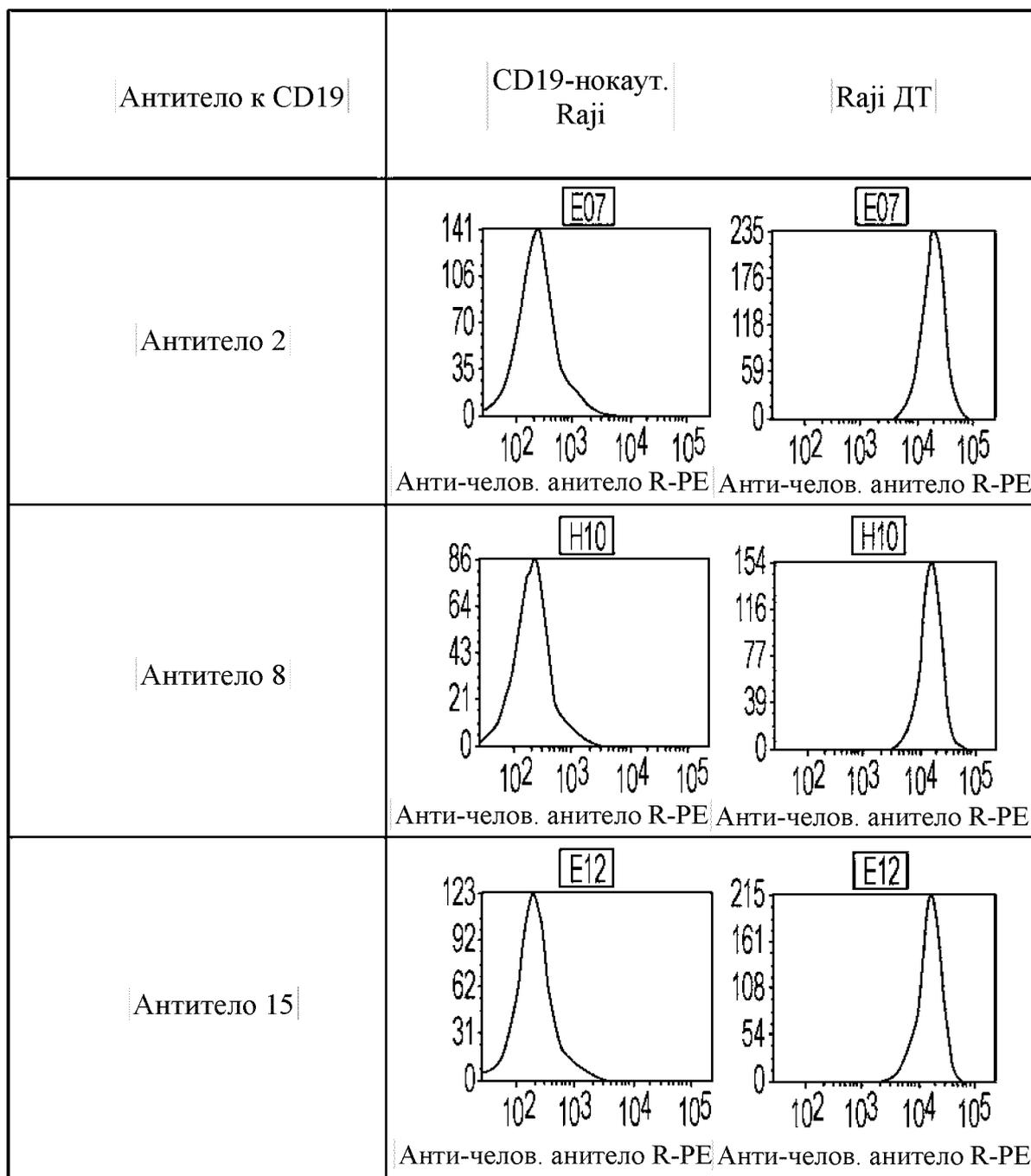
вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASNRAT (SEQ ID NO: 10) (LCDR2) и QQAGVFPFT (SEQ ID NO: 18) (LCDR3).

44. Способ по п. 36, отличающийся тем, что антитело к CD19 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержит

