

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202390087** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.31

(22) Дата подачи заявки
2018.09.20

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2023.01)
C07K 16/46 (2023.01)
A61K 47/68 (2023.01)
A61K 47/55 (2023.01)
A61K 39/395 (2023.01)
C12N 15/13 (2023.01)
C12N 15/63 (2023.01)
G01N 33/53 (2023.01)
A61P 35/00 (2023.01)

(54) **НОВЫЕ АНТИ-CD3ЭПСИЛОН АНТИТЕЛА**

(31) **PCT/CN2017/102622**

(32) **2017.09.21**

(33) **CN**

(62) **202090800; 2018.09.20**

(71) Заявитель:
**УСИ БАЙОЛОДЖИКС АЭЛЭНД
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:
Ли Цзин, Мей Цинь (CN)

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

(57) Представлены выделенные моноклональные анти-CD3эпсилон антитела или их антиген-связывающие фрагменты, включающие одну или несколько последовательностей CDR тяжелой цепи, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 и 47, и/или одну или несколько последовательностей CDR легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 48. Также представлены кодирующие их выделенные полинуклеотиды, включающие их фармацевтические композиции и их применение.

A1

202390087

202390087

A1

НОВЫЕ АНТИ-CD3ЭПСИЛОН АНТИТЕЛА

Область, к которой относится изобретение

[0001] Настоящее изобретение, в основном, относится к новым антителам против CD3эпсилон человека.

Предпосылки создания изобретения

[0002] CD3 (дифференцировочный кластер 3) Т-клеточный корецептор представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех отдельных цепей, CD3гамма цепи, CD3дельта цепи и двух CD3эпсилон цепей. Эти цепи связываются с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR), и зета-цепью для генерирования сигнала активации в Т-лимфоцитах. Молекулы TCR, зета-цепи и CD3 вместе образуют TCR комплекс, в котором TCR в качестве субъединицы распознает антиген и связывается с ним, а CD3 в качестве субъединицы переносит и передает антиген-стимуляцию сигнальному пути и в конечном счете регулирует Т-клеточную активность. Белок CD3 присутствует практически во всех Т-клетках.

[0003] CD3 вместе с TCR образует CD3-TCR комплекс, который играет ключевую роль в модуляции широких функций Т-клеток как во врожденном, так и в адаптивном иммунном ответе, а также клеточных и гуморальных иммунных функций. Они включают элиминацию патогенных организмов и контроль роста опухоли посредством широкого ряда цитотоксических эффектов.

[0004] Мышиные моноклональные антитела, специфические в отношении человеческого CD3, такие как ОКТ3 (Kung et al. (1979) Science 206: 347-9), были первым поколением антител к CD3 для лечения. Хотя ОКТ3 обладает сильной иммуносупрессорной активностью, его клиническому применению препятствовали серьезные побочные эффекты, связанные с его иммуногенным и митогенным потенциалом (Chatenoud (2003) Nature Reviews 3:123-132). ОКТ3 индуцировал антиглобулиновый ответ, промотируя свой собственный быстрый клиренс и нейтрализацию (Chatenoud et al. (1982) Eur. J. Immunol. 137:830-8). Кроме того, ОКТ3 индуцировал Т-клеточную пролиферацию и продукцию цитокинов *in vitro* и приводил к крупномасштабному высвобождению цитокинов *in vivo* (Hirsch et al. (1989) J. Immunol 142: 737-43, 1989). Высвобождение цитокинов (также называемое “цитокиновым штормом”), в свою очередь, приводит к “гриппоподобному” синдрому, характеризующемуся лихорадкой, ознобом, головной болью, тошнотой, рвотой, диареей, респираторному дистресс-синдрому, септическому менингиту и гипотензии (Chatenoud, 2003). Такие серьезные побочные эффекты ограничивали более широкое применение ОКТ3 в трансплантации, а также расширение его применения в других клинических областях, таких как аутоиммунные заболевания (Id.).

[0005] Существует огромная потребность в новых анти-CD3 антителах.

Сущность изобретения

[0004] Единственное и множественное число используются для обозначения одного или более одного (т.е. по меньшей мере одного) объекта. Например, “антитело” означает одно антитело или более чем одно антитело.

[0005] Настоящее изобретение относится к новым моноклональным анти-CD3ε антителам, их аминокислотным и нуклеотидным последовательностям и их применению.

[0006] В одном аспекте настоящее изобретение представляет выделенные антитела или их антиген-связывающие фрагменты, включающие 1, 2 или 3 последовательности CDR тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 и 47, и/или 1, 2 или 3 последовательности CDR каппа-легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 48.

[0007] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают 1, 2 или 3 последовательности CDR тяжелой цепи, имеющие по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 или 47. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают 1, 2 или 3 последовательности CDR легкой цепи, имеющие по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 или 48.

[0008] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

a) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5;

b) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11;

c) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17;

d) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23;

e) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 29;

f) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35;

g) переменной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41; and

h) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47.

[0009] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают вариабельную область каппа-легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

a) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6;

b) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12;

c) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и/или SEQ ID NO: 18;

d) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24;

e) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30;

f) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36;

g) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42; and

h) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48.

[00010] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 и 47.

[00011] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают:

a) последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 43;

b) последовательность CDR2 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 45; and

c) последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 47.

[00012] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают:

a) последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 2, SEQ ID

NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 44;

b) последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 46; and

c) последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 48.

[00013] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают:

a) последовательность CDR1 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 43;

b) последовательность CDR2 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 45;

c) последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 41 и SEQ ID NO: 47;

d) последовательность CDR1 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 44;

e) последовательность CDR2 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 46; and

f) последовательность CDR3 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 42 и SEQ ID NO: 48.

[00014] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают:

a) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6;

b) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12;

c) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17;

и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18;

d) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24;

e) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 29; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30;

f) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36;

g) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42; or

h) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48.

[00015] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты также включают 1, 2, 3 или 4 последовательности каркасной области (FR) тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 73, 75, 77 и 79, и/или 1, 2, 3 или 4 последовательности каркасной области (FR) легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO: 58, 60, 62, 64, 74, 76, 78 и 80.

[00016] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты также включают последовательность FR1 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 57 и 73; последовательность FR2 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 59 и 75; последовательность FR3 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 61 и 77; и последовательность FR4 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 63 и 79.

[00017] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты также включают последовательность FR1 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 58 и 74; последовательность FR2 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 60 и 76; последовательность FR3 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 62 и 78; и последовательность FR4 легкой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 64 и 80.

[00018] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93,

SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117 и гомологичной им последовательности, имеющей по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[00019] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 и гомологичной им последовательности, имеющей по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности.

[00020] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают всю или часть последовательности переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113 и 117; и/или всю или часть последовательности переменной области легкой цепи, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115 и 119. В одном варианте осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты представляют собой однодоменное антитело, которое состоит из всей или части переменной области тяжелой цепи, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113 и 117.

[00021] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты включают:

- a) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 81, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 83;
- b) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 85, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 87;
- c) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 89, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 91;
- d) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 93, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 95;
- e) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 97, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 99;
- f) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 101, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 103;
- g) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 105, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 107;
- h) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 109, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 111;
- i) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 113, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 115; или

j) вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 117, и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 119.

[00022] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает одну или несколько замен аминокислотных остатков, но при этом сохраняет специфическое сродство к связыванию с CD3ε.

[00023] В некоторых вариантах осуществления замена присутствует в одной или нескольких последовательностях CDR или в одной или нескольких последовательностях FR, или в одной или обеих последовательностях вариабельных областей, или в Fc области. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (или все) из замен в последовательностях CDR, последовательностях FR, последовательностях вариабельных областей или Fc области представляет собой консервативную замену.

[00024] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислотных остатков в одной или нескольких последовательностях CDR, выбранных из SEQ ID NO: 1-48. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислотных остатков в одной или нескольких последовательностях FR, выбранных из SEQ ID NO: 57-80. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен в целом в последовательностях CDR и/или последовательностях FR последовательностей вариабельной области тяжелой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113 и 117. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислотных остатков во всех FR последовательностей вариабельной области легкой цепи, выбранных из SEQ ID NO: 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 115 и 119.

[00025] В некоторых вариантах осуществления замена придает одно или несколько желаемых свойств, выбранных из следующих: а) улучшение аффинности связывания с CD3ε, б) введение или удаление сайта гликозилирования, в) введение свободного цистеинового остатка, г) усиление или уменьшение ADCC или CDC, д) увеличение периода полужизни в сыворотке; и е) повышение связывания FcRn.

[00026] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент также включает константную область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает константную область IgG. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает константную область человеческого IgG1.

[00027] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты представляют собой мышинное антитело или гуманизированное антитело.

[00028] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты представляют собой камелизированное однодоменное антитело,

диатело, scFv, scFv димер, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, биспецифическое антитело, ds диатело, нанотело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

[00029] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты являются биспецифическими. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент имеет первую антигенную специфичность в отношении CD3эпсилон и вторую антигенную специфичность. В некоторых вариантах осуществления вторая антигенность направлена против второго антигена, отличного от CD3эпсилон, где присутствие второго антигена вблизи CD3эпсилон-экспрессирующих Т-клеток желательно для того, чтобы второй антиген распознавался иммунной системой. В некоторых вариантах осуществления первая антигенная специфичность направлена против CD3эпсилон, а вторая антигенная специфичность направлена против опухоль-ассоциированного антигена.

[00030] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты связаны с одним или несколькими конъюгатами. В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой химиотерапевтическое средство, токсин, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку или метку фермент-субстрат.

[00031] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент способно специфически связываться с CD3эпсилон. В некоторых вариантах осуществления CD3эпсилон происходят из организма мыши, крысы, обезьяны или человека. В некоторых вариантах осуществления CD3эпсилон представляет собой рекомбинантный CD3эпсилон или CD3эпсилон, экспрессируемый на клеточной поверхности.

[00032] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты способны специфически связываться с CD3эпсилон человека, экспрессируемым на клеточной поверхности, при K_D значении не более чем $5 \times 10^{-9} M$, не более чем $4 \times 10^{-9} M$, не более чем $3 \times 10^{-9} M$, не более чем $2 \times 10^{-9} M$, не более чем $10^{-9} M$, не более чем $5 \times 10^{-10} M$, не более чем $4 \times 10^{-10} M$, не более чем $3 \times 10^{-10} M$, не более чем $2 \times 10^{-10} M$, не более чем $10^{-10} M$, не более чем $5 \times 10^{-11} M$, не более чем $4 \times 10^{-11} M$, не более чем $3 \times 10^{-11} M$, не более чем $2 \times 10^{-11} M$ или не более чем $10^{-11} M$, как измерено методом проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты способны специфически связываться с CD3эпсилон человека, экспрессируемым поверхности клеток, при EC_{50} не более чем 0,50 нМ или не более чем 1,10 нМ, как определено методом проточной цитометрии.

[00033] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты способны специфически связываться с рекомбинантным CD3эпсилон яванского макака с EC_{50} не более чем 0,001 нМ, не более чем 0,005 нМ, не более чем 0,01 нМ, не более чем 0,02 нМ, не более чем 0,03 нМ, не более чем 0,04 нМ или не более чем 0,05 нМ, как измерено методом ELISA.

[00034] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты способны специфически связываться с рекомбинантным CD3эпсилон человека при EC_{50} не более чем 0,01 нМ, не более чем 0,02 нМ, не более чем 0,03 нМ, не более чем 0,04 нМ, не более чем 0,05 нМ, не более чем 0,06 нМ, не более чем 0,07 нМ или не более чем 0,08 нМ, как измерено методом ELISA.

[00035] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты способны специфически связываться с CD3эпсилон человека, экспрессируемым на поверхности CD3-экспрессирующих клеток, при EC_{50} не более чем 0,5 нМ, не более чем 0,6 нМ, не более чем 0,7 нМ, не более чем 0,8 нМ, не более чем 0,9 нМ, не более чем 1 нМ, не более чем 2 нМ, не более чем 3 нМ, не более чем 4 нМ, не более чем 5 нМ, не более чем 6 нМ, не более чем 7 нМ, не более чем 8 нМ, не более чем 9 нМ или не более чем 10 нМ, как измерено методом проточной цитометрии.

[00036] В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты представляют собой гуманизованное антитело, которое способно специфически связываться с CD3эпсилон человека, экспрессируемым на поверхности CD4-экспрессирующих клеток, при EC_{50} не более чем 0,50 нМ или не более чем 1,10 нМ, как измерено методом проточной цитометрии.

[00037] В одном аспекте настоящее изобретение представляет антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое конкурирует за один и тот же эпитоп с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке.

[00038] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет фармацевтическую композицию, включающую антитело или его антиген-связывающий фрагмент, представленное в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция также включает второе средство, которое способно усиливать терапевтический эффект антитела или его антиген-связывающего фрагмента и/или способно уменьшать побочный эффект антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

[00039] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, представленные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления выделенный полинуклеотид включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 и 120.

[00040] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет вектор, включающий указанный выделенный полинуклеотид.

[00041] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет клетку-хозяина, включающую указанный вектор.

[00042] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ экспрессии антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему

изобретению, включающий культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, при которых экспрессируется указанный полинуклеотид.

[00043] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ лечения заболевания или состояния у индивида, которому может быть полезна модуляция активности CD3ε, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции, представленной в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления указанный индивид представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание или состояние представляет собой CD3-связанное заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления указанное заболевание или состояние представляет собой рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

[00044] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ активации CD3ε-экспрессирующих Т-клеток *in vivo* или *in vitro*, включающий контактирование CD3ε-экспрессирующих Т-клеток с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке.

[00045] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ модуляции активности CD3 в CD3ε-экспрессирующей клетке, включающей воздействие антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, на CD3ε-экспрессирующую клетку.

[00046] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ промотирования *in vivo* или *in vitro* процессинга второго антигена CD3ε-экспрессирующими Т-клетками, включающий контактирование CD3ε-экспрессирующих Т-клеток с биспецифическим антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке, где биспецифическое антитело или антиген-связывающий фрагмент способны специфически связываться как с CD3ε-экспрессирующими Т-клетками, так и с вторым антигеном, приводя их таким образом в непосредственную близость.

[00047] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ детекции присутствия или количества CD3ε в образце, включающий контактирование образца с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке, и определение присутствия или количества CD3ε в образце.

[00048] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет способ диагностики CD3-связанного заболевания или состояния у индивида, включающий: а) получение образца от индивида; б) контактирование образца с антителами или их антиген-связывающими фрагментами, представленными в настоящей заявке; с) определение присутствия или количества CD3ε в образце; и d) соотнесение присутствия или количества CD3ε с заболеванием или состоянием у индивида.

[00049] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, для получения лекарственного средства для лечения CD3-связанного заболевания или состояния у индивида.

[00050] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, для получения диагностического реагента для диагностирования CD3-связанного заболевания или состояния.

[00051] В одном аспекте настоящее изобретение также представляет набор, включающий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, представленные в настоящей заявке, полезные для детекции CD3эпсилон. В некоторых вариантах осуществления набор включает антитела или их антиген-связывающие фрагменты, полезные для детекции рекомбинантного CD3эпсилон, CD3эпсилон, экспрессируемого на клеточной поверхности, или CD3эпсилон-экспрессирующих клеток.

Краткое описание чертежей

[00052] Фиг. 1 показывает связывание моноклональных антител WBP3311_2.166.48-uIgG1K, WBP3311_2.306.4-uIgG1K и WBP3311_2.166.48 с рекомбинантным белком CD3эпсилон яванского макака, как измерено методом ELISA.

[00053] Фиг. 2 показывает связывание моноклональных антител WBP3311_2.166.48-uIgG1K, WBP3311_2.306.4-uIgG1K, WBP3311_2.166.48 и WBP3311_2.306.4 с CD4 Т-клетками человека, как измерено методом проточной цитометрии.

[00054] Фиг. 3 показывает аффинность связывания восьми мышинных антител (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.383.47, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 и W3311-2.844.8) с клетками, экспрессирующими человеческий CD3 (клетки Jurkat), как измерено методом проточной цитометрии.

[00055] Фиг. 4А показывает аффинность связывания гуманизированного антитела WBP3311_2.166.48-z1-uIgG1K с клетками, экспрессирующими человеческий CD3 (клетки Jurkat), как измерено методом проточной цитометрии.

[00056] Фиг. 4В показывает результат аффинности связывания гуманизированного антитела WBP3311_2.306.4-z1-uIgG1K с клетками, экспрессирующими человеческий CD3 (клетки Jurkat), как измерено методом проточной цитометрии.

[00057] Фиг. 4С показывает результат аффинности связывания положительного контроля ОКТ3 с клетками, экспрессирующими человеческий CD3 (клетки Jurkat), как измерено методом проточной цитометрии.

[00058] Фиг. 5 показывает процент клеточной интернализации восьми мышинных антител (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.383.47, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 и W3311-2.844.8) в клетки, экспрессирующие человеческий CD3 (клетки Jurkat), как измерено методом проточной цитометрии.

[00059] Фиг. 6 показывает результат активации Т-клеток человека восемью мышинными антителами (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.383.47, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 и W3311-2.844.8), как измерено методом внутриклеточного окрашивания цитокинов TNFальфа и IFNгамма.

[00060] Фиг. 7 показывает результат активации Т-клеток человека двумя гуманизированными антителами (WBP3311_2.166.48-z1-uIgG1K и WBP3311_2.306.4-z1-uIgG1K), как измерено методом внутриклеточного окрашивания цитокинов TNFальфа и IFNгамма.

[00061] Фиг. 8 показывает результат связывания эпитопа для семи мышинных антител (W3311-2.166.48, W3311-2.306.4, W3311-2.400.5, W3311-2.482.5, W3311-2.488.33, W3311-2.615.8 и W3311-2.844.8) против клона WBP3311_2.383.47.

Подробное описание изобретения

[00062] Следующее описание изобретения предназначено только для иллюстрации различных вариантов воплощения изобретения. По существу, обсуждаемые конкретные модификации не должны рассматриваться как ограничения объема изобретения. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что возможны различные эквиваленты, изменения и модификации без отклонения от объема изобретения, и следует понимать, что такие эквивалентные варианты осуществления должны быть включены в настоящее раскрытие. Все ссылочные документы, цитируемые в настоящей заявке, включая публикации, патенты и патентные заявки, включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей их полноте.

[00063] Определения

[00064] Термин “антитело” в контексте настоящей заявки включает любой иммуноглобулин, моноклональное антитело, поликлональное антитело, мультивалентное антитело, бивалентное антитело, моновалентное антитело, мультиспецифическое антитело или биспецифическое антитело, которое связывается с специфическим антигеном. Нативное интактное антитело включает две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи. У млекопитающих тяжелые цепи классифицируются как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области (V_H) и первой, второй и третьей константной области (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} , соответственно); легкие цепи у млекопитающих классифицируются как λ или κ , при этом каждая легкая цепь состоит из вариабельной области (V_L для λ легкой цепи или V_K для κ легкой цепи, соответственно) и константной области (C_L для λ легкой цепи или C_K для κ легкой цепи, соответственно). Антитело имеет “Y” форму, где ножка Y состоит из второй и третьей константных областей двух тяжелых цепей, связанных вместе посредством дисульфидного связывания. Каждое ответвление Y включает вариабельную область и первую константную область одной тяжелой цепи, связанные с вариабельной и константной областями одной легкой цепи. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей ответственны за связывание антигена. Вариабельные области в обеих цепях, как правило, содержат три высоковариабельные петли, называемые определяющими комплементарность областями

(CDR) (CDR легкой цепи, включающие LCDR1, LCDR2 и LCDR3, CDR тяжелой цепи, включающие HCDR1, HCDR2, HCDR3). Границы CDR для антител и антиген-связывающих фрагментов, раскрытых в настоящей заявке, можно определить или идентифицировать методами Кабата, IMGT, Чотиа или Аль-Лазикани (Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927 (1997); Chothia, C. *et al.*, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63 (1985); Chothia, C. и Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901 (1987); Chothia, C. *et al.*, Nature. Dec 21-28;342(6252):877-83 (1989); Kabat E.A. *et al.*, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Три CDR расположены между фланкирующими участками, известными как каркасные области (FR), которые более высококонсервативны, чем CDR, и образуют каркас для поддержки гипервариабельных петель. Константные области тяжелых и легких цепей не вовлечены в связывание антигена, но демонстрируют различные эффекторные функции. Антитела относят к классам на основании аминокислотной последовательности константной области их тяжелой цепи. Существует пять основных классов или изоформ антител, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, которые характеризуются присутствием альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю тяжелых цепей, соответственно. Некоторые из основных классов антител подразделяются на подклассы, такие как IgG1 (гамма1 тяжелая цепь), IgG2 (гамма2 тяжелая цепь), IgG3 (гамма3 тяжелая цепь), IgG4 (гамма4 тяжелая цепь), IgA1 (альфа1 тяжелая цепь) или IgA2 (альфа2 тяжелая цепь).

[00065] Термин “бивалентное” в контексте настоящей заявки относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту, имеющему два антиген-связывающих сайта; термин “моновалентное” относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту, имеющему только один единственный антиген-связывающий сайт; и термин “мультивалентное” относится к антителу или антиген-связывающему фрагменту, имеющему несколько антиген-связывающих сайтов. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент является бивалентным.

[00066] В контексте настоящей заявки “биспецифическое” антитело относится к искусственному антителу, которое имеет фрагменты, происходящие из двух разных моноклональных антител, и способному связываться с двумя разными эпитопами. Два эпитопа могут присутствовать на одном и том же антигене или они могут присутствовать на двух разных антигенах.

[00067] Термин “антиген-связывающий фрагмент” в контексте настоящей заявки относится к фрагменту антитела, образованному из части антитела, включающей 1, 2 или 3 CDR, или любому другому фрагменту антитела, который связывается с антигеном, но не включает интактную структуру нативного антитела. Примеры антиген-связывающего фрагмента включают, без ограничения, диатело, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv фрагмент, дисульфид-стабилизированный Fv фрагмент (dsFv), (dsFv)₂, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), дисульфид-стабилизированное диатело (ds диатело), молекулу одноцепочечного антитела (scFv), scFv димер (бивалентное диатело), биспецифическое антитело, мультиспецифическое антитело, камелизированное однодоменное антитело, нанотело,

доменное антитело и бивалентное доменное антитело. Антиген-связывающий фрагмент способен связываться с тем же антигеном, с которым связывается исходное антитело.

[00068] “Fab”, в отношении антитела, относится к той части антитела, которая состоит из (как переменной, так и константной областей) одной легкой цепи, связанной с переменной областью и первой константной областью одной тяжелой цепи дисульфидной связью.

[00069] “Fab” относится к Fab фрагменту, который включает часть шарнирной области.

[00070] “F(ab')₂” относится к димеру Fab'. “Fv”, в отношении антитела, относится к наименьшему фрагменту антитела, который может содержать полный антиген-связывающий сайт. Fv фрагмент состоит из переменной области одной легкой цепи, связанной с переменной областью одной тяжелой цепи.

