

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046108**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.02.07

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

(21) Номер заявки
201890028

(22) Дата подачи заявки
2016.07.08

(54) **АНТИТЕЛО, СВЯЗЫВАЮЩЕЕ CD3 ЧЕЛОВЕКА**

(31) **15176355.4**

(56) **WO-A1-2014061433**

(32) **2015.07.10**

(33) **EP**

(43) **2018.08.31**

(86) **PCT/NL2016/050507**

(87) **WO 2017/010874 2017.01.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРУС Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Баккер Александер Бергольд
Хендрик, Ван Ло Питер Фокко (NL)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам, связывающим CD3 человека, содержащим тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит варибельную область, которая содержит указанную последовательность аминокислот: QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA IWYX₁X₂ RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT GYNWF DPWGQ GTLVT VSS с 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или комбинацией. Изобретение также относится к биспецифическим антителам, содержащим тяжелую цепь согласно данному здесь выше определению. Предложены способы получения указанного антитела, клетки, продуцирующие указанное антитело, и варианты (медицинского) применения указанного антитела.

B1

046108

046108

B1

Настоящее изобретение относится к области антител, в частности, к области терапевтических антител. Антитела могут применяться в лечении человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам и, предпочтительно, биспецифическим антителам для лечения опухоли.

Моноклональные антитела, которые связываются с CD3 человека, были среди первых антител, разработанных для терапевтического применения у человека. Применение моноклональных связывающих CD3 антител, как правило, обусловлено их иммуносупрессивными свойствами, например, при отторжении трансплантата. Антитела, биспецифические в отношении CD3 на Т-клетках и в отношении поверхностного целевого антигена на раковых клетках, способны соединять Т-клетку любого типа с раковой клеткой независимо от специфичности Т-клеточного рецептора, костимуляции или презентации пептидного антигена. Такие биспецифические привлекающие Т-клетки антитела являются очень многообещающими для лечения различных видов рака и неопластического роста.

В WO2014/051433 (включенной в настоящий документ посредством ссылки) описаны моноклональные антитела (mAb) к CD3, которые являются подходящими кандидатами для выполнения роли структурных элементов для получения биспецифических антител, действующих в качестве молекул, привлекающих Т-клетки. Указанные mAb к CD3 называются 3056 и 3896; последовательности VH и VL указанных mAb приведены на фиг. 22. Оба моноклональных антитела к CD3, 3056 и 3896, обладают хорошими характеристиками в отношении функциональной активности. Они связываются с CD3/TCR, экспрессируемыми на поверхности линий Т-клеток человека, с аффинностью (KD), значимо меньшей, чем аффинность хорошо известного антитела мыши против CD3 mOKT3, что приводит к более низкой средней интенсивности флуоресценции при проточно-цитометрическом анализе на клетках CD3^{POS}. Аналогичным образом, при иммобилизации на планшетах для тканевых культур они индуцируют пролиферацию Т-клеток в меньшей степени, чем mOKT3.

Без ограничения конкретной теорией считается, что аффинность в отношении CD3, значимо меньшая, чем аффинность mOKT3, предпочтительна для биспецифического привлекающего Т-клетки формата. Предпочтительно, чтобы указанное биспецифическое антитело связывалось с CD3 с аффинностью, меньшей, чем аффинность связывания с опухолевым антигеном. Без ограничения какой-либо теорией считается, что указанная разница в аффинности позволяет обеспечивать преимущественную опсонизацию опухолевых клеток биспецифическим антителом и, таким образом, их мечение для разрушения иммунными эффекторными клетками, в том числе NK и/или Т-клетками, присутствующими поблизости.

Авторы настоящего изобретения наблюдали вариабельность результатов между партиями для антитела 3056, что было неожиданным для авторов, поскольку указанная вариабельность не наблюдалась для антитела 15C3, имеющего такую же последовательность VH, что и антитело 3056, но другую легкую цепь (описанную в WO2005/118635).

Задача настоящего изобретения заключается в обеспечении варианта антитела 3056, обладающего по существу такими же связывающими свойствами CD3 в качественном, и не обязательно в количественном смысле, с улучшенными характеристиками.

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое связывает CD3 человека, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKGRFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS
с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A.

Согласно настоящему изобретению также предложена молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS
с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

$X_1 = D$ и $X_2 = G$ или

$X_1 = H$ и $X_2 = A$.

Комбинация X_1 и X_2 в антителе согласно описанию в настоящем документе предпочтительно соответствует $X_1 = N$ и $X_2 = A$.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка, которая экспрессирует указанное антитело и/или содержит указанную молекулу нуклеиновой кислоты.

Антитело согласно настоящему изобретению, если иное не указано специально, предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело. Указанное биспецифическое антитело предпочтительно связывает по меньшей мере CD3 человека. Кроме того, указанное биспецифическое антитело предпочтительно связывает по меньшей мере одну поверхностную молекулу, которая преимущественно экспрессируется на опухолевых клетках человека. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело связывается с BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, pЭФР, pЭФР-vIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MCSP или PCMA (PSMA). Согласно более предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело связывается с CLEC12A.

Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с настоящим изобретением.