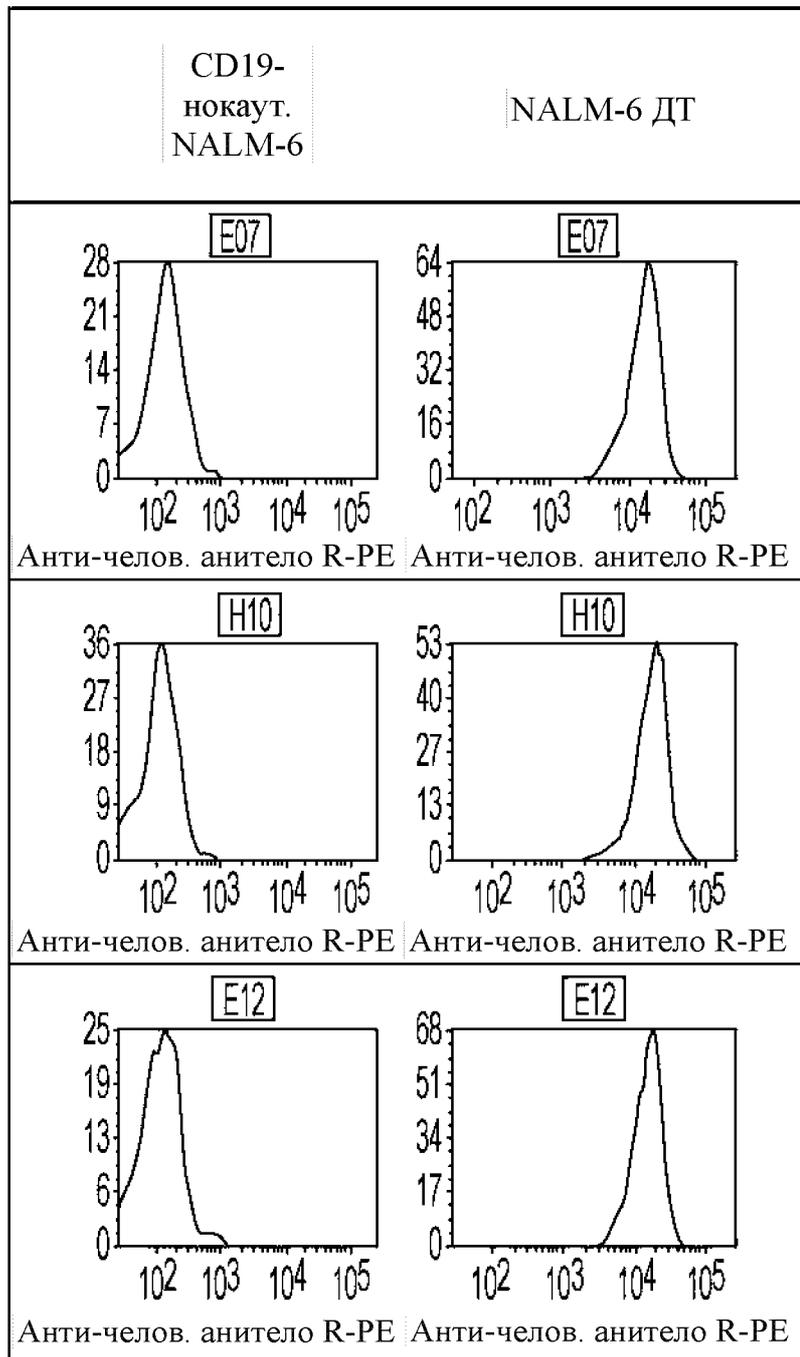
вариабельную область легкой цепи с последовательностями определяющей

комплементарность области (CDR) RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 7) (LCDR1), GASRRAT (SEQ ID NO: 11) (LCDR2) и QQAGIPPYT (SEQ ID NO: 19) (LCDR3).

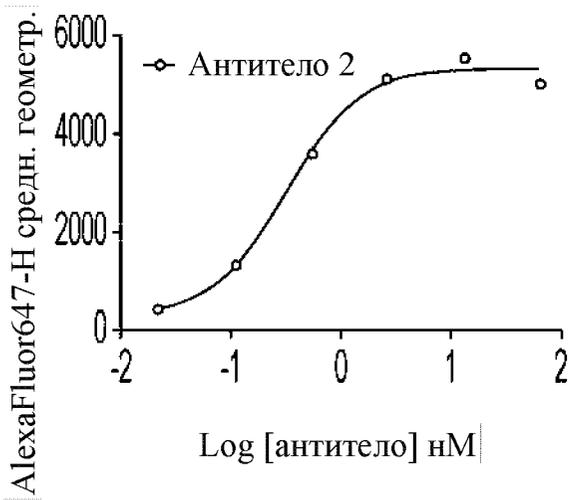
45. Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90 % идентичную SEQ ID NO: 5.
46. Нуклеиновая кислота, кодирующая аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную любой из SEQ ID NO:20-27.
47. Вектор, содержащий выделенную последовательность нуклеиновой кислоты по любому из пп. 45 или 46.
48. Выделенная клетка, содержащая вектор по п. 47.