[00071] “dsFv” относится к дисульфид-стабилизированному Fv фрагменту, где связь между переменной областью одной легкой цепи и переменной областью одной тяжелой цепи представляет собой дисульфидную связь. В некоторых вариантах осуществления “(dsFv)₂” или “(dsFv-dsFv)”, включает три пептидные цепи: два V_H фрагмента, связанных пептидным линкером (*например*, длинным гибким линкером) и связанных с двумя V_L фрагментами, соответственно, через дисульфидные мостики. В некоторых вариантах осуществления dsFv-dsFv' является биспецифическим, где каждая дисульфид-спаренная тяжелая и легкая цепь имеет разную антиген-специфичность.

[00072] “Одноцепочечное Fv антитело” или “scFv” относится к сконструированному антителу, состоящему из переменной области легкой цепи и переменной области тяжелой цепи, связанных друг с другом непосредственно или через пептидную линкерную последовательность (Huston JS *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)).

[00073] “Fc”, в отношении антитела, относится к той части антитела, которая состоит из второй и третьей константных областей первой тяжелой цепи, связанных с второй и третьей константными областями второй тяжелой цепи через дисульфидную связь. Fc часть антитела ответственна за различные эффекторные функции, такие как антитело-зависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность (ADCC) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC), но не за функцию связывания антигена.

[00074] “Одноцепочечное Fv-Fc антитело” или “scFv-Fc” относится к сконструированному антителу, состоящему из scFv, связанному с Fc областью антитела.

[00075] “Камелизированное однодоменное антитело”, “антитело из тяжелых цепей” или “HCAb” относится к антителу, которое содержит два V_H домена и никаких легких цепей (Riechmann L. and Muyldermans S., J Immunol Methods. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999); Muyldermans S., J Biotechnol. Jun;74(4):277-302 (2001); WO94/04678; WO94/25591; Патент США № 6,005,079). Антитела из тяжелых цепей изначально были выделены у *Camelidae* (верблюды, дромадеры и ламы). Хотя они и лишены легких цепей, камелизированные антитела имеют аутентичный антиген-связывающий репертуар (Hamers-Casterman C. *et*

al., Nature. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. *et al.* “Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation,” Immunogenetics. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. *et al.* Immunology. May; 109(1):93-101 (2003)). Варибельный домен антитела из тяжелых цепей (V_H домен) представляет собой наименьшую известную антиген-связывающую единицу, генерированную адаптивными иммунными ответами (Koch-Nolte F. *et al.*, FASEB J. Nov; 21(13):3490-8. Epub 2007 Jun 15 (2007)).

[00076] “Нанотело” относится к фрагменту антитела, который состоит из V_H домена из антитела из тяжелых цепей и двух константных доменов, C_H2 и C_H3.

[00077] “Диатела” или “dAbs” включают небольшие фрагменты антител с двумя антиген-связывающими сайтами, при этом фрагменты включают V_H домен, связанный с V_L доменом в той же самой полипептидной цепи (V_H-V_L или V_L-V_H) (см., например, Holliger P. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161). С использованием линкера, который слишком короткий для возможности спаривания между двумя доменами в одной и той же цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи, создавая таким образом два антиген-связывающих сайта. Антиген-связывающие сайты могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены (или эпитопы). В некоторых вариантах осуществления “биспецифическое ds диатело” представляет собой диатело, нацеленное на два разных антигена (или эпитопа). В некоторых вариантах осуществления “scFv димер” представляет собой бивалентное диатело или бивалентное ScFv (BsFv), включающее V_H-V_L (связанные пептидным линкером), димеризованные с другим V_H-V_L фрагментом, таким образом, V_H одного фрагмента скоординированы с V_L областями другого фрагмента и образуют два сайта связывания, которые могут быть нацелены на одни и те же антигены (или эпитопы) или разные антигены (или эпитопы). В других вариантах осуществления “scFv димер” представляет собой биспецифическое диатело, включающее V_{H1}-V_{L2} (связанные пептидным линкером), связанные с V_{L1}-V_{H2} (также связанными пептидным линкером) так, чтобы V_{H1} и V_{L1} были скоординированы и V_{H2} и V_{L2} были скоординированы, и чтобы каждая скоординированная пара имела разную антиген-специфичность.

[00078] “Доменное антитело” относится к фрагменту антитела, содержащему только варибельную область тяжелой цепи или варибельную область легкой цепи. В некоторых случаях два или более V_H доменов ковалентно связаны пептидным линкером с образованием бивалентного или мультивалентного доменного антитела. Два V_H домена бивалентного доменного антитела могут быть нацелены на один и тот же или разные антигены.

[00079] Термин “химерное” в контексте настоящей заявки означает антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющее часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящую из одного вида, а остальную часть тяжелой и/или легкой цепи, происходящую из другого вида. В иллюстративном примере химерное антитело может содержать константную область, происходящую от человека, и варибельную область от

животного, не являющегося человеком, такого как мышь. В некоторых вариантах осуществления животное, отличное от человека, представляет собой млекопитающее, например мышь, крысу, кролика, козу, овцу, морскую свинку или хомяка.

[00080] Термин “гуманизированное” в контексте настоящей заявки означает, что антитело или антиген-связывающий фрагмент включают CDR, происходящие от животных, не являющихся человеком, FR области, происходящие от человека, и, когда это применимо, константные области, происходящие от человека.

[00081] “CD3” в контексте настоящей заявки относится к белку кластера дифференцировки 3, происходящему из любого вида позвоночных, включая млекопитающих, таких как приматы (например, человек, обезьяна) и грызуны (например, мыши и крысы). У млекопитающих молекула CD3 представляет собой мультибелковый комплекс из шести цепей, включающих: CD3гамма цепь, CD3дельта цепь, две CD3эпсилон цепи и гомодимер из CD3зета цепей, где CD3зета цепь представляет собой внутриклеточный хвост молекулы CD3, а CD3гамма, CD3дельта и CD3эпсилон цепи - все содержат внеклеточный домен (ECD), экспрессируемый на поверхности Т-клеток. Иллюстративная последовательность человеческого CD3 включает человеческий белок CD3эпсилон (NCBI Ref Seq No. NP_000724), человеческий белок CD3 дельта (NCBI Ref Seq No. NP_000723) и человеческий белок CD3гамма (NCBI Ref Seq No. NP_000064). Иллюстративная последовательность не-человеческого CD3 включает белок CD3эпсилон *Macaca fascicularis* (обезьяны) (NCBI Ref Seq No. NP_001270544), белок CD3дельта *Macaca fascicularis* (обезьяны) (NCBI Ref Seq No. NP_001274617), белок CD3гамма *Macaca fascicularis* (обезьяны) (NCBI Ref Seq No. NP_001270839); мышинный белок CD3эпсилон (NCBI Ref Seq No. NP_031674), мышинный белок CD3дельта (NCBI Ref Seq No. NP_038515), мышинный белок CD3гамма (NCBI Ref Seq No. AAA37400); белок CD3эпсилон *Rattus norvegicus* (крысы) (NCBI Ref Seq No. NP_001101610), белок CD3дельта *Rattus norvegicus* (крысы) (NCBI Ref Seq No. NP_037301), белок CD3гамма *Rattus norvegicus* (крысы) (NCBI Ref Seq No. NP_001071114). В некоторых вариантах осуществления CD3, используемый в настоящем изобретении, также может представлять собой рекомбинантный CD3, например, включая рекомбинантный белок CD3эпсилон, рекомбинантный белок CD3дельта и рекомбинантный белок CD3гамма, который, необязательно, может экспрессироваться в виде рекомбинантного CD3 комплекса. Рекомбинантный CD3 комплекс может экспрессироваться на клеточной поверхности или, альтернативно, может экспрессироваться в виде растворимой формы, которая не связана на клеточной поверхности.

[00082] Термин “CD3эпсилон” в контексте настоящей заявки предназначен для охвата любой формы CD3эпсилон, например 1) нативной непротессированной молекулы CD3эпсилон, “полноразмерной” цепи CD3эпсилон или природных вариантов CD3эпсилон, включая, например, сплайс-варианты или аллельные варианты; 2) любой формы CD3эпсилон, которая является результатом процессинга в клетке; или 3) полноразмерной, фрагмента (например, усеченной формы,

внеклеточного/трансмембранного домена) или модифицированной формы (например, мутантной формы, гликозилированной/ПЭГилированной, His-меченной/иммунофлуоресцентно-меченной формы) CD3эпсилон субъединицы, полученной рекомбинантным методом.

[00083] Термин “анти-CD3эпсилон антитело” относится к антителу, которое способно специфически связываться с CD3эпсилон (например, CD3эпсилон человека или обезьяны).

[00084] Термин “специфическое связывание” или “специфически связывается” в контексте настоящей заявки относится к неслучайной реакции связывания между двумя молекулами, например, между антителом и антигеном. В некоторых вариантах осуществления антитела или их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, специфически связываются с CD3эпсилон человека с аффинностью связывания (K_D) $\leq 10^{-6}$ М (например, $\leq 5 \times 10^{-7}$ М, $\leq 2 \times 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 5 \times 10^{-8}$ М, $\leq 2 \times 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 5 \times 10^{-9}$ М, $\leq 4 \times 10^{-9}$ М, $\leq 3 \times 10^{-9}$ М, $\leq 2 \times 10^{-9}$ М или $\leq 10^{-9}$ М). K_D , как используется в настоящей заявке, относится к отношению скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), которое можно определить с использованием любого обычного способа, известного в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, метод поверхностного плазмонного резонанса, метод микромасштабного термофореза, метод ВЭЖХ-МС и метод проточной цитометрии (такой как FACS). В некоторых вариантах осуществления значение K_D можно соответствующим образом определить методом проточной цитометрии.

[00085] Способность “блокировать связывание” или “конкурировать за один и тот же эпитоп” в контексте настоящей заявки относится к способности антитела или антиген-связывающего фрагмента ингибировать связывающее взаимодействие между двумя молекулами (например, CD3эпсилон человека и анти-CD3эпсилон антителом) до любой определяемой степени. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, который блокирует связывание между двумя молекулами, ингибирует связывающее взаимодействие между двумя молекулами по меньшей мере на 85% или по меньшей мере на 90%. В некоторых вариантах осуществления это ингибирование может быть больше чем 85% или больше чем 90%.

[00086] Термин “эпитоп” в контексте настоящей заявки относится к специфической группе атомов или аминокислот на антигене, с которой связывается антитело. Два антитела могут связываться с одним и тем же или близкородственным эпитопом в антигене, если они демонстрируют конкурентное связывание в отношении этого антигена. Например, если антитело или антиген-связывающий фрагмент блокирует связывание эталонного антитела с антигеном (например, рекомбинантным человеческим/обезьяньим CD3эпсилон или CD3эпсилон, экспрессируемым на поверхности клеток, в настоящем изобретении) на по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, тогда можно считать, что антитело или антиген-связывающий фрагмент связывается с тем же самым/близкородственным эпитопом, что и эталонное антитело.

[00087] Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что можно определить, без излишнего экспериментирования, связывается ли человеческое моноклональное антитело с тем же самым эпитопом, что и антитело по настоящему изобретению (например, мышинные моноклональные антитела WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP331_2.488.33, WBP3311_2.615.8, WBP3311_2.844.8 и гуманизированное антитело WBP3311_2.166.48-z1 и WBP3311_2.306.4-z1), установив препятствует или нет первое связыванию последнего с полипептидом антигена CD3эпсилон. Если тестируемое антитело конкурирует с антителом по настоящему изобретению, на что указывает уменьшение связывания антитела по настоящему изобретению с полипептидом антигена CD3эпсилон, тогда два антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом. Или, если связывание тестируемого антитела с полипептидом антигена CD3эпсилон ингибируется антителом по настоящему изобретению, тогда два антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

[00088] Различные символы, используемые в названиях антител, представленных в настоящей заявке, имеют разные обозначения: “mIgG2” относится к антителу с мышиной константной областью IgG2 изотипа; “uIgG1” относится к антителу с человеческой константной областью IgG1 изотипа; “K” или “L” относится к антителу, использующему каппа или лямбда легкую цепь.

[00089] “Консервативная замена”, в отношении аминокислотной последовательности, относится к замене аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь с аналогичными физико-химическими свойствами. Например, консервативные замены могут быть между аминокислотными остатками с гидрофобными боковыми цепями (например Met, Ala, Val, Leu и Ile), между остатками с нейтральными гидрофильными боковыми цепями (например Cys, Ser, Thr, Asn и Gln), между остатками с кислотными боковыми цепями (например Asp, Glu), между аминокислотами с основными боковыми цепями (например His, Lys и Arg) или между остатками с ароматическими боковыми цепями (например Trp, Tyr и Phe). Как известно в данной области техники, консервативная замена обычно не приводит к существенному изменению в конформационной структуре белка и поэтому может сохранять биологическую активность белка.

[00090] Термины “гомолог” и “гомологичный” в контексте настоящей заявки являются взаимозаменяемыми и относятся к последовательностям нуклеиновых кислот (или их комплементарным цепям) или аминокислотным последовательностям, которые имеют идентичность последовательности по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с другими последовательностями при их оптимальном выравнивании.

[00091] “Процент (%) идентичности последовательности” по отношению к аминокислотной последовательности (или последовательности нуклеиновой кислоты) определяется как процент аминокислотных (или нуклеотидных) остатков в

последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным (или нуклеотидным) остаткам в эталонной последовательности, после выравнивания последовательностей и, если необходимо, введения гэпов, для достижения максимального количества идентичных аминокислот (или нуклеотидов). Консервативная замена аминокислотных остатков может рассматриваться или не рассматриваться как идентичные остатки. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотной (или нуклеотидной) последовательности может достигаться, например, с использованием общедоступных инструментов, таких как BLASTN, BLASTp (доступны на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI), см. также, Altschul S.F. et al, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)), ClustalW2 (доступно на веб-сайте Европейского института биоинформатики, см. также, Higgins D.G. et al, *Methods in Enzymology*, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al, *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21): 2947-8 (2007)), и программа ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут использовать параметры по умолчанию, предоставляемые инструментом, или могут настроить параметры в соответствии с выравниванием, например, выбрав подходящий алгоритм.

[00092] “Эффекторная функция” в контексте настоящей заявки относится к биологическим активностям, вызываемым связыванием Fc области антитела с его эффекторами, такими как C1 комплекс и Fc рецептор. Иллюстративные эффекторные функции включают: комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), индуцируемую взаимодействием антител и C1q на C1 комплексе; антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), индуцируемую связыванием Fc области антитела с Fc рецептором на эффекторной клетке; и фагоцитоз.

[00093] “Осуществлять лечение” или “лечение” состояния, в контексте настоящей заявки, включает предотвращение или облегчение состояния, замедление начала или скорости развития состояния, уменьшение риска развития состояния, предотвращение или задержку развития симптомов, связанных с состоянием, уменьшение или прекращение симптомов, связанных с состоянием, индукцию полной или частичной регрессии состояния, лечение состояния или некоторые комбинации вышеперечисленных.

[00094] “Выделенное” вещество изменено рукой человека из естественного состояния. Если “выделенная” композиция или вещество встречается в природе, они были изменены или выделены из своей исходной среды, либо подвергались и тому и другому. Например, полинуклеотид или полипептид, естественно присутствующий в живом организме у животного, не является “выделенным”, но тот же полинуклеотид или полипептид является “выделенным”, если он был в достаточной степени отделен от сосуществующих веществ его естественного состояния, чтобы существовать в по существу чистом состоянии. “Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты” относится к последовательности выделенной молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления “выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент” относится к антителу или антиген-связывающим фрагментам,

имеющим чистоту, по меньшей мере, 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, как определено электрофоретическими методами (такими как SDS-PAGE, изоэлектрическое фокусирование, капиллярный электрофорез) или хроматографическими методами (такими как ионообменная хроматография или обращенно-фазовая ВЭЖХ)

[00095] Термин “вектор” в контексте настоящей заявки относится к носителю, в который может быть функционально встроен полинуклеотид, который кодирует белок, чтобы вызвать экспрессию этого белка. Вектор можно использовать для трансформации, трансдукции или трансфекции клетки-хозяина, чтобы вызвать экспрессию генетического элемента, который он несет в клетке-хозяине. Примеры векторов включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, такие как дрожжевая искусственная хромосома (YAC), бактериальная искусственная хромосома (BAC) или происходящая из P1 искусственная хромосома (PAC), бактериофаги, такие как фаг лямбда или фаг M13, и вирусы животных. Категории вирусов животных, используемых в качестве векторов, включают ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, адено-ассоциированный вирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, вирус папилломы и паповавирус (например SV40). Вектор может содержать множество элементов для контроля экспрессии, включая промоторные последовательности, последовательности инициации транскрипции, энхансерные последовательности, селективируемые элементы и репортерные гены. Кроме того, вектор может содержать ориджин репликации. Вектор может также включать вещества, способствующие его проникновению в клетку, включая, помимо прочего, вирусную частицу, липосому или белковую оболочку. Вектор может представлять собой экспрессирующий вектор или клонирующий вектор. Настоящее изобретение представляет векторы (например, векторы экспрессии), содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в настоящей заявке, кодирующую антитело или его антиген-связывающий фрагмент, по меньшей мере один промотор (например SV40, CMV, EF-1 α), функционально связанный с последовательностью нуклеиновой кислоты, и по меньшей мере один селективируемый маркер. Примеры векторов включают, но не ограничиваются этим, ретровирус (включая лентивирус), аденовирус, адено-ассоциированный вирус, герпесвирус (например, вирус простого герпеса), поксвирус, бакуловирус, папилломавирус, паповавирус (например, SV40), фаг лямбда и фаг M13, плазмиду pCDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pCDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMOHO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pCDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Vos и т.д.

[00096] Фраза “клетка-хозяин” в контексте настоящей заявки относится к клетке, в которую был встроен экзогенный полинуклеотид и/или вектор.

[00097] “CD3-связанное заболевание или состояние” в контексте настоящей заявки

относится к любому заболеванию или состоянию, которое вызывается, обостряется или которое иным образом связано с повышенной или пониженной экспрессией или активностью CD3. В некоторых вариантах осуществления состояние, связанное с CD3, представляет собой иммунное расстройство, такое как, например, рак, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

[00098] “Рак” в контексте настоящей заявки относится к любому медицинскому состоянию, характеризующемуся ростом злокачественных клеток или новообразованием, аномальной пролиферацией, инфильтрацией или метастазированием, и включает как солидные опухоли, так и несолидные раковые заболевания (гематологические злокачественные заболевания), такие как лейкоз. Термин “солидная опухоль” в контексте настоящей заявки относится к твердой массе опухолевых и/или злокачественных клеток.

[00099] Термин “фармацевтически приемлемый” означает, что указанный носитель, наполнитель, разбавитель, эксципиент(эксципиенты) и/или соль, как правило, химически и/или физически совместимы с другими ингредиентами, включенными в композицию, и физиологически совместимы с реципиентом.

[000100] Анти-CD3эпсилон антитело

[000101] Настоящее изобретение представляет анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, включающие одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) последовательностей CDR анти-CD3эпсилон антитела WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 или WBP3311_2.844.8. Повсеместно в настоящем раскрытии термин “WBP3311”, относящийся к названиям антитела, используется взаимозаменяемо с “W3311”. Например, антитело WBP3311_2.166.48 также указано как W3311_2.166.48, и такие названия относятся к одному и тому же антителу.

[000102] “WBP3311_2.166.48” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 81 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 83.

[000103] “WBP3311_2.306.4” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 85 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 87.

[000104] “WBP3311_2.383.47” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 89 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 91.

[000105] “WBP3311_2.400.5” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 93 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 95.

[000106] “WBP3311_2.482.5” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 97 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 99.

[000107] “WBP3311_2.488.33” в контексте настоящей заявки относится к мышинному

моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 101 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 103.

[000108] “WBP3311_2.615.8” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 105 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 107.

[000109] “WBP3311_2.844.8” в контексте настоящей заявки относится к мышинному моноклональному антителу, имеющему вариабельную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 109 и вариабельную область каппа-легкой цепи SEQ ID NO: 111.

[000110] Таблица 1 показывает последовательности CDR этих 8 анти-CD3эпсилон антител. Последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи также представлены ниже.

[000111]

Таблица 1

Антитело ID:		CDR1	CDR2	CDR3
WBP3311_2.166.48	VH	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 5
		GYSFTTYIYH	WIFPGNDNIKYS EKFKG	DSVSIYYFDY
WBP3311_2.166.48	VK	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 6
		KSSQSLNSRT RKNYLA	WASTRKS	TQSFILRT
WBP3311_2.306.4	VH	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11
		GFAFTDYIYH	WISPGNVNTKY NENFKG	DGYSLYYFDY
WBP3311_2.306.4	VK	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 12
		KSSQSLNSRT RKNYLA	WASTRQS	TQSHTLRT
WBP3311_2.383.47	VH	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 17
		GFTFTNYIYH	WISPENGNTKY NENFQD	DGYSLYYFDY
WBP3311_2.383.47	VK	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 18
		KSSQSLNSRT RKNYLA	WASIRVS	TQSHTLRT
WBP3311_2.400.5	VH	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23
		GYSFTNYYLH	WIFPESDNTKY NEKLLKG	DSVGNYFFDF
WBP3311_2.400.5		SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 24

	VK	KSSQSLVNNRT RKNYLA	WASTRES	AQSFILRT
WBP3311_2.482.5	VH	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 29
		GYTFTTYIYH	WIFPGSDNIKYN ENFKD	DSVSRYYFDY
WBP3311_2.482.5	VK	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 30
		KSSQSLVNDRT RKNYLA	WASTRES	AQSFILRT
WBP331_2.488.33	VH	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 35
		GFSFTNYIYH	WIFPGTVNTKY NEKFKG	DSVGIYYFDF
WBP331_2.488.33	VK	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 36
		KSSQSLNNT RKNYLA	WASTRES	TQSFILRT
WBP3311_2.615.8	VH	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 41
		GYSFTDFYTH	WIFPGSDNIKYN EKFKG	DSVSVYYFDY
WBP3311_2.615.8	VK	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 42
		KSSQSLNIRTR KNYLA	WASTRDS	TQSFILRT
WBP3311_2.844.8	VH	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 47
		GFAFTDYIYH	WISPGNVNTKY NENFKG	DGYSLYYFDY
WBP3311_2.844.8	VK	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 48
		KSSQSLNSRT RKNYLA	WASTRES	TQSHTLRT

[000112] Последовательности переменных областей тяжелых или каппа-легких цепей WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP331_2.488.33, WBP3311_2.615.8 и WBP3311_2.844.8 и гуманизованных WBP3311_2.166.48 и WBP3311_2.306.4 антител представлены ниже.

[000113] WBP3311_2.166.48-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 81):

QVQLQQSGPELVKPGASVKIACKASGYSFTTYIYHWVKQRPGQGLEWIGWIFPG
NDNIKYSEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAIDSVSIYYFDYWGQGT
TLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 82):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAACCTGGGGCTTCAG
 TGAAGATTGCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTCACAACCTACTATATACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTCTGGAAAT
 GATAATATTAAGTACAGTGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACAC
 TTCCTCCAGTACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGT
 СТАТТТСТГТГСТАТАГАСТССТГТАГАТАСТТАСТТТГАСТАТТГГГГССААГГС
 АССАСТСТСАГАСТСТССТСА

[000114] WBP3311_2.166.48-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 83):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRKS^GVPDRFTGSGSGTDFLTINSVQAEDLAVYYCTQSFILRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 84):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGA
 AGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAG
 ААСТАСТТГГСТТГГТАССАГАААССАГГСАГСТССТАААСТГСТГАСТТАС
 ТГГГСАТССАСТАГГАААСТТГГГГТСССТГАТГССТТАСАГГСАГТГГАТСТГГГ
 АСАГАТТТАСТСТСАССАТАСААГАТГТГСАГГСТГААГАСТТГГСАГТТТАТТАС
 ТГСАГСААСТТТТТАТСТТТССГАСГТТССГТГГАГГСАССААГСТГГАААТСААА

[000115] WBP3311_2.306.4-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 85):

QVQLQSQGPELVKPGASVRISCKASGFAFTDYYIHWVKQRPQGLEWIGWISPG
NVNTKYNENFKGRATLTADLSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDGYSLYFDYWGQG
 TTLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 86):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCCG
 TGAGGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCGCCTTCACAGACTACTATATACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGATGGATTTCTCCTGGAAAT
 ГТААТАСТАААТАСААТГАААСТТСААГГГСАГГГССАСТАГСТГСАГАССТ
 АТССТССАГСАСАГССТАСТАТГСАГСТСАГСАГССТГАССТСТГАГГАСТСТГССГТ
 СТАТТТСТГТГСААГАГАТГГАТАТТСССТГТАТТАСТТТГАСТТАСТГГГГССААГГ
 САССАСТСТСАГАСТСТССТСА

[000116] WBP3311_2.306.4-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 87):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRQS^GVPDRFTGSGSGTAFTLTISGVQAEDLAVYFCTQSHTLRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 88):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGA
 AGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAG
 ААСТАСТТГГСТТГГТАССАГАААССАГГСАГСТССТАААСТАСТААТТАС
 ТГГГСАТССАСТАГГСААТСТГГГГТСССТГАТГССТТАСАГГСАГТГГАТСТГГГ

ACAGCTTTCACCTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTTC
TGCACGCAATCTCATACTCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
A

[000117] WBP3311_2.383.47-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 89):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKTSGFTFTNYYIHWVIQRPQGLEWIGWISPEN
GNTKYNENFQDKATLTADISSSTAYMHLSSLTSEDSAVYFCARDGYSLYYFDYWGGQT
TLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 90):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAGGATATCCTGCAAGACTTCTGGCTTCACCTTCACAACTACTATATACTGGG
TGATACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGTTGGATTTCTCCTGAAAATG
GTAATACTAAATACAATGAAAACCTCCAGGACAAGGCCCACTGACTGCAGACATA
TCGTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTC
TATTTCTGTGCAAGAGATGGGTATCCCTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGC
ACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[000118] WBP3311_2.383.47-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 91):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKKNYLAWYQKPGQSPKLLIY
WASIRVSGVPDRFTGSGSGTFTLTISGVQAEDLAVYYCTQSHTLRTFGGGKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 92):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGA
AGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAG
AACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAGCTACTGATCTAC
TGGGCATCCATTAGGGTATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAACCTTTCACCTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTAT
TGCACGCAATCTCATACTCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
A

[000119] WBP3311_2.400.5-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 93):

QVQLQQSGPELVNPGASVKISKASGYSFTNYYLHWVKQRPQGLEWIGWIFPE
SDNTKYNEKLGKATLTADTSSDTAYMHLSSLTFEDSAVYFCARDSVGNYYFFDFWGGQ
TTLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 94):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAATCCTGGGGCTTCAG
TGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTCACAACTACTATTTACTGGG
TGAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTCTCCTGAAAGT
GATAATACCAAGTACAATGAGAAATTGAAGGGCAAGGCCCACTGACGGCAGACA
CATCCTCCGATACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACATTTGAGGACTCTGCAG
TCTATTTCTGTGCAAGAGACTCCGTTGGAAACTACTTCTTTGACTTCTGGGGCCAAG

GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

[000120] WBP3311_2.400.5-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 95):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMRCKSSQSLVNNRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCAQSFILRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 96):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCGGGAGAGA
AGGTCACATGAGGTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGGTCAACAATAGAACCCGAAAG
AACTACTTGGCATGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCTAAACTATTGATCTAC
TGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTAC
TGC GCGCAATCTTTTATTCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAACCTGGAAATCAAA

[000121] WBP3311_2.482.5-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 97):

QVQLQQSGPELVKPGSSVKISCKPSGYTFTYYIHVVKQRPGQGLEWIGWIFPGS
DNIKYNENFKDKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDSVSRYYFDYWGQGTI
LTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 98):

CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAACCTGGGTCTTCAG
TGAAGATATCCTGCAAACCTTCTGGCTACACCTTCACAACCTACTATATACATTGGG
TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGAAGT
GATAATATTAATAACAATGAGAATTTCAAGGACAAGGCCACACTGACGGCAGACAC
ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAAGACTCTGCAGT
CTATTTCTGTGCAAGAGACTCCGTCAGTAGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGG
CACCATTCTCACAGTTTCTTCA

[000122] WBP3311_2.482.5-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 99):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLVNDTRTRKKNYLAWYQQKPGLSPKLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCAQSFILRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 100):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGA
AGGTCACATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGGTCAATGATAGAACCCGAAAA
AACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCTGTCTCCTAAACTGCTGATCTAC
TGGGCTTCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCTGTTTATTAC
TGC GCGCAATCTTTTATTCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[000123] WBP331_2.488.33-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 101):

QVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKASGFSFTNYYIHVVKQRPGQGP EWIGWIFPGT
VNTKYNEKFKGKATLTADTSSNTAFMQLSSLTSADSAVYFCARDSVGIYYFDWGLGT

TLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 102):

CAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAACTGGTCAAACCTGGGACTTCAG
 TGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCAGCTTCACAACTACTATATACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACCTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGA
 ACTGTTAATACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGTAAGGCCACACTGACGGCAGACAC
 ATCCTCCAATACAGCCTTCATGCAGCTCAGCAGCCTGACTTCTGCGGACTCTGCAGT
 СТАТТТСТГТГСААГАГАСТССТГТТГГТАТСТАСТТТГАСТТСТГГГГСТТАГГС
 АССТСТСАСАСТСТССТСА

[000124] WBP331_2.488.33-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 103):

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTVSCKSSQSLLNRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCTQSFILRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 104):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAGCAGGAGAGA
 AGGTCACTGTGAGTTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAATAGAACCCGAAAA
 ААСТАСТТГГСТТГГТАССАСАГААССАГГСАСТСТССТАААСТАСТАСТТАС
 ТГГГСАТССАСТАГГГААТСТГГГГСТССТГАТСТССТТАСАГГСАСТГГАТСТГГТ
 АСАГАТТТАССТСТСАСАТСАСАСТГТСТСАГГСТГААГАССТГГСАСТТТАТТАС
 ТГСАСАГАТСТТТТАТСТТСТСГАСГТСТСГГТГГАГГСАСААГАСТГГАГАТСААА

[000125] WBP3311_2.615.8-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 105):

QVQLQSQPELVKPGTSMKISCKASGYSFTDFYTHWVRQRPQGLEWIGWIFPG
SDNIKYNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDSVSVYYFDYWGQG
 TTLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 106):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAACCTGGGACTTCAA
 TGAAAATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTCACAGACTTCTATAACACTGGG
 TGAGGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTTTCTGGAAGT
 GATAATATTAATAACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACGGCAGACAC
 ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGT
 СТАТТТСТГТГСААГАГАСТССТГТАГТСТАСТТТГАСТАТТГГГГССААГГ
 САССТСТСАСАСТСТССТСА

[000126] WBP3311_2.615.8-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 107):

DIVMSQSPSSLAVTAGEKVTMSCKKSSQSLLNIRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRDSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCTQSFILRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 108):

GACATCGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGACAGCAGGAGAGA
 AGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACATTAGAACCCGAAAG

AACTACTTGGCTTGGTACCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTAC
 TGGGCATCCACTAGGGACTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
 ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTAC
 TGCACGCAATCTTTTATTCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[000127] WBP3311_2.844.8-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 109):

QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGFAFTDYYIHVKQRPGQGLEWIGWISPG
NVNTKYNENFKGRATLTADLSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARDGYSLYYFDYWQQG
 TTLTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 110):

CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAATTGGTGAAGCCTGGGGCTTCCG
 TGAGGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCGCCTTCACAGACTACTATATACTGGG
 TGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGGATGGATTTCTCCTGAAAT
 GTTAATACTAAATACAATGAAAACCTCAAGGGCAGGGCCACACTGACTGCAGACCT
 ATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGT
 СТАТТТСТГТГСААГАГАТГГАТАТТСССТГТАТТАСТТТГАСТТАСТГГГГССААГГ
 САССАСТСТСАСТАГТСТССТСА

[000128] WBP3311_2.844.8-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 111):

DIVMSQSPSSLTVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFTGSGSGTAFTLTISGVQAEDLAVYFCTQSHTLRTFGGGTKLEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 112):

GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTGACTGTGTCAGCAGGAGAGA
 AGGTCACTATGAGCTGCAAATCCAGTCAGAGTCTGCTCAACAGTAGAACCCGAAAG
 AACTACTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAGCTACTAATCTAC
 TGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGG
 ACAGCTTTCACTCTCACCATCAGCGGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTC
 TGCACGCAATCTCATACTCTTCGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA
 A

[000129] Известно, что CDR ответственны за связывание антигена, однако, было обнаружено, что не все из 6 CDR являются незаменимыми или неизменяемыми. Точнее сказать, можно заменить или изменить или модифицировать одну или несколько CDR в анти-CD3эпсилон антителе WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP331_2.488.33, WBP3311_2.615.8 или WBP3311_2.844.8, при этом по существу сохранить специфическую аффинность связывания с CD3эпсилон.

[000130] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают последовательность CDR3 тяжелой цепи одного из анти-CD3эпсилон антител WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5,

WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 и WBP3311_2.844.8. В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают последовательность CDR3 тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 11, 17, 23, 29, 35, 41 и 47. CDR3 области тяжелой цепи расположены в центре антиген-связывающего сайта, и поэтому считается, что они наиболее контактируют с антигеном и обеспечивают наибольшую свободную энергию для сродства антитела к антигену. Также считается, что CDR3 тяжелой цепи является безусловно самой разнообразной CDR антиген-связывающего сайта с точки зрения длины, аминокислотного состава и конформации посредством механизмов множественной диверсификации (Tonegawa S. *Nature*. 302: 575-81). Разнообразие CDR3 тяжелой цепи является достаточным для получения большинства специфичностей антител (Xu JL, Davis MM. *Immunity*. 13:37-45), а также желаемой антиген-связывающей аффинности (Schier R, и т.д. *J Mol Biol*. 263:551-67).

[000131] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают подходящие последовательности каркасных областей (FR), при условии, что антитела и их антиген-связывающие фрагменты могут специфически связываться с CD3эпсилон. Последовательности CDR, представленные в Таблице 1, получены из мышинных антител, но их можно привить на любые подходящие последовательности FR любого подходящего вида, такого как мышь, человек, крыса, кролик, среди прочих, с использованием подходящих способов, известных в данной области техники, таких как рекомбинантные методы.

[000132] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, являются гуманизированными. Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент желательны при их пониженной иммуногенности у человека. Гуманизированное антитело является химерным в своих переменных областях, поскольку не-человеческие последовательности CDR привиты к человеческим или по существу человеческим последовательностям FR. Гуманизацию антитела или антиген-связывающего фрагмента по существу можно осуществить путем замены генов CDR не-человеческого происхождения (таких как мышинные) соответствующими генами CDR человека в гене человеческого иммуноглобулина (см., например, Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeyen et al. (1988) *Science* 239: 1534-1536).

[000133] Для достижения этой цели можно выбрать подходящие переменные домены тяжелой цепи и легкой цепи человека с использованием способов, известных в данной области. В иллюстративном примере может быть использован подход “наилучшего соответствия”, где последовательность переменного домена нечеловеческого антитела (например, грызуна) подвергают скринингу или BLAST-анализу против базы данных известных человеческих последовательностей переменного домена, а человеческую последовательность, наиболее близкую к нечеловеческой

искомой последовательности, идентифицируют и используют как человеческий каркас для прививки нечеловеческих последовательностей CDR (см., например, Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901). Альтернативно, каркас, происходящий из консенсусной последовательности всех человеческих антител, можно использовать для прививки нечеловеческих CDR (см., например, Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285; Presta et al. (1993) J. Immunol., 151: 2623).

[000134] В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела или антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, состоят из по существу всех человеческих последовательностей, за исключением последовательностей CDR, которые не являются человеческими. В некоторых вариантах осуществления FR переменных областей и константные области, если присутствуют, полностью или по существу состоят из последовательностей иммуноглобулина человека. Человеческие последовательности FR и человеческие последовательности константных областей могут происходить из разных генов иммуноглобулинов человека, например, последовательности FR, происходящие из одного человеческого антитела, а константная область из другого человеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент включают человеческую FR1-4 и человеческую JH и Jk.

[000135] В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают одну или несколько FR последовательностей WBP3311_2.166.48-z1 или WBP3311_2.306.4-z1. Таблица 2 ниже показывает FR последовательности WBP3311_2.166.48-z1 или WBP3311_2.306.4-z1. Нативные мышинные последовательности FR также показаны в Таблице 2. Последовательности переменных областей тяжелых цепей и легких цепей также представлены ниже.

[000136] “WBP3311_2.166.48-z1” в контексте настоящей заявки относится к гуманизированному антителу на основе WBP3311_2.166.48, которое включает переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 113 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 115. WBP3311_2.166.48-z1 имеет сопоставимую аффинность к антигену по сравнению с его исходным антителом WBP3311_2.166.48.

[000137] “WBP3311_2.306.4-z1” в контексте настоящей заявки относится к гуманизированному антителу на основе WBP3311_2.306.4, которое включает переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 117 и переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 119. WBP3311_2.306.4-z1 имеет сопоставимую аффинность к антигену по сравнению с его исходным антителом WBP3311_2.306.4.

[000138]

Таблица 2

	FR1	FR2	FR3	FR4
WBP3311_2.1	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO:

66.48-VH				55
	QVQLQQSGPE LVKPGASVKI ACKAS	WVKQRPQGGL WIG	KATLTADTSSST AYMQLSSLTSED SAVYFCAI	WGQGTTLT VSS
WBP3311_2.1 66.48-z1-VH	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 63
	QVQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCAS	WVRQAPGQGL EWMG	RVTITADKSTST AYMELSSLRSE DTAVYYCAI	WGQGTTLT VSS
WBP3311_2.1 66.48-VK	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 56
	DIVMSQSPSS LAVSAGEKVT MSC	WYQQKPGQSPK LLIY	GVPDRFTGSGS GTDFTLTINSVQ AEDLAVYYC	FGGGTKLEI K
WBP3311_2.1 66.48-z1-VK	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 64
	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INC	WYQQKPGQPPK LLIY	GVPDRFSGSGS GTDFTLTISLQ AEDVAVYYC	FGGGTKVEI K
WBP3311_2.3 06.4-VH	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 71
	QVQLQQSGPE LVKPGASVRL SCKAS	WMKQRPQGGL EWIG	RATVTADLSSST AYMQLSSLTSED SAVYFCAR	WGQGTTLT VSS
WBP3311_2.3 06.4-z1-VH	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 79
	QVQLVQSGA EVKKPGSSVK VSCAS	WVRQAPGQGL EWMG	RVTITADKSTST AYMELSSLRSE DTAVYYCAR	WGQGTTLT VSS
WBP3311_2.3 06.4-VK	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 72
	DIVMSQSPSSL TVSAGEKVT MSC	WYQQKPGQSPK LLIY	GVPDRFTGSGS GTAFTLTISGVQ AEDLAVYFC	FGGGTKLEI K

WBP3311_2.3 06.4-z1-VK	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 80
	DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INC	WYQQKPGQPPK LLIY	GVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQ AEDVAVYYC	FGGGTKVEI K

[000139] WBP3311_2.166.48-z1-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 113):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYSFTTYYIHWRQAPGQGLEWMGWIFP
GNDNIKYSEKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAIDSVSIYYFDYWGQG
TLVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 114):

CAGGTGCAACTCGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTTCAG
TCAAGGTCAGTTGCAAGGCCAGTGGGTATTCCTTCACTACTACATCCACTGGG
TGCGGCAGGCACCAGGACAGGGGCTTGAGTGGATGGGCTGGATCTTCCCGGCAAC
GATAATATTAAGTACAGCGAGAAGTTCAAAGGGAGGGTCACCATTACCGCCGACAA
ATCCACTTCCACAGCCTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGATCCGAGGATACAGCCG
TGTACTACTGTGCCATTGACAGCGTGTCCATCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGG
GCACACTGGTCACAGTGAGCAGC

[000140] WBP3311_2.166.48-z1-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 115):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSFILRTFGGGTKVEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 116):

GACATCGTCATGACCCAGTCCCCAGACTCTTTGGCAGTGTCTCTCGGGGAAA
GAGCTACCATCAACTGCAAGAGCAGCCAGTCCCTTCTGAACAGCAGGACCAGGAAG
AATTACCTCGCCTGGTACCAACAGAAGCCCGGACAGCCTCCTAAGCTCCTGATCTAC
TGGGCCTCAACCCGGAAGAGTGGAGTGCCCGATCGCTTTAGCGGGAGCGGCTCCGG
GACAGATTTCACTGACAATTTCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTCGCCGTGTATTA
CTGTACTCAGAGCTTCATTCTGCGGACATTTGGCGGCGGGACTAAAGTGGAGATTA
G

[000141] WBP3311_2.306.4-z1-VH

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 117):

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFAFTDYYIHWRQAPGQGLEWMGWIS
PGNVNTKYNENFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGYSLYYFDYWG
QGTLVTVSS

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 118):

CAGGTGCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCAGAAGTGAAGAAGCCTGGGTCTAGTG
TCAAGGTGTCATGCAAGGCTAGCGGGTTCGCCTTTACTGACTACTACATCCACTGGG
TGCGGCAGGCTCCCGGACAAGGGTTGGAGTGGATGGGATGGATCTCCCCAGGCAAT

GTCAACACAAAGTACAACGAGAACTTCAAAGGCCGCGTCACCATACCGCCGACAA
 GAGCACCTCCACAGCCTACATGGAGCTGTCCAGCCTCAGAAGCGAGGACACTGCCG
 TCTACTACTGTGCCAGGGATGGGTACTCCCTGTATTACTTTGATTACTGGGGCCAGG
 GCACACTGGTGACAGTGAGCTCC

[000142] WBP3311_2.306.4-z1-VK

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 119):

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLSNRTRKKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
WASTRQSGVPDFRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCTQSHTLRITFGGGTKVEIK

Последовательность нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 120):

GATATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACTCCCTTGCTGTCTCCCTCGGCGAAA
 GAGCAACCATCAACTGCAAGAGCTCCCAAAGCCTGCTGAACTCCAGGACCAGGAAG
 AATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTCATCTAC
 TGGGCCTCCACCCGGCAGTCTGGGGTGCCCGATCGGTTTAGTGGATCTGGGAGCGG
 GACAGACTTCACATTGACAATTAGCTCACTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTCTACTA
 CTGTACTCAGAGCCACACTCTCCGCACATTCGGCGGAGGGACTAAAGTGGAGATTA
 AG

[000143] Два иллюстративных гуманизованных анти-CD3эпсилон антитела WBP3311_2.166.48-z1 или WBP3311_2.306.4-z1 оба сохраняли специфическую аффинность связывания с CD3-экспрессирующей клеткой (например CD4 Т-клеткой), и в этом аспекте являются по меньшей мере сопоставимыми с исходными мышинными антителами или даже лучше. Эти два иллюстративных гуманизованных антитела оба сохраняли их функциональное взаимодействие с CD3-экспрессирующей клеткой, заключающееся в том, что оба могли активировать человеческие Т-клетки и запускать высвобождение цитокинов TNFальфа и IFNгамма.

[000144] В некоторых вариантах осуществления FR области человеческого происхождения могут включать такую же аминокислотную последовательность, как у иммуноглобулина человека, из которого они происходят. В некоторых вариантах осуществления один или несколько аминокислотных остатков человеческой FR заменены соответствующими остатками из исходного нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления возможно будет желательно получить гуманизованное антитело или его фрагмент, которые очень близки к структуре исходного нечеловеческого антитела. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящей заявке, включает не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислотных остатков в каждой из человеческих последовательностей FR или не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислотных остатков во всех FR вариабельного домена тяжелой или легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления такое изменение аминокислотных остатков может присутствовать только в FR областях тяжелой цепи, только в FR областях легкой цепи или в обеих цепях.

[000145] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-

связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают последовательность переменного домена тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117. В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают последовательность переменного домена легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119.

[000146] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, включают весь или часть переменного домена тяжелой цепи и/или весь или часть переменного домена легкой цепи. В одном варианте осуществления анти-CD3ε антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, представляет собой однодоменное антитело, которое состоит из всего или части переменного домена тяжелой цепи, представленного в настоящей заявке. В существующем уровне техники можно найти более подробную информацию о таком однодоменном антителе (см., например, патент США № 6248516).

[000147] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε антитела и их фрагменты, представленные в настоящей заявке, также включают константную область иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления константная область иммуноглобулина включает константную область тяжелой цепи и/или легкой цепи. Константная область тяжелой цепи включает CH1, шарнирную и/или CH2-CH3 области. В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи включает Fc область. В некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи включает Sc.

[000148] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε антитела и их антиген-связывающие фрагменты имеют константную область изотипа IgG1 или IgG2a, которая имеет пониженную или обедненную эффекторную функцию, такую как ADCC или CDC, которую можно определить с использованием различных анализов, таких как анализ связывания с Fc рецептором, C1q анализ связывания и анализ клеточного лизиса.

[000149] Аффинность связывания антитела и антиген-связывающего фрагмента, описанных в настоящей заявке, может быть представлена K_D значением, которое представляет собой отношение скорости диссоциации к скорости ассоциации (k_{off}/k_{on}), когда связывание между антигеном и антиген-связывающей молекулой достигает равновесия. Антиген-связывающую аффинность (например, K_D) можно соответственно определить с использованием подходящих методов, известных в данной области техники, включая, например, метод проточной цитометрии. В некоторых вариантах осуществления связывание антитела с антигеном при разных концентрациях можно определить методом проточной цитометрии, определенную среднюю интенсивность флуоресценции (MFI)

можно сначала нанести на график против концентрации антитела, K_D значение затем можно рассчитать путем подгонки зависимости интенсивности флуоресценции специфического связывания (Y) и концентрации антител (X) в одноцентровое уравнение насыщенности: $Y = V_{\max} * X / (K_D + X)$ с использованием Prism version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA), где V_{\max} относится к максимальному специфическому связыванию испытываемого антитела с антигеном.

[000150] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, способны специфически связываться с CD3эпсилон человека, экспрессируемым на клеточной поверхности, или рекомбинантным CD3эпсилон человека. CD3эпсилон представляет собой рецептор, экспрессируемый на клетке. Рекомбинантный CD3эпсилон представляет собой растворимый CD3эпсилон, который рекомбинантно экспрессируется и не связан с клеточной мембраной. Рекомбинантный CD3эпсилон можно получить разными рекомбинантными методами. В одном примере последовательность ДНК CD3эпсилон, кодирующую внеклеточный домен CD3эпсилон человека (NP_000724,1) (Met1-Asp126), можно слить с полигистидиновой меткой на С-конце в векторе экспрессии, с последующей трансфекцией и экспрессией в 293E клетках и очисткой Ni-аффинной хроматографией.