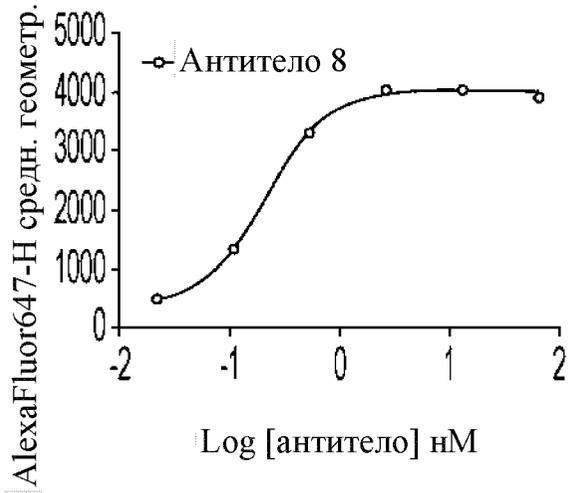
ФИГ. 1



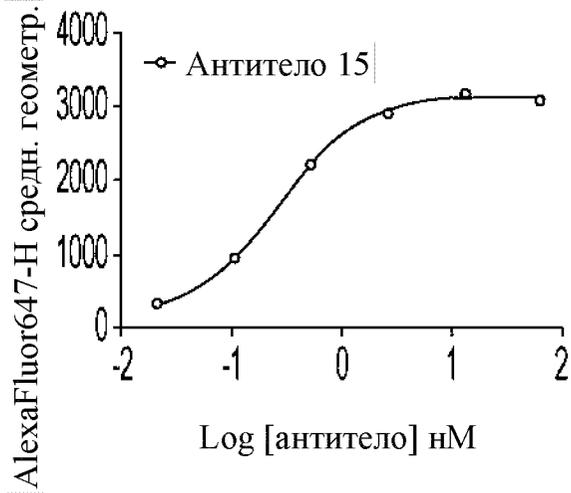
ФИГ. 1 ПРОДОЛЖ.



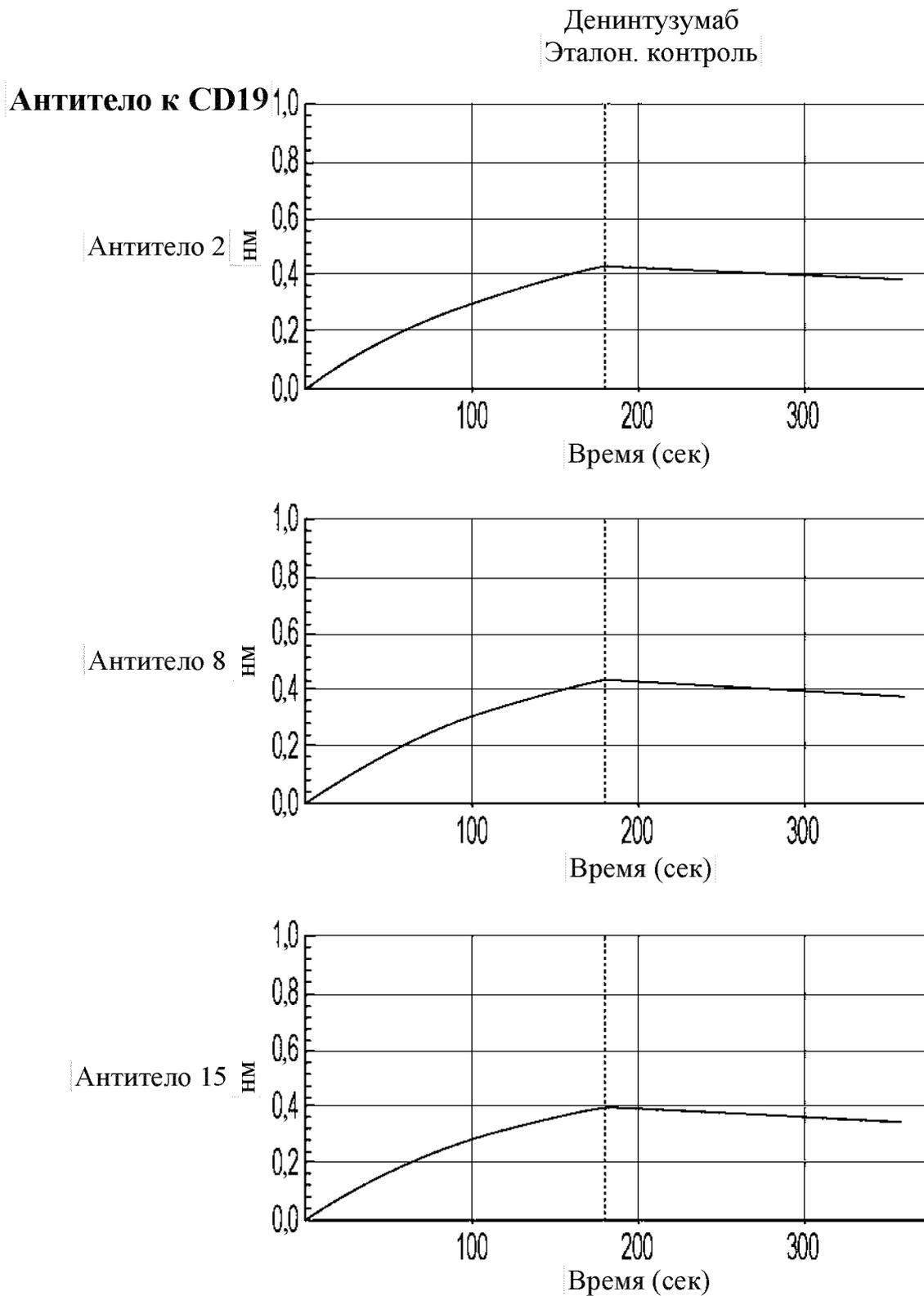
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В



ФИГ. 2С



ФИГ. 3