[000151] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, способны специфически связываться с CD3эпсилон человека, экспрессируемым на поверхности клеток, с аффинностью связывания (K_D) не более чем $5 \times 10^{-9} M$, не более чем $4 \times 10^{-9} M$, не более чем $3 \times 10^{-9} M$, не более чем $2 \times 10^{-9} M$, не более чем $10^{-9} M$, не более чем $5 \times 10^{-10} M$, не более чем $4 \times 10^{-10} M$, не более чем $3 \times 10^{-10} M$, не более чем $2 \times 10^{-10} M$, не более чем $10^{-10} M$, не более чем $5 \times 10^{-11} M$ или не более чем $4 \times 10^{-11} M$, не более чем $3 \times 10^{-11} M$ или не более чем $2 \times 10^{-11} M$, или не более чем $10^{-11} M$, как измерено методом проточной цитометрии.

[000152] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, перекрестно реагируют с CD3эпсилон яванского макака, например CD3эпсилон яванского макака, экспрессируемым на клеточной поверхности, или растворимым рекомбинантным CD3эпсилон яванского макака.

[000153] Связывание антител с рекомбинантным CD3эпсилон или CD3эпсилон, экспрессируемым на поверхности клеток, также может быть представлено как значение “полумаксимальной эффективной концентрации” (EC_{50}), которое относится к концентрации антитела, когда наблюдается 50% его максимального эффекта (например, связывания или ингибирования и т.д.). EC_{50} значение можно измерить способами, известными в данной области техники, например, с использованием сэндвич-анализа, такого как ELISA, вестерн-блоттинга, проточной цитометрии и других анализов связывания. В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты, представленные в настоящей заявке, специфически связываются с рекомбинантным

CD3ε человека при EC₅₀ (т.е. концентрация, вызывающая 50% связывание) не более чем 0,01 нМ, не более чем 0,02 нМ, не более чем 0,03 нМ, не более чем 0,04 нМ, не более чем 0,05 нМ, не более чем 0,06 нМ, не более чем 0,07 нМ или не более чем 0,08 нМ, как определено методом ELISA. В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты, представленные в настоящей заявке, специфически связываются с человеческий CD3ε, экспрессируемым на поверхности клеток, при EC₅₀ не более чем 0,5 нМ, не более чем 0,6 нМ, не более чем 0,7 нМ, не более чем 0,8 нМ, не более чем 0,9 нМ, не более чем 1 нМ, не более чем 2 нМ, не более чем 3 нМ, не более чем 4 нМ, не более чем 5 нМ, не более чем 6 нМ, не более чем 7 нМ, не более чем 8 нМ, не более чем 9 нМ или не более чем 10 нМ, как определено методом проточной цитометрии.

[000154] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты связываются с CD3ε яванского макака с такой же аффинностью связывания, как с CD3ε человека. Например, связывание иллюстративных антител WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8, WBP3311_2.844.8 с CD3ε яванского макака происходит с такой же аффинностью или при таком же значении EC₅₀, как и с CD3ε человека.

[000155] В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты, представленные в настоящей заявке, специфически связываются с рекомбинантным CD3ε яванского макака с EC₅₀ не более чем 0,001 нМ, не более чем 0,005 нМ, не более чем 0,01 нМ, не более чем 0,02 нМ, не более чем 0,03 нМ, не более чем 0,04 нМ или не более чем 0,05 нМ, как определено методом ELISA.

[000156] В некоторых вариантах осуществления антитела и их фрагменты, представленные в настоящей заявке, имеют аффинность специфического связывания с CD3ε человека, которая достаточна для обеспечения диагностического и/или терапевтического применения. Ряд терапевтических стратегий модулируют Т-клеточный иммунитет, направленно воздействуя на сигнальный путь TCR, особенно при помощи моноклональных антител против человеческого CD3, которые имеют клиническое применение.

[000157] Антитела или их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, могут представлять собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, рекомбинантное антитело, биспецифическое антитело, меченое антитело, бивалентное антитело или анти-идиотипическое антитело. Рекомбинантное антитело представляет собой антитело, полученное *in vitro* с использованием рекомбинантных способов, а не в организме животных.

[000158] Варианты антител

[000159] Настоящее изобретение также охватывает различные варианты антител и их антиген-связывающих фрагментов, представленных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение охватывает различные типы вариантов

иллюстративного антитела по настоящему изобретению, т.е. WBP3311_2.166.48, WBP3311_2.306.4, WBP3311_2.383.47, WBP3311_2.400.5, WBP3311_2.482.5, WBP3311_2.488.33, WBP3311_2.615.8 и WBP3311_2.844.8.

[000160] В некоторых вариантах осуществления варианты антител включают одну или несколько модификаций или замен в одной или нескольких последовательностях CDR, представленных в Таблице 1, одной или нескольких последовательностях FR, представленных в Таблице 2, последовательностях переменных областей тяжелой или легкой цепи, представленных в настоящей заявке, и/или константной области (например, Fc области). Такие варианты сохраняют аффинность специфического связывания их исходных антител с CD3ε, но имеют одно или несколько желаемых свойств, приобретенных в результате модификации(модификаций) или замены(замен). Например, варианты антител могут иметь улучшенную аффинность связывания антигена, улучшенный паттерн гликозилирования, пониженный риск гликозилирования, пониженное дезаминирование, пониженную или обедненную эффекторную функцию(функции), улучшенное связывание с FcRn рецептором, повышенный фармакокинетический период полужизни, pH-чувствительность и/или совместимость с конъюгацией (например, один или несколько встроенных цистеиновых остатков).

[000161] Можно осуществить скрининг последовательности исходного антитела для идентификации подходящих или предпочтительных остатков, которые должны быть модифицированы или замещены, с использованием способов, известных в данной области, например, “аланин-сканирующий мутагенез” (см., например, Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085). Вкратце, целевые остатки (например, заряженные остатки, такие как Arg, Asp, His, Lys и Glu) можно идентифицировать и заменить нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) и продуцировать модифицированные антитела и скринировать на интересующее свойство. Если замена в определенном аминокислотном положении демонстрирует интересующее функциональное изменение, тогда это положение может быть идентифицировано как потенциальный остаток для модификации или замены. Потенциальные остатки можно далее оценить путем замены остатком другого типа (например, цистеиновым остатком, положительно заряженным остатком и т.д.)

[000162] Вариант аффинности

[000163] Вариант аффинности может содержать модификации или замены в одной или нескольких последовательностях CDR, представленных в Таблице 1, одной или нескольких последовательностях FR, представленных в Таблице 2, последовательностях переменных областей тяжелой или легкой цепи, представленных в настоящей заявке. Аффинные варианты сохраняют аффинность специфического связывания исходного антитела с CD3ε или даже имеют улучшенную аффинность специфического связывания с CD3ε по сравнению с исходным антителом. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна (или все) из замен в последовательностях CDR, последовательностях FR или последовательностях переменных областей включает

консервативную замену.

[000164] Специалистам в данной области должно быть понятно, что в последовательностях CDR и последовательностях FR, представленных в Таблице 1 и Таблице 2, один или несколько аминокислотных остатков могут быть заменены, но полученное антитело или антиген-связывающий фрагмент при этом будут сохранять аффинность связывания с CD3эпсилон или даже иметь улучшенную аффинность связывания. Для достижения этой цели могут использоваться различные способы, известные в данной области. Например, можно создать библиотеку вариантов антител (таких как Fab или scFv варианты) и экспрессировать с использованием технологии фагового дисплея, а затем скринировать на аффинность связывания с CD3эпсилон человека. В качестве другого примера, можно использовать компьютерную программу для виртуальной имитации связывания антител с CD3эпсилон человека и идентификации аминокислотных остатков на антителах, которые образуют интерфейс связывания. Таких остатков можно либо избежать при замене, чтобы предотвратить уменьшение аффинности связывания, либо нацелить на замену, чтобы обеспечить более сильное связывание.

[000165] В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящей заявке, включает одну или несколько замен аминокислотных остатков в одной или нескольких последовательностях CDR и/или одной или нескольких последовательностях FR. В некоторых вариантах осуществления вариант аффинности включает не более чем 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен в последовательностях CDR и/или последовательностях FR в целом.

[000166] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты включают 1, 2 или 3 последовательности CDR, имеющие по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательности с последовательностью (или последовательностями), показанной в Таблице 1, и в то же время сохраняют аффинность связывания с CD3эпсилон на таком же уровне, как у исходного антитела, или даже выше.

[000167] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты включают одну или несколько последовательностей FR, имеющих по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательности с последовательностью (или последовательностями), показанной в Таблице 2, и в то же время сохраняют аффинность связывания с CD3эпсилон на таком же уровне, как у исходного антитела, или даже выше.

[000168] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты включают одну или несколько последовательностей переменных областей, имеющих по меньшей мере 80% (например, по меньшей мере 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) идентичности последовательности с последовательностью (или последовательностями), представленной

в SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, и в то же время сохраняют аффинность связывания с CD3ε на таком же уровне, как у исходного антитела, или даже выше. В некоторых вариантах осуществления в общей сложности 1-10 аминокислот были заменены, вставлены или делетированы в последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115 и SEQ ID NO: 119. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции происходят в областях за пределами CDR (т.е. в FR областях).

[000169] Вариант гликозилирования

[000170] Анти-CD3ε антитела и антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, также охватывают вариант гликозилирования, который может быть получен либо для увеличения, либо для уменьшения степени гликозилирования антитела или антиген-связывающего фрагмента.

[000171] Антитело или его антиген-связывающий фрагмент могут включать один или несколько аминокислотных остатков с боковой цепью, к которой может быть присоединен углеводный фрагмент (например, олигосахаридная структура). Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанный относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка, например аспарагинового остатка в трипептидной последовательности, такой как аспарагин-X-серин и аспарагин-X-треонин, где X представляет собой любую аминокислоту кроме пролина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацетилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикарбонильной группе, наиболее типично к серину или треонину. Удаление нативного сайта гликозилирования удобно осуществить, например, путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы одна из описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанного гликозилирования) или сериновых или треониновых остатков (для сайтов O-связанного гликозилирования), присутствующих в последовательности, были заменены. Новый сайт гликозилирования может быть создан аналогичным образом путем встраивания такой трипептидной последовательности или серинового или треонинового остатка.

[000172] Цистеин-сконструированный вариант

[000173] Анти-CD3ε антитела и антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, также охватывают цистеин-сконструированный вариант, который включает один или несколько встроенных свободных цистеиновых аминокислотных остатков.

[000174] Свободный цистеиновый остаток представляет собой остаток, который не является частью дисульфидного мостика. А цистеин-сконструированный вариант полезен для конъюгации, например, с цитотоксическим и/или визуализирующим соединением, меткой или радиоизотопом, среди прочих, на сайте сконструированного цистеина, например, через малеимид или галогенацетил. Способы конструирования антител или антиген-связывающих фрагментов для встраивания свободных цистеиновых остатков известны в данной области техники, см., например, WO2006/034488.

[000175] Fc вариант

[000176] Анти-CD3ε эпсилон антитела и антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, также охватывают Fc вариант, который включает одну или несколько модификаций или замен аминокислотных остатков в Fc области и/или шарнирной области.

[000177] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε эпсилон антитела или антиген-связывающие фрагменты включают одну или несколько аминокислотных замена, которые улучшают pH-зависимое связывание с неонатальным Fc рецептором (FcRn). Такой вариант может иметь увеличенный фармакокинетический период полужизни, поскольку он связывается с FcRn при кислотном pH, что позволяет ему избежать разложения в лизосоме, с последующей транслокацией и высвобождением из клетки. Способы конструирования антитела и его антиген-связывающего фрагмента для улучшения аффинности связывания с FcRn хорошо известны в данной области техники, см., например, Vaughn, D. et al, *Structure*, 6(1): 63-73, 1998; Kontermann, R. et al, *Antibody Engineering*, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, published by Springer, 2010; Yeung, Y. et al, *Cancer Research*, 70: 3269-3277 (2010); and Hinton, P. et al, *J. Immunology*, 176:346-356 (2006).

[000178] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε эпсилон антитела или антиген-связывающие фрагменты включают одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). Некоторые аминокислотные остатки в CH2 домене Fc области также могут быть заменены для обеспечения повышенной активности ADCC. Альтернативно или дополнительно, углеводные структуры на антителе могут быть заменены для усиления активности ADCC. Использование методов инженерии антител для изменения активности ADCC известно из уровня техники, см., например, Shields RL. et al., *J Biol Chem*. 2001. 276(9): 6591-604; Idusogie EE. et al., *J Immunol*. 2000,164(8):4178-84; Steurer W. et al., *J Immunol*. 1995, 155(3): 1165-74; Idusogie EE. et al., *J Immunol*. 2001, 166(4): 2571-5; Lazar GA. et al., *PNAS*, 2006, 103(11): 4005-4010; Ryan MC. et al., *Mol. Cancer Ther.*, 2007, 6: 3009-3018; Richards JO., et al., *Mol Cancer Ther.* 2008, 7(8): 2517-27; Shields R. L. et al, *J. Biol. Chem*, 2002, 277: 26733-26740; Shinkawa T. et al, *J. Biol. Chem*, 2003, 278: 3466-3473.

[000179] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε эпсилон антитела или антиген-связывающие фрагменты включают одну или несколько аминокислотных замен, которые изменяют комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), например, путем

улучшения или уменьшения C1q связывания и/или CDC (см., например, WO99/51642; Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821); и WO94/29351, что касается других примеров вариантов Fc области.

[000180] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε эпсилон антитела или антиген-связывающие фрагменты включают одну или несколько аминокислотных замен на границе области Fc для облегчения и/или промотирования гетеродимеризации. Эти модификации включают введение выступа в первый полипептид Fc и полости во второй полипептид Fc, при этом выступ может быть расположен в полости так, чтобы способствовать взаимодействию первого и второго полипептидов Fc с образованием гетеродимера или комплекса. Способы генерирования антител с этими модификациями известны в данной области, например, как описано в патенте США № 5731168.

[000181] Антиген-связывающие фрагменты

[000182] В настоящей заявке также представлены анти-CD3ε эпсилон антиген-связывающие фрагменты. Различные типы антиген-связывающих фрагментов известны в данной области техники и могут быть разработаны на основе анти-CD3ε эпсилон антитела по настоящему изобретению, включая, например, иллюстративные антитела, последовательности CDR и FR которых показаны в Таблицах 1 и 2, и их различные варианты (такие как варианты аффинности, варианты гликозилирования, Fc варианты, цистеин-сконструированные варианты и т.д.).

[000183] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3ε эпсилон антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящей заявке, представляет собой камелизированное однодоменное антитело, диатело, одноцепочечный Fv фрагмент (scFv), scFv димер, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, биспецифическое антитело, ds диатело, нанотело, доменное антитело, однодоменное антитело или бивалентное доменное антитело.

[000184] Для получения таких антиген-связывающих фрагментов можно использовать различные методы. Иллюстративные методы включают ферментативное расщепление интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); и Brennan et al., Science, 229:81 (1985)), рекомбинантную экспрессию клетками-хозяевами, такими как E.coli (например, для фрагментов антител Fab, Fv и ScFv), скрининг из библиотеки фагового дисплея, как обсуждалось выше (например, для ScFv), и химическое связывание двух фрагментов Fab'-SH с образованием F(ab')₂ фрагмента (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Другие способы получения фрагментов антител будут очевидны для квалифицированного специалиста.

[000181] В некоторых вариантах осуществления антиген-связывающий фрагмент представляет собой scFv. Получение scFv описано, например, в WO 93/16185; патентах США №№ 5571894; и 5587458. scFv может быть слит с эффекторным белком на аминокислотном или карбокси-конце с получением слитого белка (см., например, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck).

[000186] Биспецифические антитела, мультивалентные антитела

[000187] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, являются бивалентными, тетравалентными, гексавалентными или мультивалентными. В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, являются моноспецифическими или биспецифическими.

[000188] Термин “валентный” в контексте настоящей заявки относится к присутствию определенного количества сайтов связывания антигена в данной молекуле. Таким образом, термины “бивалентная”, “тетравалентная” и “гексавалентная” означают присутствие двух сайтов связывания, четырех сайтов связывания и шести сайтов связывания, соответственно, в антиген-связывающей молекуле. Бивалентная молекула может быть моноспецифической, если два сайта связывания являются оба специфическими для связывания одного и того же антигена или одного и того же эпитопа. Подобным образом, трехвалентная молекула может быть биспецифической, например, когда два сайта связывания являются моноспецифическими в отношении первого антигена (или эпитопа), а третий сайт связывания является специфическим в отношении второго антигена (или эпитопа).

[000189] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, могут быть моноспецифическими, но бивалентными, трехвалентными или тетравалентными, с по меньшей мере двумя сайтами связывания, специфическими в отношении одного и того же антигена или эпитопа. Это, в некоторых вариантах осуществления, представляет более сильное связывание с антигеном или эпитопом, чем у моновалентного аналога. В некоторых вариантах осуществления, в бивалентном антиген-связывающем фрагменте, первая валентность сайта связывания и вторая валентность сайта связывания структурно идентичны (т.е. имеют одинаковые последовательности) или структурно разные (т.е. имеют разные последовательности, хотя с одинаковой специфичностью).

[000190] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, являются биспецифическими. В некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, имеют первую специфичность в отношении CD3эпсилон и вторую специфичность. В некоторых вариантах осуществления вторая специфичность проявляется в отношении CD3эпсилон, но других эпитопов. В некоторых вариантах осуществления вторая специфичность проявляется в отношении второго антигена, отличного от CD3эпсилон, и присутствие которого близко к CD3эпсилон-экспрессирующим Т-клеткам желательно для того, чтобы второй антиген распознавался иммунной системой. Например, приводя CD3эпсилон-экспрессирующие Т-клетки в непосредственную близость с опухолевым антигеном или антигеном патогенного организма и, таким образом, способствуя распознаванию или элиминации такого антигена иммунной системой.

[000191] В некоторых вариантах осуществления вторая специфичность проявляется в отношении опухоль-ассоциированного антигена или его эпитопа. Термин “опухоль-ассоциированный антиген” относится к антигену, который присутствует или может быть презентируван на поверхности опухолевых клеток, и который находится на или в опухолевых клетках. В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированные антигены могут презентироваться только опухолевыми клетками, а не нормальными, то есть неопухолевыми клетками. В некоторых других вариантах осуществления опухоль-ассоциированные антигены могут экспрессироваться исключительно на опухолевых клетках или могут представлять собой опухоль-специфическую мутацию по сравнению с неопухолевыми клетками. В некоторых других вариантах осуществления опухоль-ассоциированные антигены могут присутствовать как в опухолевых клетках, так и в неопухолевыми клетках, но они сверхэкспрессируются на опухолевых клетках по сравнению с неопухолевыми клетками или доступны для связывания антителами в опухолевых клетках из-за менее компактной структуры опухолевой ткани по сравнению с неопухолевой тканью. В некоторых вариантах осуществления опухоль-ассоциированный антиген находится в сосудистой сети опухоли.

[000192] Иллюстративными примерами опухоль-ассоциированного антигена являются CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD34, CD37, CD44v6, CD45, CD133, Fms-подобная тирозинкиназа 3 (FLT-3, CD135), хондроитинсульфат протеогликан 4 (CSPG4, меланома-ассоциированный хондроитинсульфат протеогликан), рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), Her2, Her3, IGFR, IL3R, фибробласт-активирующий белок (FAP), CDCP1, Derlin1, Тенасцин, связанный с ожогом белок 1-10, сосудистые антигены VEGFR2 (KDR/FLK1), VEGFR3 (FLT4, CD309), PDGFR-альфа (CD140a), PDGFR-бета (CD140b), Эндоглин, CLEC14, Tem1-8 и Tie2. Другие примеры могут включать A33, CAMPATH-1 (CDw52), карциноэмбрионный антиген (CEA), карбоангидразу IX (MN/CA IX), de2-7, EGFR, EGFRvIII, EpCAM, Ep-CAM, фолат-связывающий белок, G250, Fms-подобную тирозинкиназу 3 (FLT-3, CD135), c-Kit(CD117), CSF1R (CD115), HLA-DR, IGFR, IL-2 рецептор, IL3R, MCSP (меланома-ассоциированный клеточно-поверхностный хондроитинсульфат протеогликан), Muc-1, простата-специфический мембранный антиген (PSMA), антиген стволовой клетки простаты (PSCA), простата-специфический антиген (PSA) и TAG-72.

[000193] Биспецифические антитела и антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, можно получить любыми подходящими способами, известными в данной области техники. Традиционный подход включает коэкспрессию двух пар тяжелая цепь-легкая цепь иммуноглобулина, имеющих разные антиген-специфичности, в клетке-хозяине с получением биспецифических антител рекомбинантным путем (см., например, Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983)), с последующей очисткой методом аффинной хроматографии.

[000194] Рекомбинантный подход также можно использовать, когда последовательности, кодирующие вариабельные домены тяжелой цепи антитела для двух

специфичностей, соответственно сливаются с последовательностями константного домена иммуноглобулина с последующим встраиванием в вектор экспрессии, который ко-транспицируют с вектором экспрессии для последовательностей легких цепей в подходящую клетку-хозяин для рекомбинантной экспрессии биспецифического антитела (см., например, WO 94/04690; Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986)). Аналогично, димеры scFv также могут быть рекомбинантно сконструированы и экспрессированы из клетки-хозяина (см., например, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).)

[000195] В другом способе пептиды лейциновой молнии из белков Fos и Jun могут быть связаны с Fab'-частями двух разных антител путем слияния генов. Связанные антитела восстанавливают в шарнирной области до четырех половинных антител (т.е. мономеров) и затем повторно окисляют с образованием гетеродимеров (Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148 (5): 1547-1553 (1992)).

[000196] Два антиген-связывающих домена также могут быть конъюгированы или сшиты с образованием биспецифического антитела или антиген-связывающего фрагмента. Например, одно антитело может быть связано с биотином, а другое антитело с авидином, и сильная ассоциация между биотином и авидином может связать в комплекс эти два антитела с образованием биспецифического антитела (см., например, патент США № 4676980; WO 91/00360, WO 92/00373 и EP 03089). В другом примере два антитела или антиген-связывающих фрагмента могут быть сшиты обычными способами, известными в данной области, например, как описано в патенте США № 4676980.

[000197] Биспецифические антиген-связывающие фрагменты могут быть получены из биспецифического антитела, например, путем протеолитического расщепления или путем химического связывания. Например, антиген-связывающий фрагмент (например, Fab') антитела может быть получен и преобразован в Fab'-тиольное производное, а затем можно осуществить его смешивание и взаимодействие с другим преобразованным Fab'-производным, обладающим другой антигенной специфичностью, с образованием биспецифического антиген-связывающего фрагмента (см., например, Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)).

[000198] В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело или его антиген-связывающие фрагменты могут быть сконструированы так, чтобы на границе раздела сформировалась ассоциация “выступ-во-впадину” для промотирования гетеродимеризации двух разных антиген-связывающих сайтов. “Выступ-во-впадину” в контексте настоящей заявки относится к взаимодействию между двумя полипептидами (такими как СНЗ домен), где один полипептид имеет выпуклость (то есть “выступ”) из-за присутствия аминокислотного остатка, имеющего объемную боковую цепь (например, тирозин или триптофан), а другой полипептид имеет полость (то есть “впадину”), где находится небольшой аминокислотный остаток боковой цепи (например, аланин или треонин), и выпуклость располагается в полости, чтобы способствовать взаимодействию двух полипептидов с образованием гетеродимера или комплекса. Способы получения

полипептидов с “выступом-во-впадину” известны в данной области, например, как описано в патенте США № 5731168.

[000199] Конъюгаты

[000200] В некоторых вариантах осуществления анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты также включают конъюгат. Конъюгат может быть связан с антителами и их антиген-связывающими фрагментами. Конъюгат представляет собой небелковый фрагмент, который может быть присоединен к антителу или его антиген-связывающему фрагменту. Предполагается, что различные конъюгаты могут быть связаны с антителами или антиген-связывающими фрагментами, представленными в настоящей заявке (см., например, “Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989)). Эти конъюгаты могут быть связаны с антителами или антиген-связывающими фрагментами посредством ковалентного связывания, аффинного связывания, интеркаляции, координационного связывания, комплексообразования, ассоциации, смешивания или присоединения, среди других способов.

[000201] В некоторых вариантах осуществления антитела и антиген-связывающие фрагменты, раскрытые в настоящей заявке, могут быть сконструированы так, чтобы они содержали специфические сайты вне эпитоп-связывающей части, которые можно использовать для связывания с одним или несколькими конъюгатами. Например, такой сайт может включать один или несколько реакционноспособных аминокислотных остатков, таких как, например, цистеиновые или гистидиновые остатки, для облегчения ковалентного связывания с конъюгатом.

[000202] В некоторых вариантах осуществления антитела могут быть связаны с конъюгатом опосредованно или через другой конъюгат. Например, антитело или антиген-связывающие фрагменты могут быть конъюгированы с биотином, затем опосредованно конъюгированы с вторым конъюгатом, который конъюгирован с авидином. Конъюгат может представлять собой токсин (например, химиотерапевтическое средство), определяемую метку (например, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку или фермент-субстрат метку).

[000203] “Токсин” может представлять собой любое вещество, которое вредно для клеток или которое может повреждать или убивать клетки. Примеры токсина включают, без ограничения, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиамин платина (II) (DDP), цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин,

(прежнее название дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

[000204] Примеры определяемой метки могут включать флуоресцентные метки (например, флуоресцеин, родамин, дансил, фикоэритрин или тexasский красный), фермент-субстрат метки (например, пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, люциферазы, глюкоамилаза, лизозим, сахаридоксидазы или β -D-галактозидаза), радиоизотопы (например, ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ^3H , ^{111}In , ^{112}In , ^{14}C , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi и ^{32}P , другие лантаниды, люминесцентные метки), хромофорную группу, дигоксигенин, биотин/авидин, молекулу ДНК или золото для детекции.

[000205] В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой модифицирующий фармакокинетику фрагмент, который способствует увеличению периода полужизни антитела. Иллюстративный пример включает водорастворимые полимеры, такие как ПЭГ, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль и т.п. Полимер может иметь любую молекулярную массу и может быть разветвленным или неразветвленным. Количество полимеров, прикрепленных к антителу, может варьироваться, и, если присоединено более одного полимера, они могут быть одинаковыми или разными молекулами.

[000206] В некоторых вариантах осуществления конъюгат может представлять собой компонент для очистки, такой как магнитный шарик.

[000207] В некоторых вариантах осуществления антитела и их антиген-связывающие фрагменты, представленные в настоящей заявке, используются для основы для конъюгата.

[000208] Полинуклеотиды и рекомбинантные методы

[000209] Настоящее изобретение представляет выделенные полинуклеотиды, которые кодируют анти-CD3эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты. В некоторых вариантах осуществления выделенные полинуклеотиды включают одну или несколько нуклеотидных последовательностей, показанных в SEQ в NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 и/или 120, которые кодируют переменную область иллюстративных антител, представленных в настоящей заявке. ДНК, кодирующую моноклональное антитело, легко выделяют и секвенируют с использованием традиционных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи антитела). Кодирующую ДНК также можно получить способами синтеза.

[000210] Выделенный полинуклеотид, который кодирует анти-CD3-эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты (например, включающий последовательности, показанные в SEQ IN NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102,

104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 и/или 120), может быть встроен в вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или для экспрессии с использованием рекомбинантных методов, известных из уровня техники. Существует множество известных векторов. Компоненты вектора обычно включают, но не ограничиваются этим, одно или несколько из следующего: сигнальная последовательность, ориджин репликации, один или несколько маркерных генов, энхансерный элемент, промотор (например, SV40, CMV, EF-1 α) и последовательность терминации транскрипции.

[000211] В некоторых вариантах осуществления векторная система включает системы млекопитающих, бактериальные, дрожжевые системы и т.д. и включает плазмиды, такие как, но не ограничиваясь этим, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pCMV, pEGFP, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMD18-T, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS420, pLexA, pACT2.2 и т.д., и другие лабораторные и коммерчески доступные векторы. Подходящие векторы могут включать, плазмидные или вирусные векторы (например, репликативно-дефектные ретровирусы, аденовирусы и адено-ассоциированные вирусы).

[000212] Векторы, включающие полинуклеотидную последовательность, кодирующую антитело или антиген-связывающий фрагмент, можно ввести в клетку-хозяин для клонирования или экспрессии генов. Подходящими клетками-хозяевами для клонирования или экспрессии ДНК в векторах в настоящем изобретении являются клетки прокариот, дрожжей или высших эукариот, описанные выше. Подходящие прокариоты для этой цели включают eubacteria, такие как грамотрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как Escherichia, например, E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, например, Salmonella typhimurium, Serratia, например, Serratia marcescans и Shigella, а также Bacilli, такие как B. subtilis и B. licheniformis, Pseudomonas, такие как P. aeruginosa и Streptomyces.

[000213] В дополнение к прокариотам эукариотические микробы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, являются подходящими хозяевами для клонирования или экспрессии векторов, кодирующих анти-CD3-эпсилон антитела. Из низших эукариотических микроорганизмов-хозяев наиболее часто используются Saccharomyces cerevisiae, или обычные пекарские дрожжи. Однако ряд других родов, видов и штаммов являются общедоступными и полезны в настоящем изобретении, например Schizosaccharomyces pombe; Kluyveromyces хозяева, такие как, например, K. lactis, K. fragilis (ATCC 12,424), K. bulgaricus (ATCC 16,045), K. wickeramii (ATCC 24,178), K. waltii (ATCC 56,500), K. drosophilae (ATCC 36,906) K. thermotolerans и K. marxianus; Yarrowia (EP 402,226); Pichia pastoris (EP 183070); Candida; Trichoderma reesei (EP 244,234); Neurospora crassa; Schwanniomyces, такие как Schwanniomyces occidentalis; и нитчатые грибы, такие как хозяева Neurospora, Penicillium, Tolypocladium и Aspergillus, такие как A. nidulans и A. niger

[000214] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии гликозилированных антител

или антиген-фрагмента, представленных в настоящей заявке, происходят из многоклеточных организмов. Примеры клеток беспозвоночных включают клетки растений и насекомых. Были идентифицированы многочисленные бакуловирусные штаммы и варианты и соответствующие клетки-хозяева, такие как перmissive клетки насекомых из таких хозяев, как *Spodoptera frugiperda* (гусеница), *Aedes aegypti* (комар), *Aedes albopictus* (комар), *Drosophila melanogaster* (плодовая мушка) и *Bombyx mori*. Разнообразные вирусные штаммы для трансфекции являются общедоступными, например, вариант L-1 *Autographa californica* NPV и Vm-5 штамм *Bombyx mori* NPV, и такие вирусы могут быть использованы в качестве вируса в соответствии с настоящим изобретением, в частности для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. Растительные клетки таких культур, как хлопок, кукуруза, картофель, соя, петуния, томаты и табак, также можно использовать в качестве хозяев.

[000215] Однако наибольший интерес представляют клетки позвоночных, и размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой культуре) стало рутинной процедурой. Примеры полезных клеточных линий млекопитающих в качестве хозяев включают линию клеток CV1 почки обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию клеток почки человеческого эмбриона (293 или 293 клетки субклонированные для роста в суспензионной культуре, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); линию клеток почки новорожденного хомяка (ВНК, ATCC CCL 10); клетки яичников китайского хомячка/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1587); клетки цервикальной карциномы человека (HELA, ATCC CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легкого человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); мышиную опухоль молочной железы (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI клетки (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 клетки; FS4 клетки; и линию клеток гепатомы человека (Hep G2). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой 293F клетку.

[000216] Клетки-хозяева трансформируют описанными выше экспрессирующими или клонирующими векторами для продукции анти-CD3-эпсилон антитела и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных соответствующим образом для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих желаемые последовательности. В другом варианте осуществления антитело может быть получено путем гомологичной рекомбинации, известной в данной области.

[000217] Клетки-хозяева, используемые для продуцирования антител или антиген-связывающих фрагментов, представленных в настоящей заявке, можно культивировать в различных средах. Коммерчески доступные среды, такие как среда Хэма F10 (Sigma), минимальная питательная среда (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и модифицированная

Дульбекко среда Игла (DMEM), Sigma), являются подходящими для культивирования клеток-хозяев. Кроме того, любой из носителей, описанных в Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), патентах США №№ 4767704; 4657866; 4927762; 4560655; или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; или U.S. Pat. Re. 30,985, можно использовать в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любую из этих сред можно при необходимости дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такие как аденозин и тимидин), антибиотиками (такие как препарат GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемые как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые должны быть известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т.п., являются такими, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны для специалиста в данной области техники.

[000218] При использовании рекомбинантных методов антитело может продуцироваться внутриклеточно, в периплазматическом пространстве или непосредственно секретироваться в среду. Если антитело продуцируется внутриклеточно, в качестве первой стадии, клеточный дебрис в виде частиц, либо клетки-хозяева, либо лизированные фрагменты удаляют, например центрифугированием или ультрафильтрацией. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) описывают процедуру выделения антител, которые секретировались в периплазматическое пространство E.coli. Вкратце, клеточную пасту размораживают в присутствии ацетата натрия (pH 3,5), EDTA и фенолметилсульфонилфторида (PMSF) в течение примерно 30 минут. Клеточный дебрис можно удалить центрифугированием. Когда антитело секретировалось в среду, супернатанты из таких систем экспрессии обычно сначала концентрируют с использованием коммерчески доступного фильтра для концентрации белка, например, ультрафильтрационной установки Amicon или Millipore Pellicon. Ингибитор протеазы, такой как PMSF, может быть включен в любую из вышеуказанных стадий для ингибирования протеолиза, и антибиотики могут быть включены для предотвращения роста случайных загрязняющих веществ.

[000219] Анти-CD3-эпсилон антитела и их антиген-связывающие фрагменты, полученные из клеток, могут быть очищены, например, с использованием хроматографии на гидроксилapatите, гель-электрофореза, диализа, ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, осаждения сульфатом аммония, высаливания и аффинной хроматографии, при этом аффинная хроматография является предпочтительным методом очистки.

[000220] В некоторых вариантах осуществления белок А, иммобилизованный на твердой фазе, используется для иммуноаффинной очистки антитела и его антиген-

связывающего фрагмента. Пригодность белка А в качестве аффинного лиганда зависит от вида и изотипа любого Fc домена иммуноглобулина, который присутствует в антителе. Белок А можно использовать для очистки антител на основе человеческих тяжелых цепей гамма1, гамма2 или гамма4 (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). Белок G рекомендован для всех мышинных изотипов и для человеческого гамма3 (Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)). Матрица, к которой присоединен аффинный лиганд, чаще всего является агарозной, но существуют и другие матрицы. Механически стабильные матрицы, такие как стекло с контролируемыми порами или поли(стиролдивинил)бензол, обеспечивают более высокие скорости потока и более короткое время обработки, чем это может быть достигнуто с агарозой. Когда антитело включает CH3 домен, для очистки полезна смола Bakerbond ABX.TM. (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.). Другие методы очистки белков, такие как фракционирование на ионообменной колонке, осаждение этанолом, обращенно-фазовая ВЭЖХ, хроматография на силикагеле, хроматография на гепарин-СЕФАРОЗЕ™ на анионной или катионообменной смоле (такой как колонка с полиаспарагиновой кислотой), хроматофокусирование, SDS-PAGE и осаждение сульфатом аммония, также доступны в зависимости от антитела, которое нужно выделить.

[000221] После любой стадии(стадий) предварительной очистки смесь, включающую антитело, представляющее интерес, и примеси, можно подвергнуть хроматографии гидрофобных взаимодействий при низком рН с использованием элюирующего буфера при рН около 2,5-4,5, предпочтительно осуществляемой при низких концентрациях солей (например, около 0-0,25М соли).

[000222] Фармацевтическая композиция

[000223] Настоящее изобретение также представляет фармацевтические композиции, включающие анти-CD3ε антитела или их антиген-связывающие фрагменты и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей.

[000224] Фармацевтически приемлемые носители для использования в фармацевтических композициях, раскрытых в настоящей заявке, могут включать, например, фармацевтически приемлемые жидкие, гелеобразные или твердые носители, водные носители, неводные носители, антимикробные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, анестетики, суспендирующие/дозировочные агенты, секвестранты или хелатообразующие агенты, разбавители, адъюванты, эксципиенты или нетоксичные вспомогательные вещества, другие компоненты, известные в данной области техники или различные комбинации вышеперечисленных.

[000225] Подходящие компоненты могут включать, например, антиоксиданты, наполнители, связующие, разрыхлители, буферы, консерванты, смазывающие вещества, ароматизаторы, загустители, красители, эмульгаторы или стабилизаторы, такие как сахара и циклодекстрины. Подходящие антиоксиданты могут включать, например, метионин, аскорбиновую кислоту, EDTA, тиосульфат натрия, платину, каталазу, лимонную кислоту, цистеин, тиоглицерин, тиогликолевую кислоту, тиосорбит, бутилированный гидроксанитол, бутилированный гидрокситолуол и/или пропилгаллат. Как раскрыто в

настоящей заявке, включение одного или нескольких антиоксидантов, таких как метионин, в композицию, содержащую антитело или антиген-связывающий фрагмент и конъюгаты, как предусмотрено в настоящей заявке, уменьшает окисление антитела или антиген-связывающего фрагмента. Это снижение окисления предотвращает или уменьшает потерю аффинности связывания, улучшая, таким образом, стабильность антител и максимизируя срок хранения. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления обеспечиваются композиции, которые содержат одно или несколько антител или антиген-связывающих фрагментов, как описано в настоящей заявке, и один или несколько антиоксидантов, таких как метионин. Кроме того, обеспечиваются способы предотвращения окисления, продления срока хранения и/или повышения эффективности антитела или антиген-связывающего фрагмента, представленных в настоящей заявке, путем смешивания антитела или антиген-связывающего фрагмента с одним или несколькими антиоксидантами, такими как метионин.

[000226] Для дальнейшей иллюстрации, фармацевтически приемлемые носители могут включать, например, водные носители, такие как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильная вода для инъекций или раствор декстрозы и лактата Рингера для инъекций, неводные носители, такие как нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло или арахисовое масло, противомикробные агенты в бактериостатических или фунгистатических концентрациях, изотонические агенты, такие как хлорид натрия или декстроза, буферы, такие как фосфатные или цитратные буферы, антиоксиданты, такие как бисульфат натрия, местные анестетики, такие как гидрохлорид прокаина, суспендирующие и диспергирующие агенты, такие как натрий карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидон, эмульгаторы, такие как полисорбат 80 (TWEEN-80), секвестрирующие или хелатообразующие агенты, такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) или EGTA (этиленгликольтетрауксусная кислота), этиловый спирт, пропиленгликоль, гидроксид натрия, хлористоводородная кислота, лимонная кислота или молочная кислота. Антимикробные агенты, используемые в качестве носителей, могут быть добавлены к фармацевтическим композициям в многодозовых контейнерах, которые включают фенолы или крезолы, ртутные соединения, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные эфиры метил- и пропил-п-гидроксибензойной кислоты, тимеросал, бензалконийхлорид и бензетонийхлорид. Подходящие эксципиенты могут включать, например, воду, физиологический раствор, декстрозу, глицерин или этанол. Подходящие нетоксичные вспомогательные вещества могут включать, например, смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные агенты, стабилизаторы, усилители растворимости или такие вещества, как ацетат натрия, сорбитанмонолаурат, триэтаноламинолеат или циклодекстрин.

[000227] Фармацевтические композиции могут представлять собой жидкий раствор, суспензию, эмульсию, пилюлю, капсулу, таблетку, композицию с замедленным

высвобождением или порошок. Композиции для перорального введения могут включать стандартные носители, такие как фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала, стеарата магния, поливинилпирролидона, натрий сахарина, целлюлозы, карбоната магния и т.д.

[000228] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции сформулированы в виде композиции для инъекций. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть получены в любой обычной форме, такой как, например, жидкий раствор, суспензия, эмульсия или твердые формы, подходящие для получения жидкого раствора, суспензии или эмульсии. Препараты для инъекций могут включать стерильные и/или апирогенные растворы, готовые для инъекции, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые для объединения с растворителем непосредственно перед использованием, включая гиподермические таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекции, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые для объединения с носителем непосредственно перед использованием, и стерильные и/или апирогенные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

[000229] В некоторых вариантах осуществления парентеральные препараты в виде стандартных доз упакованы в ампулу, флакон или шприц с иглой. Все препараты для парентерального введения должны быть стерильными, апирогенными, как это известно и практикуется в данной области.

[000230] В некоторых вариантах осуществления стерильный лиофилизированный порошок получают растворением антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанного в настоящей заявке, в подходящем растворителе. Растворитель может содержать эксципиент, который улучшает стабильность, или другие фармакологические компоненты порошка или восстановленного раствора, приготовленного из порошка. Эксципиенты, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются этим, воду, декстрозу, сорбитал, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другой подходящий агент. Растворитель может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники, в одном варианте осуществления, с приблизительно нейтральным pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, дает желательную композицию. В одном варианте осуществления полученный раствор распределяют в флаконы для лиофилизации. Каждый флакон может содержать одну дозу или несколько доз анти-CD3-эпсилон антитела или его антиген-связывающего фрагмента или его композиции. Переполнение флаконов чуть выше необходимой дозы или нескольких доз (например, около 10%) является приемлемым, чтобы облегчить точный отбор проб и точное дозирование. Лيوфилизированный порошок можно хранить в подходящих условиях, например при температуре от около 4°C до комнатной температуры.

[000231] Восстановление лиофилизированного порошка водой для инъекций представляет композицию, которую можно использовать для парентерального введения. В одном варианте осуществления для восстановления к лиофилизированному порошку добавляют стерильную и/или апиrogenную воду или другой жидкий подходящий носитель. Точное количество зависит от выбранной терапии и может быть определено эмпирически.

[000232] Способы применения

[000233] Настоящее изобретение также представляет терапевтические способы, включающие: введение терапевтически эффективного количества антитела или антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению пациенту, осуществляя таким образом лечение или профилактику CD3-связанного состояния или расстройства. В некоторых вариантах осуществления CD3-связанное состояние или расстройство представляет собой онкологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

[000234] Примеры онкологического заболевания включают, но не ограничиваются этим, немелкоклеточный рак легкого (сквамозный/несквамозный), мелкоклеточный рак легкого, почечно-клеточный рак, колоректальный рак, рак толстой кишки, рак яичников, рак молочной железы (включая базальную карциному молочной железы, дуктальную карциному и лобулярную карциному молочной железы), рак поджелудочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак пищевода, мезотелиому, меланому, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, саркому, рак предстательной железы, глиобластому, рак шейки матки, карциному тимуса, меланому, миеломы, фунгоидные микозы, рак из клеток Меркеля, гепатоцеллюлярную карциному (HCC), фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, лимфоидное злокачественное заболевание, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному слюнной железы, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитомы, карциному слюнной железы, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, цервикальный рак, тестикулярный рак, семиному, классическую лимфому Ходжкина (CHL), первичную медиастинальную крупноклеточную В-клеточную лимфому, Т-клеточную/богатую гистиоцитами В-клеточную лимфому, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, хронический миелоцитарный (гранулоцитарный) лейкоз, хронический миелогенный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, истинную полицитемию, опухоли, происходящие из тучных клеток, EBV-положительный и -отрицательный PTLD и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), плазмобластную лимфому, экстранодальную NK/Т-клеточную лимфому, назофарингеальную карциному, HHV8-ассоциированную первичную эффузионную лимфому, неходжкинскую лимфому,

множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей, миелодиспластический синдром, волосистоклеточный лейкоз и миелодисплазию, первичную лимфому ЦНС, опухоль оси позвоночника, глиому ствола головного мозга, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую неврому, олигодендроглиому, менангиому, меланому, нейробластому и ретинобластому.

[000235] Аутоиммунные заболевания включают, но не ограничиваются ими, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД, который представляет собой вирусное заболевание с аутоиммунным компонентом), очаговую алопецию, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТР), болезнь Бехчета, кардиомиопатию, глютеную болезнь-гепетиформный дерматит; синдром хронической усталости и иммунную дисфункцию (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD), рубцовую пузырчатку, синдром холодовой агглютинации, CREST-синдром, болезнь Крона, болезнь Дегоса, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию-фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТР), IgA-нефропатию, инсулинозависимый сахарный диабет, ювенильный хронический артрит (болезнь Стилла), ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Меньера, смешанную болезнь соединительной ткани, рассеянный склероз, тяжелую миастению, пернициозную анемию, узловатый полиартериит, полихондрит, полигландулярный синдром, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, синдром Рейно, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию (прогрессирующий системный склероз (PSS), также известный как системный склероз (SS)), синдром Шегрена, синдром ригидности, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, витилиго и гранулематоз Вегенера. Воспалительные расстройства включают, например, хронические и острые воспалительные расстройства. Примеры воспалительных расстройств включают болезнь Альцгеймера, астму, atopическую аллергию, аллергию, атеросклероз, бронхиальную астму, экзему, гломерулонефрит, болезнь трансплантат-против-хозяина, гемолитические анемию, остеоартрит, сепсис, инсульт, трансплантацию тканей и органов, васкулит, диабетическую ретинопатию и вентилятор-ассоциированное повреждение легких. В некоторых вариантах осуществления CD3-ассоциированные состояния представляют собой воспалительные заболевания, такие как системная красная волчанка (SLE), воспаление слизистой оболочки кишечника, истощающее заболевание, связанное с

колитом, рассеянный склероз, вирусные инфекции, ревматоидный артрит, остеоартрит, болезнь Кона и воспалительное заболевание кишечника, псориаз, системную склеродермию, аутоиммунный диабет и т.п.

[000236] Инфекционные заболевания включают, но не ограничиваются этим, грибковую инфекцию, паразитарную/протозойную инфекцию или хроническую вирусную инфекцию, например, малярию, кокцидиомикоз *immitis*, гистоплазмоз, онихомикоз, аспергиллез, бластомикоз, молочницу, паракокцидиомикоз, микроспоридиоз, акантамебный кератит, амебиаз, аскаридоз, бабезиоз, балантидиаз, байлисаскаридоз, болезнь Шагаса, клонорхоз, кохлимиаз, криптоспоридиоз, дифиллоботриоз, дракункулез, эхинококкоз, слоновость, энтеробиоз, фасциолез, фасциолопсидоз, филяриоз, лямблиоз, гнатостомоз, гименолепидоз, изоспороз, лихорадку Катаяма, лейшманиоз, болезнь Лайма, метагонимоз, миаз, онхоцеркоз, педикулез, чесотку, шистосомоз, сонную болезнь, стронгилоидоз, тениоз, токсокариоз, токсоплазмоз, трихинеллез, трихуриаз, трипаносомоз, гельминтную инфекцию, инфекцию гепатита В (HBV), гепатита С (HCV), вирус герпеса, вирус Эпштейн-Барра, ВИЧ, цитомегаловирус, вирус простого герпеса типа I, вирус простого герпеса типа II, вирус папилломы человека, аденовирус, вирус иммунодефицита человека I, вирус иммунодефицита человека II, вирус герпеса, ассоциированный с саркомой Капоши, тонкий кольцевой вирус (*Torquetenovirus*), Т-лимфотропный вирус человека I, Т-лимфотропный вирус человека II, ветряную оспу, JC вирус или ВК вирус.

[000237] В другом аспекте представлены способы для лечения состояния у индивида, которому может быть полезна активация иммунного ответа, включающие введение терапевтически эффективного количества антитела или антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, пациенту.

[000238] Терапевтически эффективное количество антитела или антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, зависит от различных факторов, известных в данной области техники, таких как, например, масса тела, возраст, предыдущая история болезни, принимаемое лечение, состояние здоровья индивида и потенциальная возможность перекрестных реакций, аллергий, чувствительности и неблагоприятных побочных эффектов, а также от пути введения и степени развития заболевания. Специалист в данной области (например, лечащий врач или ветеринар) может пропорционально уменьшать или повышать дозы в соответствии с обстоятельствами и требованиями.

[000239] В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящей заявке, можно вводить при терапевтически эффективной дозе от около 0,01 мг/кг до около 100 мг/кг (например, около 0,01 мг/кг, около 0,5 мг/кг, около 1 мг/кг, около 2 мг/кг, около 3 мг/кг, около 5 мг/кг, около 10 мг/кг, около 15 мг/кг, около 20 мг/кг, около 25 мг/кг, около 30 мг/кг, около 35 мг/кг, около 40 мг/кг, около 45 мг/кг, около 50 мг/кг, около 55 мг/кг, около 60 мг/кг, около 65 мг/кг, около 70 мг/кг, около 75 мг/кг, около 80 мг/кг, около 85 мг/кг, около 90 мг/кг, около

95 мг/кг или около 100 мг/кг). В некоторых из этих вариантов осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент вводят при дозе около 50 мг/кг или меньше, и в некоторых из этих вариантов осуществления доза составляет 10 мг/кг или меньше, 5 мг/кг или меньше, 3 мг/кг или меньше, 1 мг/кг или меньше, 0,5 мг/кг или меньше, или 0,1 мг/кг или меньше. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза может меняться в ходе лечения. Например, в некоторых вариантах осуществления начальная вводимая доза может быть выше, чем последующие вводимые дозы. В некоторых вариантах осуществления вводимая доза может варьироваться в ходе лечения в зависимости от реакции индивида.

[000240] Схемы введения могут корректироваться для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить одну дозу или несколько дробных доз в течение определенного времени.

[000241] Антитела и антиген-связывающие фрагменты, раскрытые в настоящей заявке, можно вводить любым путем, известным в данной области, таким как, например, парентеральный (например, подкожный, интраперитонеальный, внутривенный, включая внутривенную инфузию, внутримышечную или внутрикожную инъекцию) или не парентеральный (например, пероральный, интраназальный, внутриглазной, сублингвальный, ректальный или местный) пути.

[000242] В некоторых вариантах осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты, раскрытые в настоящей заявке, можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами или агентами. Например, антитела или антиген-связывающие фрагменты, описанные в настоящей заявке, можно вводить в комбинации с другим терапевтическим средством, например химиотерапевтическим средством или противораковым лекарственным средством.

[000243] В некоторых из этих вариантов осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, раскрытые в настоящей заявке, которые вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, можно вводить одновременно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, и в некоторых из этих вариантов осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент и дополнительное терапевтическое средство(средства) можно вводить как часть одной и той же фармацевтической композиции. Однако антитело или антиген-связывающий фрагмент, вводимые “в комбинации” с другим терапевтическим средством, необязательно вводят одновременно или в одной и той же композиции с таким средством. Считается, что антитело или антиген-связывающий фрагмент, вводимый до или после другого средства, вводят “в комбинации” с этим средством, как эта фраза используется в настоящей заявке, даже если антитело или антиген-связывающий фрагмент и второе средство вводят разным путем. Там, где это возможно, дополнительные терапевтические средства, вводимые в комбинации с антителами или антиген-связывающими фрагментами, раскрытыми в настоящей заявке, вводят в соответствии со схемой,

указанной в информационном листке для дополнительного терапевтического средства, или в соответствии со Справочником врача 2003 года (Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (November 2002)) или протоколами, хорошо известными в данной области.

[000244] Настоящее изобретение также представляет способы применения анти-CD3эпсилон антител или их антиген-связывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы активации CD3эпсилон-экспрессирующих Т-клеток *in vivo* или *in vitro*, включающие: контактирование CD3эпсилон-экспрессирующих Т-клеток с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы модуляции CD3 активности в CD3эпсилон-экспрессирующей клетке, включающие воздействие антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, на CD3эпсилон-экспрессирующую клетку.

[000245] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы промотирования *in vivo* или *in vitro* процессинга второго антигена CD3эпсилон-экспрессирующей Т-клеткой, включающие контактирование CD3эпсилон-экспрессирующих Т-клеток с биспецифическим антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке, где биспецифическое антитело или антиген-связывающий фрагмент способны специфически связываться как с CD3эпсилон-экспрессирующими Т-клетками, так и с вторым антигеном, приводя их таким образом в непосредственную близость.

[000246] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы детекции присутствия или количества CD3эпсилон в образце, включающие контактирование образца с антителом или его антиген-связывающим фрагментом и определение присутствия или количества CD3эпсилон в образце.

[000247] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение представляет способы диагностирования CD3-связанного заболевания или состояния у индивида, включающие: а) получение образца от индивида; б) контактирование образца, полученного от индивида, с антителом или его антиген-связывающим фрагментом, представленным в настоящей заявке; с) определение присутствия или количества CD3эпсилон в образце; и d) соотнесение существования CD3эпсилон с CD3-связанным заболеванием или состоянием у индивида.

[000248] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также представляет применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по настоящему изобретению, для получения лекарственного средства для лечения CD3-связанного заболевания или состояния у индивида, для получения диагностического реагента для диагностирования CD3-связанного заболевания или состояния.

[000249] Следующие примеры приведены для лучшей иллюстрации заявленного изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все

конкретные композиции, материалы и способы, описанные ниже, полностью или частично, входят в объем настоящего изобретения. Эти конкретные композиции, материалы и способы предназначены не для ограничения изобретения, а просто для иллюстрации конкретных вариантов осуществления, охватываемых объемом изобретения. Специалист в данной области может разработать эквивалентные композиции, материалы и способы без использования изобретательских возможностей и без отступления от объема изобретения. Должно быть понятно, что в описанных в настоящей заявке процедурах можно осуществить множество изменений, не выходя при этом за рамки настоящего изобретения. Авторы изобретения предполагают, что такие варианты включены в объем изобретения.

ПРИМЕР 1: Получение антител с использованием гибридной технологии

[000250] 1.1 Иммунизация животных:

[000251] Включающие рекомбинантные внеклеточные домены (ECD) белки CD3 человека, включая человеческий CD3 эпсилон (CD3эпсилон) с His-меткой (cat. No.: 10977-H08H; Sino Biological Inc. Beijing, China), человеческий CD3 Гамма (CD3гамма) (cat. No.: ab140563; Abcam Shanghai China) и человеческий CD3 дельта (CD3дельта) с His-меткой (cat. No.: 10977-H08H; Sino Biological Inc. Beijing, China), использовали в качестве иммуногенов для иммунизации животных. Balb/c мышей закупили у Shanghai SLAC laboratory animal Co, Ltd. и помещали в IACUC-одобренный виварий. Мышей иммунизировали ECD белковой смесью, включающей CD3эпсилон, CD3гамма и CD3дельта, или иммунизировали 7×10^6 свежевыделенными человеческими Т-клетками для каждой мыши, смешанными с адьювантом Titermax, подкожной инъекцией и в подушку стопы, вводимыми через неделю.

[000252] Кровь собирали у мышей до и после иммунизации и сывороточные титры против белков-мишеней контролировали методом ELISA.

[000253] 1.2 Получение гибридом

[000254] Мышь с самым высоким сывороточным титром выбирали для слияния клеток. В-клетки из мышьиной селезенки и лимфоузлов сливали с клетками миеломы SP2/0 путем электрослияния в соответствии с общими процедурами электрослияния. После слияния клеток клетки высевали в 96-луночные планшеты с DMEM средой, дополненной 20% FBS и 1% селективных реагентов НАТ.

[000255] Антитела, присутствующие в супернатанте гибридной среды, скринировали с использованием CD3-экспрессирующих клеток Jurkat методом с проточным цитометром (FACS) и осуществляли обратный скрининг с использованием CD3-отрицательных MOLT-4 Т-клеток методом FACS. Гибридные клетки с активностью связывания с клетками Jurkat, но не перекрестного связывания с клетками MOLT-4, собирали как положительные гибридные клеточные линии и затем переходили к стадии субклонирования с использованием полутвердой среды.

[000256] Отдельные колонии высевали в 96-луночные планшеты с DMEM средой, дополненной 10% FBS, в течение 2~3 дней и снова скринировали против мишени CD3 с

использованием CD3-экспрессирующих клеток Jurkat методом, использующим проточный цитометр (FACS), и осуществляли обратный скрининг с использованием CD3-отрицательных MOLT-4 Т-клеток методом FACS.

[000257] 1.3 Секвенирование с использованием гибридом

РНК экстрагировали из гибридомных клеток и кДНК амплифицировали с использованием набора 5'-RACE, с последующей ПЦР-амплификацией с использованием 3'-вырожденных праймеров. ПЦР продукты затем клонировали рMD18-Т вектор, трансформировали, амплифицировали и секвенировали.

[000258] Получали восемь мышинных моноклональных антител, последовательности CDR которых показаны в Таблице 1 выше.

ПРИМЕР 2: Получение гуманизированного антитела

[000259] 2.1 Конверсия и гуманизация IgG

[000260] *Получение химерного антитела из мышинных mAb*: WBP3311_2.166.48 и WBP3311_2.306.4 и WBP3312_3,179,16 VH и VL гены реамплифицировали клонирующими праймерами, содержащими подходящие сайты рестрикции, и клонировали в экспрессирующий вектор, запатентованный WuXi Biologics, для создания соответствующих клонов химерных антител с константной областью человеческого IgG1.

[000261] *Гуманизация и синтез гуманизированных V-генов*: Подход “наилучшего соответствия” использовали для гуманизации легких и тяжелых цепей WBP3311_2.166.48 и WBP3311_2.306.4. Для аминокислотных последовательностей легких цепей соответствующие V-гены подвергали исследованию BLAST против собственной базы данных V-генов зародышевой линии человека. Последовательность гуманизированного VL-гена была получена путем замены человеческих последовательностей CDR в лучшем экземпляре мышинными последовательностями CDR, используя определение CDR по системе Кабата. Каркасы определяли с использованием продолженной CDR, где CDR1 по Кабату была удлинена на 5 аминокислот на N-конце. Было создано несколько гуманизированных последовательностей для каждой тяжелой цепи и легкой цепи путем BLAST-исследования мышинных каркасов против базы данных иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии. Различные FR комбинации были созданы и проанализированы на аффинность связывания, три лучших экземпляра использовали для получения последовательностей гуманизированных VH-генов. Гуманизированные гены подвергали обратной трансляции, кодон-оптимизации для экспрессии млекопитающими и синтезировали с использованием GeneArt Custom Gene Synthesis (Life Technologies). Синтетические гены повторно клонировали в вектор экспрессии IgG, экспрессировали и очищали. FR двух гуманизированных антител и их родительских мышинных антител показаны в Таблице 2 выше.

[000262] *Транзиентная экспрессия и очистка химерных и гуманизированных антител*: Химерные и гуманизированные антитела, описанные выше, встраивали в экспрессирующий вектор, запатентованный WuXi Biologics, и экспрессовали из 293F

клеток. Культуральный супернатант, содержащий соответствующие антитела, собирали и очищали с использованием хроматографии с Белком А.

ПРИМЕР 3: Исследование характеристик *in vitro*

[000263] 3.1 Связывание антител, определенное методом ELISA и FACS

[000264] Антигены, антитела и клетки, используемые в ELISA и FACS, которые описаны ниже, указаны в таблице 3.

[000265] Таблица 3. Антигены, антитела и клетки, используемые в ELISA и FACS

Таблица 3

Антигены, антитела и клетки, используемые в ELISA и FACS

Материал	Компания	№ по каталогу
Человеческий белок CD3 эпсилон (CD3эпсилон) (His-метка)	Sino Biological Inc.	10977-H08H
Человеческий белок CD3 дельта (CD3дельта) (His-метка)	Sino Biological Inc.	10981-H08H
Человеческий белок CD3 гамма (CD3гамма)	Abcam	ab140563
Белок CD3эпсилон яванского макака	ACRO	CDE-C5226
Суно PBMCs	PharmaLegacy Laboratories (Shanghai) Co.	
Мышиное моноклональное антитело против CD3эпсилон человека	Sino Biological Inc.	10977-MM03 (Клон №: 1A7E5G5)
Мышиное моноклональное антитело против человеческого CD3дельта	Sino Biological Inc.	10981-MM08
Мышиное моноклональное антитело против человеческого CD3дельта CD3гамма	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC	sc-55563
Эталонное антитело ОКТ3	Abcam	ab86883
Клетки Jurkat	ATCC	TIB-152
Клетки HUT78	ATCC	ECACC-880401901
Клетки MOLT-4	ATCC	CRL-1582
Полутвердая среда	Stemcells	03814

[000266] Связывание антител с белком, определенное с использованием ELISA и EC_{50} : Человеческие белки CD3эпсилон, CD3дельта и CD3гамма, соответственно, предварительно наносили на 96-луночные планшеты. Аффинность связывания восьми

mAb при различных концентрациях с внеклеточным доменом этих трех разных CD3 белков определяли при помощи соответствующих HRP меченных “вторых” антител. EC_{50} связывания (концентрация испытываемого антитела, при которой достигается полумаксимальное связывание), анализировали с использованием уравнения программы GraphPad Prism: Нелинейная регрессия (подбор кривой)-log (агонист) vs. ответ-Переменный угловой коэффициент.

[000267] *Специфическое связывание антител с человеческим белком CD3эпсилон, определенное методом ELISA*: Восемь мышинных mAb показали высокоспецифическую связывающую активность с CD3эпсилон человека без связывания с CD3гамма и CD3дельта, и данные показаны в Таблице 5.

[000268] Таблица 5. Специфическое связывание в отношении CD3эпсилон субъединицы человеческого белка

Таблица 5

Специфическое связывание в отношении CD3эпсилон субъединицы человеческого белка

mAb	ELISA (A450)		
	Человеческий CD3эпсилон (PC: 1,6; NC: 0,05)	Человеческий CD3гамма (PC: 1,21; NC: 0,05)	Человеческий CD3дельта (PC: 1,9; NC: 0,05)
W3311-2.166.48	1,64	0,05	0,05
W3311-2.306.4	1,46	0,06	0,05
W3311-2.383.47	1,61	0,05	0,05
W3311-2.400.5	1,57	0,05	0,05
W3311-2.482.5	1,33	0,06	0,05
W3311-2.488.33	1,70	0,06	0,05
W3311-2.615.8	1,55	0,05	0,05
W3311-2.844.8	1,54	0,07	0,06

[000269] *Клеточное связывание антител, определенное с использованием FACS и EC_{50}* : Различные концентрации испытываемых mAb добавляли к клеткам Jurkat и затем связывающую активность mAb на поверхности клеток определяли с использованием 2-го антитела-FITC. ОКТ3 использовали в качестве положительного контроля. Окрашенные клетки анализировали с использованием инструмента BD Biosciences FACSCanto II и программы Flow Jo Version. Значение EC_{50} связывания рассчитывали с использованием уравнения программы GraphPad Prism: Нелинейная регрессия (подбор кривой)-log (агонист) vs. ответ-Переменный угловой коэффициент.

[000270] *Специфическое связывание с человеческим CD3 рецептором на поверхности T-клеток*: Восемь mAb показали высокоспецифическую связывающую

активность с клетками, экспрессирующими человеческий CD3 (клетки Jurkat), без связывания с CD3-отрицательными клетками (MOTL-4 клетки и 293F клетки), как показано в Таблице 6.

[000271]

Таблица 6

Специфическое связывание с человеческим CD3 рецептором в различных клеточных линиях, определенное с использованием FACS

mAb	MFI (FACS) (JurkatB10: 3145□4045)	MFI (FACS) (MOLT-4: 22,7□27,3)	MFI (FACS) (293F:22,6□24,6)
W3311-2.166.48	2139	42,5	24,9
W3311-2.306.4	3365	53,5	29,1
W3311-2.383.47	2132	44,5	29,8
W3311-2.400.5	2741	54,5	25,1
W3311-2.482.5	2390	54,8	25,0
W3311-2.488.33	2266	58,4	30,2
W3311-2.615.8	2215	57,2	25,7
W3311-2.844.8	984	42,5	22,7

[000272] 3.2 Связывание антител с белком-мишенью из различных видов, определенное методом ELISA и FACS

[000273] Анализировали аффинности связывания испытываемых антител с CD3 из разных видов. Гомология человеческих, обезьяньих, крысиных и мышиных CD3 референсных последовательностей показана ниже.

[000274]

Таблица 4

Гомология последовательностей CD3 домена человека, обезьяны, крысы и мыши

Вид	CD3эпсилон (%)	CD3дельта (%)	CD3гамма (%)
Человек	100 (NP_000724)	100 (NP_000723)	100 (NP_000064)
Макака fascicularis (обезьяна)	83 (NP_001270544)	94 (NP_001274617)	81 (NP_001270839)
Макака mulatta (обезьяна)	84 (XP_001097204)	94 (NP_001097302)	82 (NP_001253854)
Мышь	59 (NP_031674)	64 (NP_038515)	70 (AAA37400)
Rattus norvegicus (крыса)	57 (NP_001101610)	69 (NP_037301)	71 (NP_001071114)

[000275] *Перекрестное связывание антител с CD3эпсилон яванского макака и CD3эпсилон мыши, определенное методом ELISA:* Различные концентрации испытываемых антител, положительный и отрицательный контроли добавляли в 96-луночные планшеты, которые предварительно покрывали белком CD3эпсилон яванского макака и CD3эпсилон мыши. Связывание антител с белком CD3эпсилон яванского макака и белком CD3эпсилон мыши определяли при помощи соответствующего HRP-меченного 2⁻¹⁰ антитела (BETHYL, A90-231P). EC₅₀ рассчитывали с использованием программы GraphPad Prism.

[000276] Как показывают данные, все восемь mAb показали сильную перекрестно-связывающую активность с CD3эпсилон яванского макака, но не показаны никакого связывания с мышиним CD3эпсилон. Положительный контроль ОКТЗ не показал перекрестно-связывающей активности ни с CD3эпсилон яванского макака, ни мышиним CD3эпсилон, Таблица 7.

[000277]

Таблица 7

Перекрестное связывание в сравнении с CD3эпсилон яванского макака и CD3эпсилон мыши

mAb	ELISA A450		
	CD3эпсилон человека	CD3эпсилон яванского макака	CD3эпсилон мыши
Отрицательный контроль	0,046	0,046	0,179
ОКТЗ	0,048	0,052	0,24
W3311-2.166.48	2,761	2,808	0,446
W3311-2.306.4	2,909	2,822	0,711
W3311-2.383.47	2,786	2,756	0,666
W3311-2.400.5	2,828	2,794	0,709
W3311-2.482.5	2,953	2,874	0,61
W3311-2.488.33	2,914	2,831	0,607
W3311-2.615.8	2,824	2,713	0,471
W3311-2.844.8	2,923	2,75	0,6

[000278] *Перекрестное связывание антител с CD3эпсилон яванского макака, определенное методом FACS:* РВМС яванского макака выделяли из цельной крови здоровых обезьян с использованием центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS и стадий 100g центрифугирования для удаления тромбоцитов. РВМС культивировали в полной RPMI-1640 среде до их готовности к использованию. Различные концентрации испытываемых антител добавляли к РВМС яванского макака и затем связывающую активность антител на поверхности клеток определяли с использованием 2-

го антитела-FITC (Jackson, 115-095-008). Окрашенные клетки анализировали с использованием BD Biosciences FACSCanto II и программы FlowJo Version. Значение EC_{50} связывания рассчитывали с использованием уравнения программы GraphPad Prism: Нелинейная регрессия (подбор кривой).

[000279] *Связывание эпитопа антителами, определенное методом FACS:* Различные концентрации испытываемых антител смешивали с некоторым количеством биотинилированного антитела W3311-2.383.47, соответственно. Затем смесь добавляли к CD3-экспрессирующим клеткам в 96-луночные планшеты и инкубировали при 4°C в течение 1 часа. Связывание целевого антитела на клетках, экспрессирующих CD3, определяли с использованием PE-конъюгированного анти-биотин Аб. Образцы испытывали методом проточной цитометрии и данные анализировали с использованием программы FlowJo.

[000280] *Связывание с человеческим белком CD3эпсилон и CD3эпсилон яванского макака и расчет EC_{50} методом ELISA:* Восемь mAb показали сильную связывающую активность с CD3эпсилон человека и перекрестное связывание с белком CD3эпсилон яванского макака и показали сопоставимые значения EC_{50} в низком нМ диапазоне для CD3эпсилон человека и CD3эпсилон яванского макака, как показано в Таблице 8.

[000281]

Таблица 8

EC_{50} восьми mAb для CD3эпсилон человека и CD3эпсилон яванского макака

mAb	CD3эпсилон человека EC_{50} (нМ)	CD3эпсилон яванского макака EC_{50} (нМ)
W3311-2.166.48	0,049	0,033
W3311-2.306.4	0,012	0,011
W3311-2.383.47	0,074	0,028
W3311-2.400.5	0,053	0,024
W3311-2.482.5	0,069	0,028
W3311-2.488.33	0,026	0,019
W3311-2.615.8	0,033	0,025
W3311-2.844.8	0,011	0,009
WBP331-ВМК1 (UCHL1)	0,186	NA
Изотипический контроль	NA	NA

[000282] 4.3 Детекция межвидового связывания гуманизированных антител

[000283] *Связывание двух гуманизированных mAb с белком CD3эпсилон яванского макака и значение EC_{50} :* Все данные показали, что оба гуманизированные mAb сохраняли высокую связывающую активность с белком CD3эпсилон яванского макака (см. Фиг. 1) с

значением EC_{50} , равным 0,043 нМ для обоих гуманизированных антител, как показано в Таблице 9.

[000284]

Таблица 9

EC_{50} двух гуманизированных mAb для CD3ε яванского макака

mAb	EC_{50} (нМ)
W3311-2.166.48-z1-uIgG1K	0,043
W3311-2.306.4-z1-uIgG1K	0,043
W3311-2.166.48	0,125
Изотипический контроль	N/A

[000285] *Аффинность антител, определенная методом FACS: 5×10^4 Jurkat клеток/луночка* высевали в 96-луночные планшеты, с последующим добавлением очищенного испытываемого антитела-лидера при различных концентрациях в качестве 1-го антитела в течение 1 часа при 4°C. 2-е антитело козьиное анти-мышье IgG Fc-FITC добавляли в течение 30 мин при 4°C и затем определяли FITC-окрашенные клетки методом FACS. K_D значение рассчитывали в соответствии со способом, описанным выше.

[000286] *Два гуманизированных mAb испытывали на связывающую активность на человеческих CD4 T-клетках:* Данные показали, что оба гуманизированных антитела сохраняли высокую связывающую активность с CD4 T-клетками (см. Фиг. 2) с низкими EC_{50} значениями 1,01 и 0,46 нМ для WBP3311-2.166.48-z1-uIgG1k и WBP3311-2.306.4-z1-uIgG1k, соответственно, которые были в 0,5-1 раз ниже, чем значения соответствующих исходных антител, как показано в Таблице 10.

[000287]

Таблица 10

Связывание двух гуманизированных mAb с hCD4 T-клетками, определенное с использованием FACS и EC_{50}

mAb	EC_{50} (нМ)
W3311-2.166.48-z1-uIgG1K	1,01
W3311-2.166.48-mIgG2aK	3,514
W3311-2.306.4-z1-uIgG1K	0,253
W3311-2.306.4-mIgG2bK	0,461
ОКТ3	0,202
Изотипический контроль	N/A

[000288] 4.5 Аффинность и EC_{50} антител, определенные методом FACS

[000289] Восемь mAb испытывали на их EC_{50} методом FACS и испытывали аффинность в отношении клеток, экспрессирующих человеческий CD3 (клетки Jurkat). Значение EC_{50} для восьми mAb находилось в пределах от 0,57 нМ до 6,91 нМ (см.

Таблицу 11), а аффинность находилась в пределах от $1,3 \times 10^{-9}$ до $9,3 \times 10^{-10}$ М, как показано в Таблице 12.

[000290]

Таблица 11

EC₅₀ значение, измеренное в клетках Jurkat методом FACS

mAb	EC ₅₀ (нМ)
W3311-2.166.48	6,91
W3311-2.306.4	0,57
W3311-2.383.47	0,91
W3311-2.400.5	2,5
W3311-2.482.5	3,71
W3311-2.488.33	2,97
W3311-2.615.8	4,65
W3311-2.844.8	0,77
ОКТЗ	0,2

[000290]

Таблица 12

K_D значение для восьми mAb, определенное в клетках Jurkat методом FACS

Образец	W331	W331	W331	W33	W331	W33	W33	W33	WBP33
	1- 2.166. 48	1- 2.306. 4	1- 2.383. 47	11- 2.40 0.5	1- 2.482. 5	11- 2.48 8.33	11- 2.61 5.8	11- 2.84 4.8	11.ОКТ 3- среднее значени е
Наилучшее соответствие- Вmax	1,26E- -10	1,17E- -10	1,12E- -10	1,13 E-10	1,30E- -10	1,30 E-10	1,20 E-10	1,19 E-10	9,41E- 11
Наилучшее соответствие-K _D	1,67E- -09	1,91E- -10	4,03E- -10	9,34 E-10	2,29E- -09	1,32 E-09	2,23 E-09	2,52 E-10	1,29E- 10
Стандартная ошибка-Вmax	1,66E- -12	1,19E- -12	1,62E- -12	1,76 E-12	2,35E- -12	2,51 E-12	2,18 E-12	1,00 E-12	1,95E- 12
Стандартная ошибка-K _D	5,62E- -11	8,32E- -12	2,15E- -11	4,38 E-11	9,63E- -11	6,98 E-11	9,47 E-11	8,64 E-12	1,27E- 11

[000292] 4.6 Измерение K_D аффинности и кинетики двух гуманизированных mAb

методом FACS

[000293] Два гуманизированных mAb испытывали на аффинность в клетках Jurkat методом FACS. Данные показали, что оба гуманизированных mAb сохраняли высокую аффинность на клетках Jurkat с такими же K_D значениями, как у их соответствующих исходных mAb, как показано на Фиг. 4 и в Таблице 13.

[000294]

Таблица 13

Измерение K_D кинетики двух гуманизированных mAb на клетках Jurkat методом FACS

Образец	WBP3311-2.166.48-z1-uIgG1k	WBP3311-2.306.4-z1-uIgG1k	ОКТ3
Наилучшее соответствие- B_{max}	7,32E-12	6,83E-12	6,06E-12
Наилучшее соответствие-KD	2,01E-10	5,30E-11	2,77E-11
Стандартная ошибка- B_{max}	3,82E-13	3,49E-13	2,19E-13
Стандартная ошибка-KD	4,38E-11	1,14E-11	5,13E-12

[000295] 3.3 Клеточные функциональные анализы

[000296] *Клеточная интернализация антител, определенная методом FACS:* клетки Jurkat высевали при 1×10^5 /лунка в 96-луночные планшеты. Испытываемые антитела (1 мкг/мл) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 часа при 4°C. После инкубации несвязанные антитела удаляли промывкой и клетки затем инкубировали в течение 3 часов при 4°C или 37°C с 5% CO₂. После инкубации присутствие антител на клеточной поверхности определяли с использованием 2-го антитела (Abcam, ab98742). Окрашенные клетки анализировали с использованием BD Biosciences FACSCanto II и программы FlowJo Version. Процент интернализации рассчитывали, как показано ниже: $[(MFI_{0 \text{ часов}} - MFI_{3 \text{ часа}}) / MFI_{0 \text{ часов}}] \times 100\%$.

[000297] 4.7 Определение процента клеточной интернализации

[000298] Процент интернализации определяли с использованием клеток Jurkat методом FACS. Данные показали, что все 8 mAb демонстрируют высокий процент интернализации в пределах от 86 до 94% антител, интернализированных после 3-часового периода испытания, тогда как ОКТ3 показал примерно 72% интернализации, Фиг. 5.

[000299] *T-клеточная активация посредством антител с использованием метода внутриклеточного окрашивания цитокинов:* Внутриклеточное окрашивание цитокинов представляет собой анализ на основе проточной цитометрии, который может определить

продукцию цитокинов иммунными клетками в комбинации с клеточно-поверхностными маркерами. Человеческие PBMC выделяли у здорового донора. Вкратце, использовали центрифугирование в градиенте плотности Ficoll-Paque PLUS с последующими стадиями 100g центрифугирования для удаления тромбоцитов. PBMC культивировали в полной RPMI-1640 среде. PBMC ресуспендировали в клеточной культуральной среде, дополненной Golgi Stop, и распределяли при 2×10^5 /лунка в 96-луночные планшеты. Добавляли различные концентрации испытываемых антител, положительный и отрицательный контроли и затем инкубировали с клетками в течение 4,5 часов при 37°C. После инкубации клетки промывали два раза 1% BSA и затем окрашивали для определения их поверхностных маркеров с использованием антитела против человеческого CD4-FITC (BD, 550628) и антитела против человеческого CD8-PE (BD, 560959), с последующей фиксацией и пермеабиллизацией с использованием набора Human Regulatory T Cell Staining Kit (eBioscience, 88-8999). После фиксации/пермеабиллизации клетки оценивали на продукцию цитокинов с использованием антитела против человеческого TNF-APC (BD, 554514) и антитела против человеческого IFN-PerCP-Cy5.5 (eBioscience, 45-7319-42). Окрашенные клетки анализировали с использованием BD Biosciences FACSCanto II и программы FlowJo Version.

[000300] *T-клеточная активация:* T-клеточную активацию оценивали с использованием человеческих PBMC методом внутриклеточного окрашивания цитокинов и отслеживали цитокины TNFальфа и INFгамма. Данные показали, что из 8 испытываемых mAb 2.306.4 и 2.844.8 не продемонстрировали существенного события T-клеточной активации, поскольку никакого существенного высвобождения цитокинов TNFальфа и INFгамма не было обнаружено, при этом все 6 других испытываемых mAb показали T-клеточную активацию в такой же степени, как и ОКТЗ, за исключением клона 2.383.47, который показал более слабую T-клеточную активацию по сравнению с ОКТЗ, данные показаны на Фиг. 6.

[000301] *Активация человеческих T-клеток с использованием двух гуманизированных mAb:* два гуманизированных mAb испытывали на T-клеточную активацию на человеческих PBMC методом внутриклеточного окрашивания цитокинов и отслеживали цитокины TNFальфа и INFгамма. Данные показали, что оба гуманизированных антитела продемонстрировали такую же степень T-клеточной активации, как и положительный контроль ОКТЗ, на CD8+ T-клетках, при этом оба гуманизированных mAb показали меньшую степень активации на CD4+ T-клетках по сравнению с ОКТЗ. Также отмечается, что исходное мышиное антитело клона 2.306.4 постоянно демонстрировало отсутствие T-клеточной активации. Данные показаны на Фиг. 7.

[000302] 3.4 Связывание антител с эпитопом, определенное методом FACS

[000303] *Связывание эпитопа:* Семь из 8 mAb сгруппированы против клона 2.383.47, и результат показал, что все 8 mAb имеют общую для них эпитопную группу, как показано на Фиг. 8.

1. Выделенное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее 1, 2 или 3 последовательности области, определяющей комплементарность, (CDR) тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 и 47, и/или 1, 2 или 3 последовательности CDR каппа-легкой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 и 48.

2. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

a) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5;

b) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11;

c) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17;

d) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23;

e) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 29;

f) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35;

g) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41; и

h) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47.

3. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее вариабельную область каппа-легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из:

a) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6;

b) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12;

c) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18;

d) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24;

е) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30;

ф) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36;

г) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42;

и

h) вариабельной области каппа-легкой цепи, содержащей 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48.

4. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее:

а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 5; и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6;

б) вариабельную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 11; и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 12;

в) вариабельную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 17; и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 18;

г) вариабельную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 23; и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 24;

д) вариабельную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 29; и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 30;

е) вариабельную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33 и SEQ ID NO: 35; и вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34 и SEQ ID NO: 36;

г) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 и SEQ ID NO: 41; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40 и SEQ ID NO: 42; или

h) переменную область тяжелой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45 и SEQ ID NO: 47; и переменную область каппа-легкой цепи, включающую 1, 2 или 3 последовательности CDR, выбранные из SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46 и SEQ ID NO: 48.

5. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, также содержащее 1, 2, 3 или 4 последовательности каркасной области (FR) тяжелой цепи, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 57, 59, 61, 63, 73, 75, 77 и 79, и/или 1, 2, 3 или 4 последовательности каркасной области (FR) легкой цепи, выбранные из SEQ ID NO: 58, 60, 62, 64, 74, 76, 78 и 80.

6. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117 и гомологичных последовательностей, имеющих с ними по меньшей мере 80% идентичности последовательности.

7. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее переменную область каппа-легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119 и гомологичных последовательностей, имеющих с ними по меньшей мере 80% идентичности последовательности.

8. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, содержащее:

а) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 81, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 83;

б) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 85, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 87;

в) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 89, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 91;

г) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 93, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 95;

e) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 97, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 99;

f) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 101, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 103;

g) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 105, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 107;

h) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 109, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 111;

i) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 113, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 115; или

j) переменную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 117, и переменную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 119.

9. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, также содержащее одну или несколько замен аминокислотных остатков, но при этом сохраняет специфическое родство к связыванию с CD3ε.

10. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 9, где замена присутствует в одной или нескольких последовательностях CDR и/или в одной или нескольких последовательностях FR, в одной или обеих последовательностях переменных областей и/или в Fc области.

11. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 9 или 10, где замена придает одно или несколько желаемых свойств, выбранных из следующих:

- a) улучшение аффинности связывания с CD3ε,
- b) введение или удаление сайта гликозилирования,
- c) введение свободного цистеинового остатка,
- d) усиление или уменьшение ADCC или CDC,
- e) увеличение периода полужизни в сыворотке; и
- f) повышение FcRn связывания.

12. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, также включающее константную область иммуноглобулина, необязательно, константную область IgG, необязательно, константную область человеческого IgG1.

13. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой гуманизованное антитело.

14. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое представляет собой камелизованное однодоменное

антитело, диатело, scFv, scFv димер, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, биспецифическое антитело, ds диатело, нанотело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

15. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, которое является биспецифическим.

16. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 15, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент имеет первую специфичность в отношении CD3ε и вторую специфичность.

17. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 16, где вторая специфичность направлена на второй антиген, отличный от CD3ε, где присутствие второго антигена вблизи CD3ε-экспрессирующих Т-клеток желательно, чтобы второй антиген распознавался иммунной системой.

18. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 16, где первая антигенная специфичность направлена на CD3ε, а вторая антигенная специфичность направлена на опухоль-ассоциированный антиген.

19. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, связанное с одним или несколькими конъюгатами.

20. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 19, где конъюгат включает химиотерапевтическое средство, токсин, радиоактивный изотоп, лантанид, люминесцентную метку, флуоресцентную метку или фермент-субстрат метку.

21. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное специфически связываться с CD3ε, и, необязательно, где CD3ε происходят из организма мыши, крысы, обезьяны или человека, и необязательно, где CD3ε представляет собой рекомбинантный CD3ε или CD3ε, экспрессируемый на клеточной поверхности.

22. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное специфически связываться с CD3ε человека, экспрессируемым на клеточной поверхности, при KD значении не более чем $5 \times 10^{-9} M$, не более чем $4 \times 10^{-9} M$, не более чем $3 \times 10^{-9} M$, не более чем $2 \times 10^{-9} M$, не более чем $10^{-9} M$, не более чем $5 \times 10^{-10} M$, не более чем $4 \times 10^{-10} M$, не более чем $3 \times 10^{-10} M$, не более чем $2 \times 10^{-10} M$, не более чем $10^{-10} M$, не более чем $5 \times 10^{-11} M$, не более чем $4 \times 10^{-11} M$, не более чем $3 \times 10^{-11} M$, не более чем $2 \times 10^{-11} M$ или не более чем $10^{-11} M$, как измерено методом проточной цитометрии.

23. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное специфически связываться с рекомбинантным

CD3ε яванского макака с EC50 не более чем 0,001 нМ, не более чем 0,005 нМ, не более чем 0,01 нМ, не более чем 0,02 нМ, не более чем 0,03 нМ, не более чем 0,04 нМ или не более чем 0,05 нМ, как измерено методом ELISA.

24. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, способное специфически связываться с рекомбинантным CD3ε человека при EC50 не более чем 0,01 нМ, не более чем 0,02 нМ, не более чем 0,03 нМ, не более чем 0,04 нМ, не более чем 0,05 нМ, не более чем 0,06 нМ, не более чем 0,07 нМ или не более чем 0,08 нМ, как измерено методом ELISA.

25. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое конкурирует за один и тот же эпитоп с антителом или его антиген-связывающим фрагментом по любому из предшествующих пунктов.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антиген-связывающий фрагмент по пп. 1-25.

28. Выделенный полинуклеотид по п. 27, который включает нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118 и 120.

29. Вектор, включающий выделенный полинуклеотид по п. 27 или 28.

30. Клетка-хозяин, включающая вектор по п. 29.

31. Способ экспрессии антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-24, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 30 в условиях, при которых происходит экспрессия вектора по п. 29.

32. Способ лечения заболевания или состояния у индивида, которому может быть полезна модуляция активности CD3ε, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-25 или фармацевтической композиции по п. 26.

33. Способ по п. 32, где заболевание или состояние представляет собой CD3ε-связанное заболевание или состояние.

34. Способ по п. 32, где заболевание или состояние представляет собой онкологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

35. Способ по п. 34, где антитело или его антиген-связывающий фрагмент является биспецифическим и заболевание или состояние представляет собой онкологическое

заболевание.

36. Способ по п. 32, где индивидом является человек.

37. Способ активации CD3ε-экспрессирующих Т-клеток *in vivo* или *in vitro*, включающий контактирование CD3ε-экспрессирующих Т-клеток с антителом или его антиген-связывающим фрагментом по любому из пп. 1-25.

38. Способ модуляции CD3 активности в CD3ε-экспрессирующей клетке, включающий воздействие антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-25 на CD3ε-экспрессирующую клетку.

39. Способ промотирования *in vivo* или *in vitro* процессинга второго антигена CD3ε-экспрессирующей Т-клеткой, включающий контактирование CD3ε-экспрессирующих Т-клеток с биспецифическим антителом или его антиген-связывающим фрагментом по любому из пп. 15-18, где биспецифическое антитело или антиген-связывающий фрагмент способны специфически связываться как с CD3ε-экспрессирующими Т-клетками, так и с вторым антигеном, приводя их таким образом в непосредственную близость.

40. Способ определения присутствия или количества CD3ε в образце, включающий контактирование образца с антителом или его антиген-связывающим фрагментом по любому из пп. 1-25 и определение присутствия или количества CD3ε в образце.

41. Способ диагностики CD3-связанного заболевания или состояния у индивида, включающий: а) получение образца от индивида; б) контактирование образца, полученного от индивида, с антителом или его антиген-связывающим фрагментом по любому из пп. 1-25; в) определение присутствия или количества CD3ε в образце; и г) соотнесение присутствия или количества CD3ε с существованием или статусом CD3-связанного заболевания или состояния у индивида.

42. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-25 для получения лекарственного средства для лечения CD3-связанного заболевания или состояния у индивида.

43. Применение антитела или его антиген-связывающего фрагмента по любому из пп. 1-25 для получения диагностического реагента для диагностирования CD3-связанного заболевания или состояния.

44. Набор, включающий антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из пп. 1-25, эффективные для детекции CD3ε, необязательно, рекомбинантного CD3ε, CD3ε, экспрессируемого на клеточной поверхности, или CD3ε-экспрессирующих клеток.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное анти-CD3 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, содержащее:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и

вариабельную область каппа-легкую цепь, содержащую

CDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2,

CDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 и

CDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, содержащее:

а) вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 81, и

вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 83;

б) вариабельную область тяжелой цепи, включающую SEQ ID NO: 113, и

вариабельную область каппа-легкой цепи, включающую SEQ ID NO: 115.

3. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, также включающее константную область иммуноглобулина.

4. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, которое представляет собой гуманизированное антитело.

5. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, которое представляет собой камелизированное однодоменное антитело, диатело, scFv, scFv димер, BsFv, dsFv, (dsFv)₂, dsFv-dsFv', Fv фрагмент, Fab, Fab', F(ab')₂, ds диатело, нанотело, доменное антитело или бивалентное доменное антитело.

6. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1, способное специфически связываться с CD3ε.

7. Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, отличающееся тем, что содержит антигенсвязывающий домен анти-CD3 антитела по п.1 и второй антигенсвязывающий домен.

8. Биспецифическое антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 7, где биспецифическое антитело или его антиген-связывающий фрагмент специфично в отношении CD3ε.

9. Биспецифическое антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 8, где вторая специфичность направлена на второй антиген, отличный от CD3ε, где присутствие второго антигена вблизи CD3ε-экспрессирующих Т-клеток

желательно, чтобы второй антиген распознавался иммунной системой.

10. Конъюгат, содержащий антитело или его антиген-связывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов, связанное с одним или несколькими химиотерапевтическими средствами, токсинами, радиоактивными изотопами, лантанидами, люминесцентными метками, флуоресцентными метками или фермент-субстратными метками.

11. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1 и фармацевтически приемлемый носитель.

12. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1.

13. Вектор экспрессии, включающий выделенный полинуклеотид по п. 12.

14. Клетка-хозяин, включающая вектор по п. 13.

15. Способ экспрессии антитела или его антиген-связывающего фрагмента по п. 1, включающий культивирование клетки-хозяина, включающей вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1 в условиях, при которых происходит экспрессия вектора.

16. Способ лечения CD3-связанного заболевания или состояния, включающий введение индивиду терапевтически эффективного количества антитела или его антиген-связывающего фрагмента по п. 1 или биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 7.

17. Способ по п. 16, где заболевание или состояние представляет собой онкологическое заболевание.

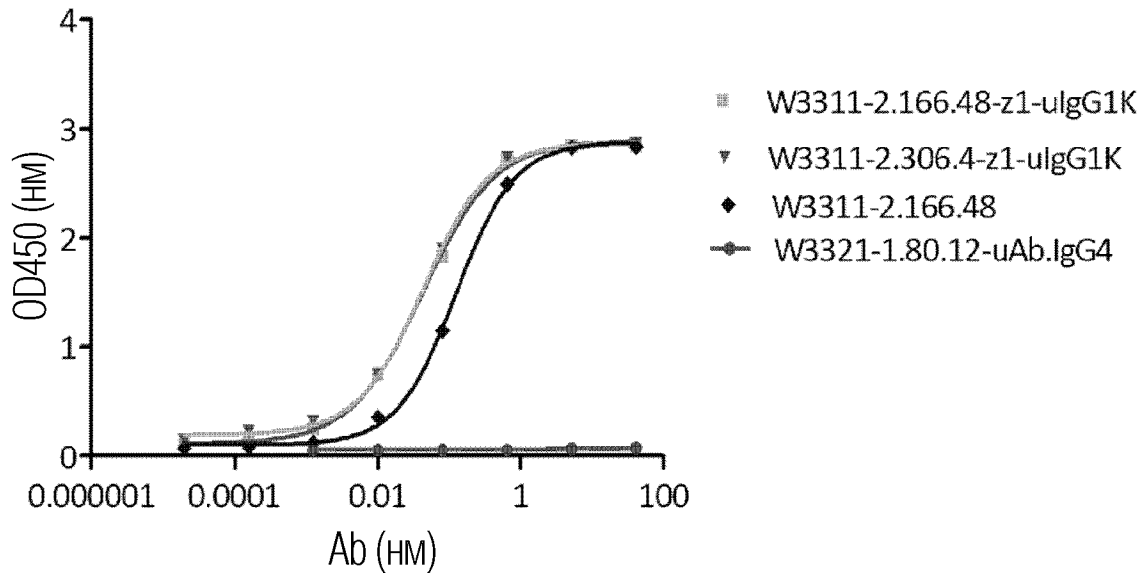
18. Способ активации CD3ε-экспрессирующих Т-клеток *in vivo* или *in vitro*, включающий контактирование CD3ε-экспрессирующих Т-клеток с антителом или его антиген-связывающим фрагментом по п. 1.

19. Способ промотирования *in vivo* или *in vitro* процессинга второго антигена CD3ε-экспрессирующей Т-клеткой, включающий контактирование CD3ε-экспрессирующих Т-клеток с биспецифическим антителом или его антиген-связывающим фрагментом по п. 7, где биспецифическое антитело или антиген-связывающий фрагмент способны специфически связываться как с CD3ε-экспрессирующими Т-клетками, так и с вторым антигеном, приводя их таким образом в непосредственную близость.

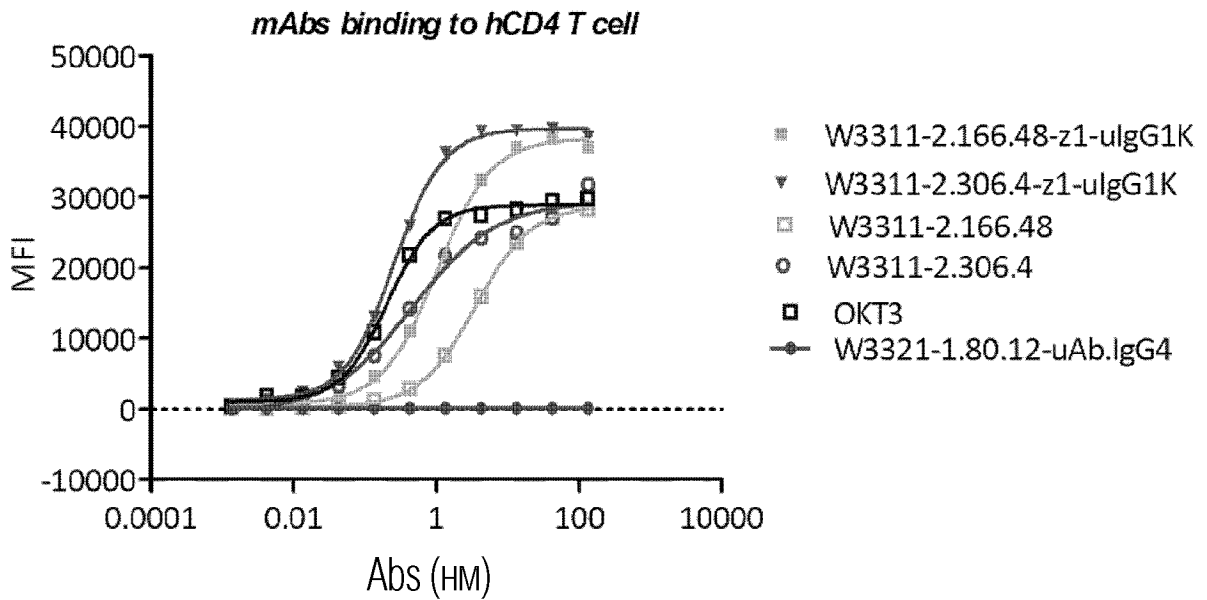
20. Набор для детекции CD3 ε, отличающийся тем, что содержит антитело или его антиген-связывающий фрагмент по п. 1.

По доверенности

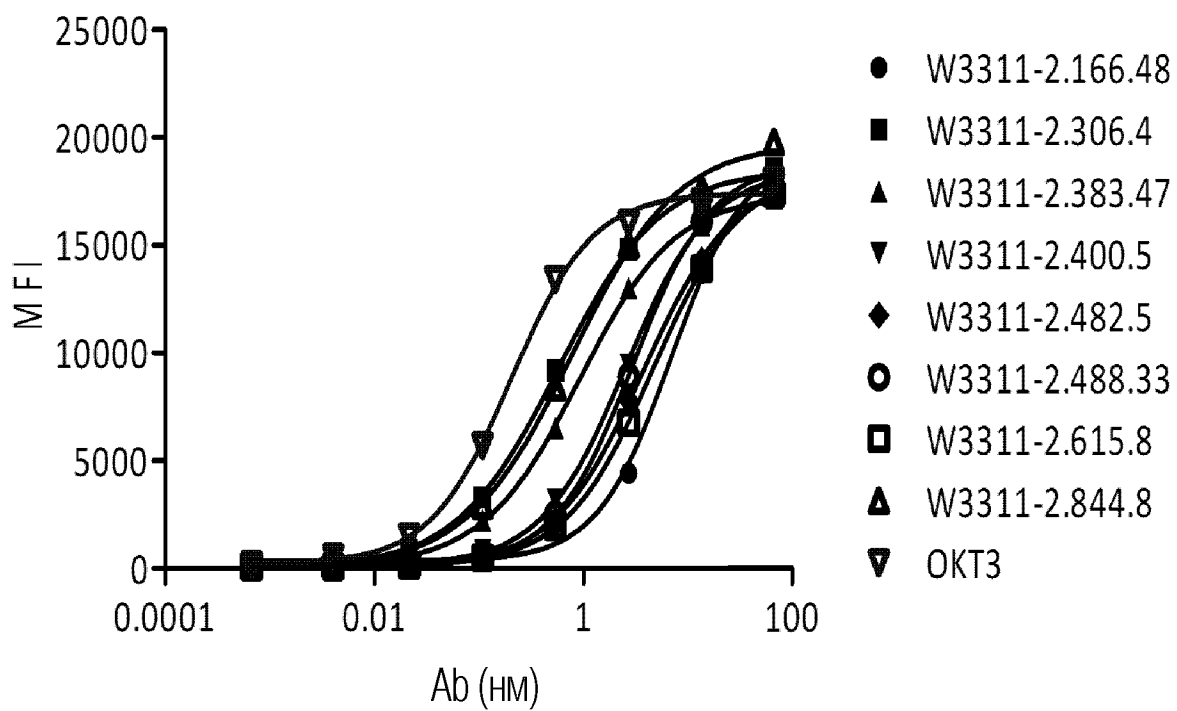
1/7



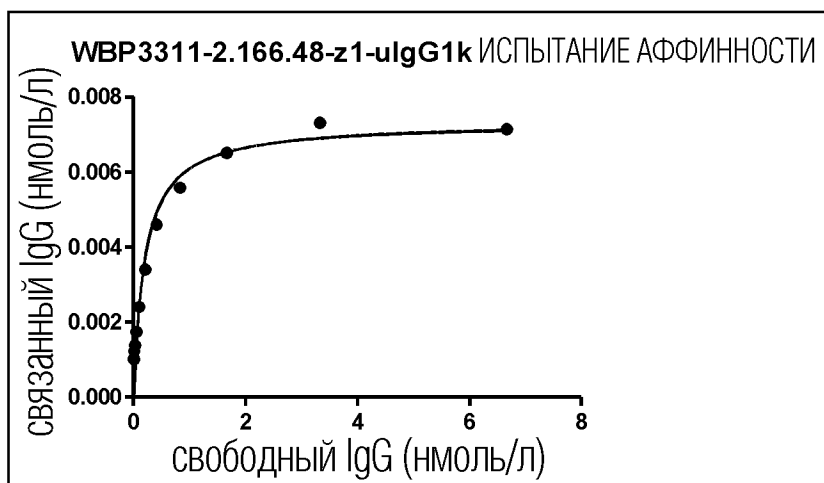
ФИГ. 1



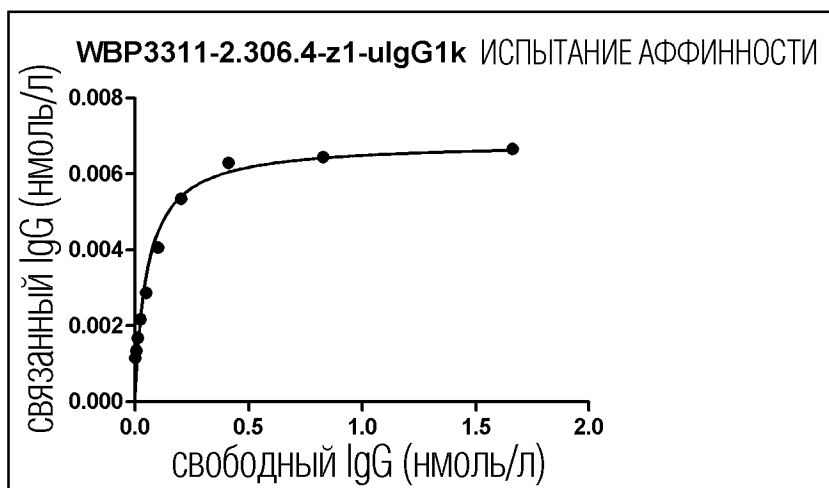
ФИГ. 2



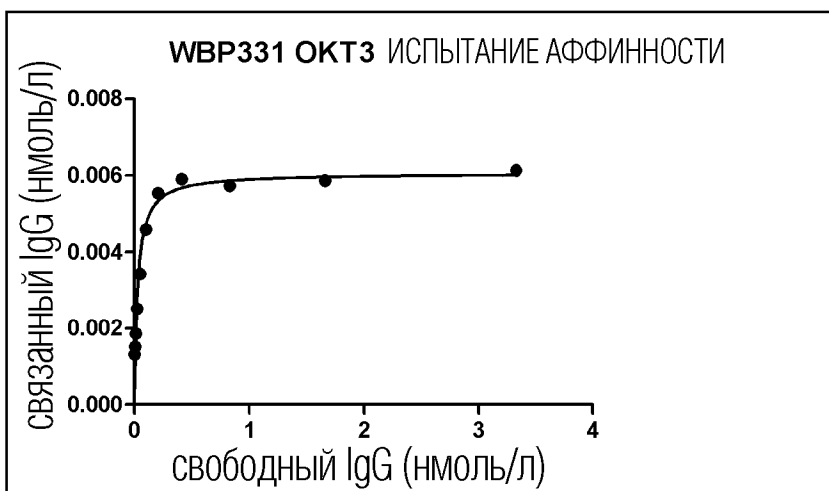
ФИГ. 3



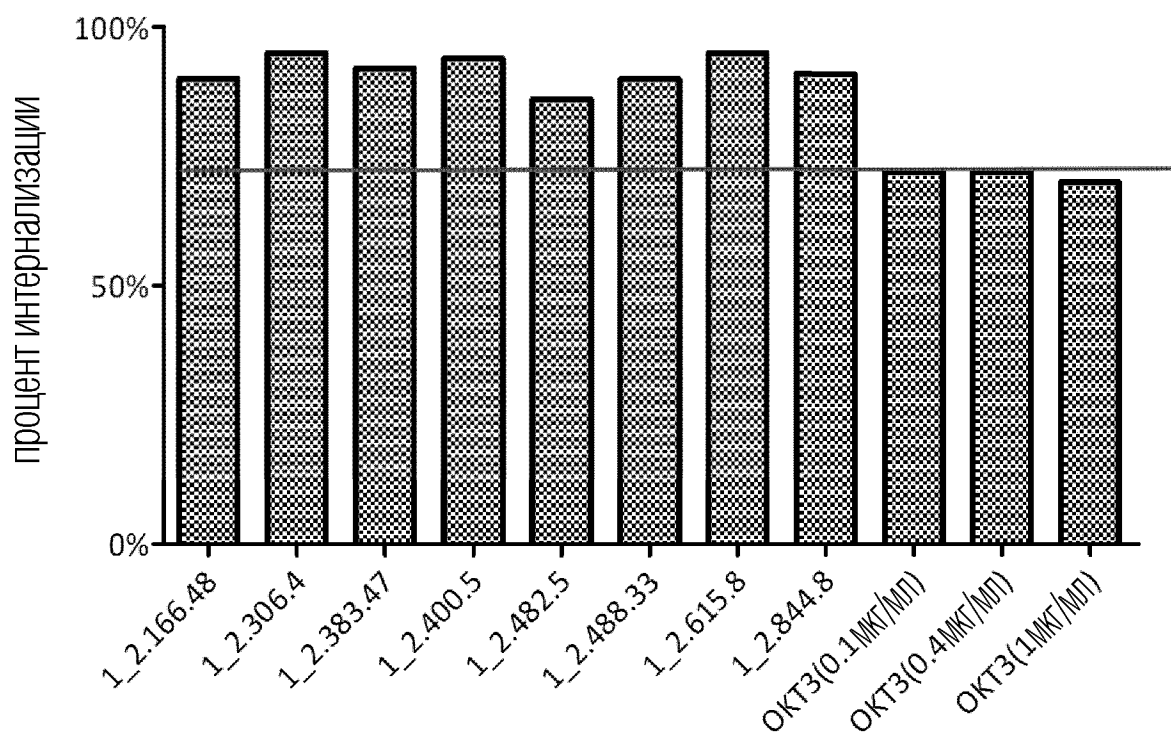
ФИГ. 4А



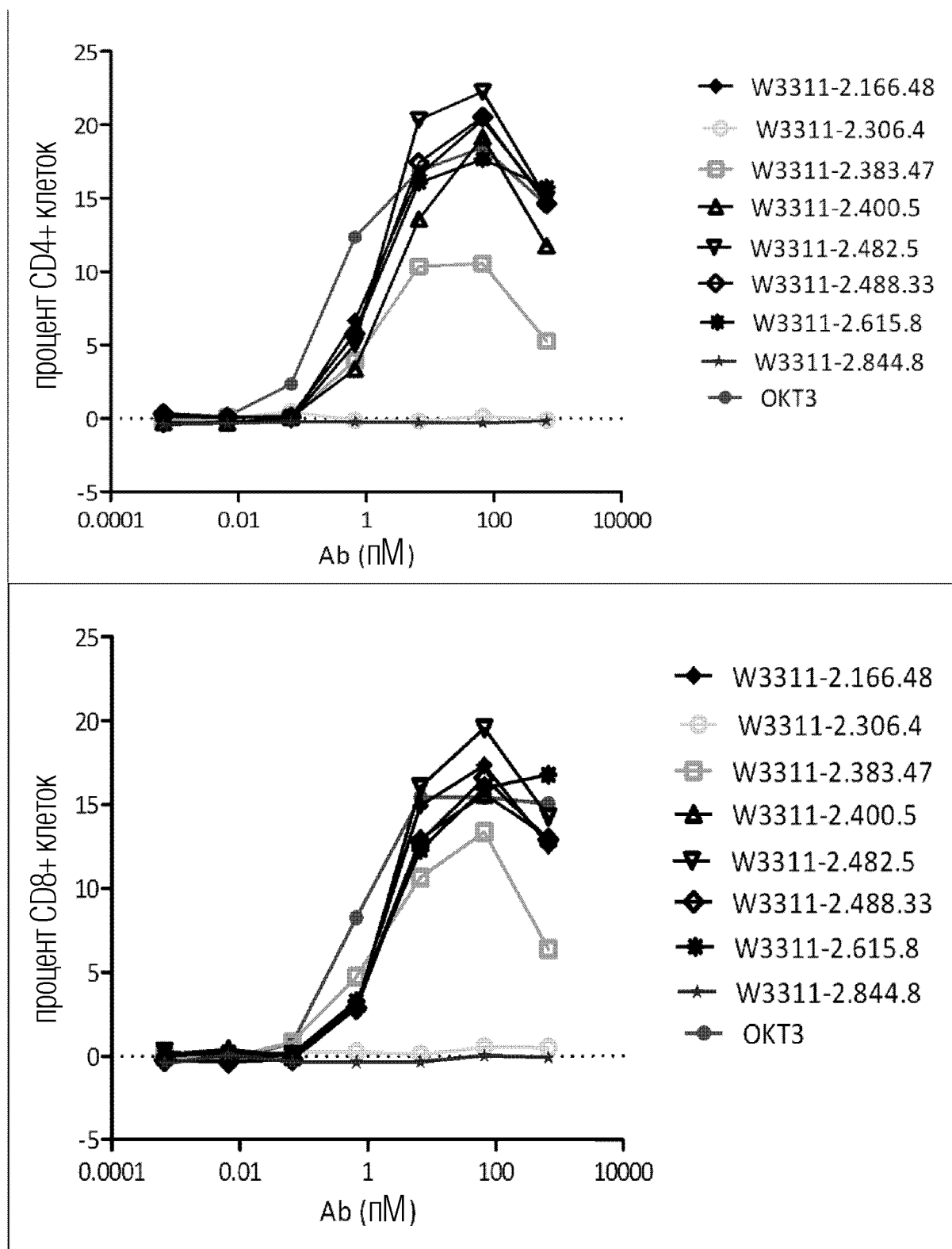
ФИГ. 4В



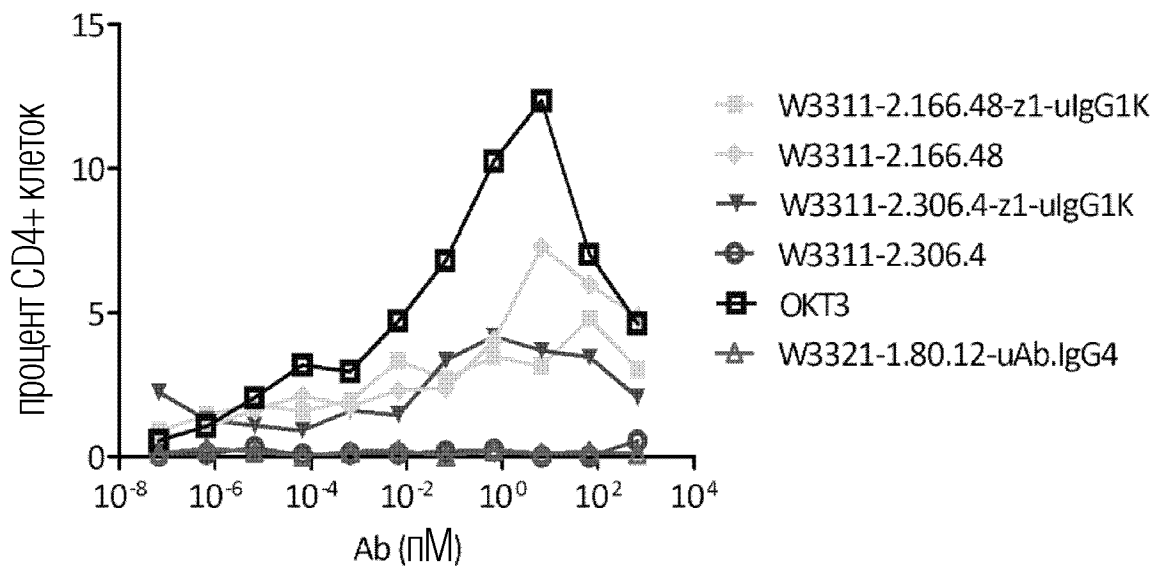
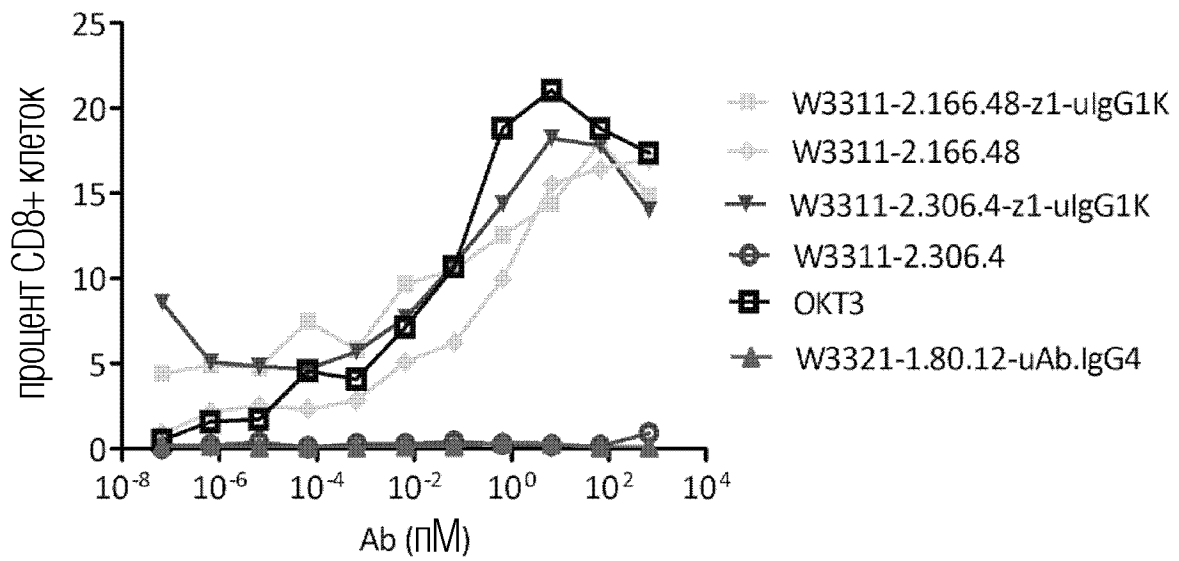
ФИГ. 4С



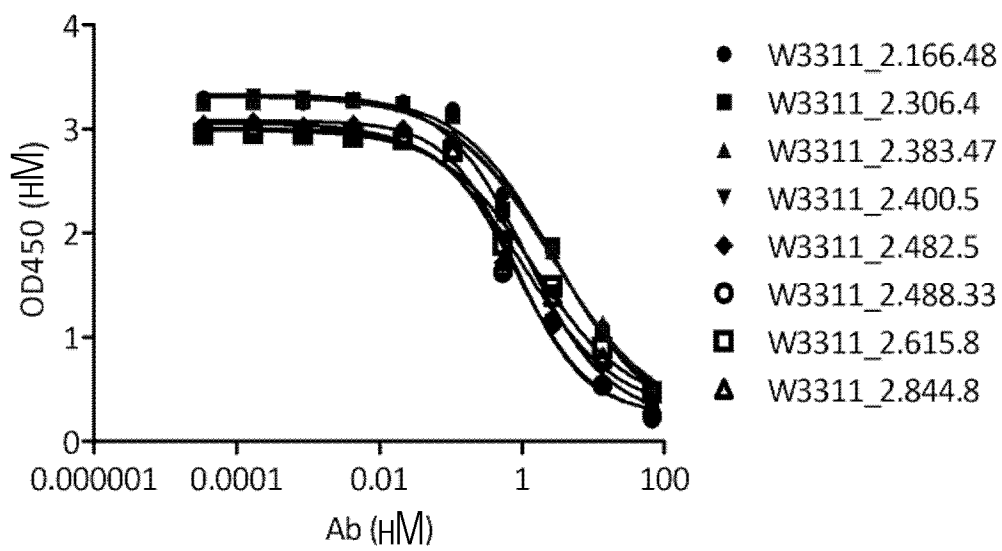
ФИГ. 5



ФИГ. 6



ФИГ. 7



ФИГ. 8

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202390087

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:
См. дополнительный лист

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C07K 16/28, 16/46, A61K 47/55, 47/68, 39/395, C12N 15/13, 15/63, G01N 33/53, A61P 35/00

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espascanet, ЕАПАТИС, ЕРОQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 2008/119567 A2 (MICROMET AG et al.) 09.10.2008, формула, примеры	1-20
A	WO 2008/119566 A2 (MICROMET AG et al.) 09.10.2008, формула, примеры	1-20
A	US 2014/0080147 A1 (HEALTH RESEARCH, INC) 20.03.2014, формула	1-20
A	WO 2015/181098 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG et al.) 03.12.2015, формула	1-20
A	RU 2559531 C2 (ЭМДЖЕН РИСЕРЧ (МЬЮНИК) ГМБХ)) 10.08.2015, формула	1-20
A	SCHAFFAR Laurence et al. Monoclonal antibody internalization and degradation during modulation of the CD3/T-cell receptor complex. Cellular Immunology, 1988, v. 116, no. 1, p.52-59, реферат	1-20

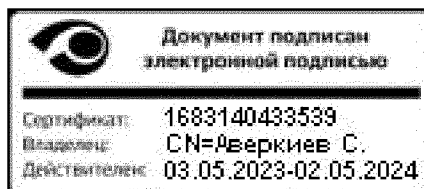
последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:
«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 27 июня 2023 (27.06.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(дополнительный лист)

Номер евразийской заявки:

202390087

КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (продолжение графы А)

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/55 (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)