Дополнительно предложено антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое дополнительно содержит метку, предпочтительно, метку для визуализации *in vivo*.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения субъекта, имеющего опухоль или риск возникновения опухоли, включающий введение указанному субъекту биспецифического антитела в соответствии с настоящим изобретением. Также предложено биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением для применения в лечении субъекта, имеющего опухоль или риску возникновения опухоли. Дополнительно предложено применение антитела согласно настоящему изобретению для получения лекарственного средства для лечения субъекта, имеющего опухоль или риск возникновения опухоли. Согласно предпочтительному варианту реализации опухоль представляет собой положительную по CLEC12A опухоль.

Подробное описание изобретения

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело. Указанное биспецифическое антитело предпочтительно связывает по меньшей мере CD3 человека. Кроме того, указанное биспецифическое антитело предпочтительно связывает по меньшей мере одну поверхностную молекулу, экспрессируемую на опухолевых клетках человека. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело связывается с BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, pЭФР, pЭФР-vIII, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MCSP или PCMA. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело связывается с CLEC12A.

BCMA также называют представителем 17 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF17), TNFRSF13A2, антигеном созревания В-клеток, BCM, фактором созревания В-клеток, белком созревания В-клеток, CD269 или антигеном CD269. Идентификаторы: HGNC: 11913, Entrez Gene: 608, Ensembl: ENSG0000048462, OMIM: 109545, UniProtKB: Q02223.

CD19 также называют молекулой CD19, антигеном поверхности Т-клеток Leu-12, антигеном CD19, CVID3, антигеном дифференцировки CD19, B4, антигеном B4 поверхности В-лимфоцитов, антигеном В-лимфоцитов CD19. Идентификаторы: HGNC: 1633, Entrez Gene: 930, Ensembl: ENSG00000177455, OMIM: 107265, UniProtKB: P15391.

CD20 также называют представителем 1 подсемейства А трансмембранных 4-доменных белков (MS4A1), MS4A2, CD20, S7, антигеном поверхности лейкоцитов Leu-16, антигеном В-лимфоцитов CD20, Bp35, антигеном клеточной поверхности В-лимфоцитов B1, антигеном CD20, рецептором CD20, CVID5, антигеном B1 поверхности В-лимфоцитов, B1, представителем 1 подсемейства А трансмембранных 4-доменных белков, LEU-16. Идентификаторы: HGNC: 7315, Entrez Gene: 931, Ensembl: ENSG00000156738, OMIM: 112210, UniProtKB: P11836.

CD30 также называют представителем 8 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF8), антигеном Ki-1, CD30, Ki-1, D1S166E, цитокиновым рецептором CD30, антигеном активации лимфоцитов CD30, представителем 8 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, рецептором CD30L, антигеном CD30. Идентификаторы: HGNC: 11923, Entrez Gene: 943, Ensembl: ENSG00000120949, OMIM: 153243, UniProtKB: P28908.

CD33 также называют молекулой CD33, SIGLEC-3, антигеном CD33 (Gp67), антигеном поверхности миелоидных клеток CD33, связывающий сиаловую кислоту иммуноглобулин-подобный лектин 3, Siglec-3, SIGLEC3, антиген CD33 и gp67. Идентификаторы: HGNC: 1659, Entrez Gene: 945, Ensembl: ENSG00000105383, OMIM: 159590, UniProtKB: P20138.

CD38 также называют молекулой CD38, T10, антигеном CD38 (P45), гидролазой 1 CADPr, АДФ-рибозилциклазой 1, АДФ-рибозилциклазой/гидролазой циклической АДФ-рибозы, NAD(+)-нуклеозидазой, EC 3,2.2.5, гидролазой 1 циклической АДФ-рибозы, антигеном CD38. Идентификаторы:

HGNC: 1667, Entrez Gene: 952, Ensembl: ENSG0000004468, OMIM: 107270, UniProtKB: P28907.

CD44 также называют молекулой CD44 (группы крови Indian), IN, MDU2, антигеном CD44 (функции хоминга и системы групп крови Indian), MDU3, CDW44, MIC4, CSPG8, хондроитинсульфат-протеогликаном 8, HCELL, лигандом E- и L-селектинов гематопозитических клеток, MC56, рецептором III внеклеточного матрикса, Pgp1, гепарансульфат-протеогликаном, гликопротеином поверхности клеток CD44, гиалуронатным рецептором, эпиканом, фагоцитарным гликопротеином I, (молекулой) функции хоминга и системы групп крови Indian, ECMR-III, CDw44, HUTCH-I, эпиканом, LHR, PGP-1, антигеном CD44, PGP-I, рецептором CP90 хоминга/адгезии лимфоцитов, фагоцитарным гликопротеином I, антигеном Hermes. Идентификаторы: HGNC: 1681, Entrez Gene: 960, Ensembl: ENSG0000026508, OMIM: 107269, UniProtKB: P16070.

CD123 также называют (белком) цикла клеточного деления 123, гомологом (белка) цикла клеточного деления 123, C10orf7, D123, белком D123, HT-1080, CCEP123, PZ32, CEP89, гомологом (белка) цикла клеточного деления 123 (*S. Cerevisiae*), FLJ14640, открытой рамкой считывания 7 хромосомы 10. Идентификаторы: HGNC: 16827, Entrez Gene: 8872, Ensembl: ENSG00000151465, OMIM: 615470, UniProtKB: 075794.

CD138 также называют синдеканом 1 (SCD1), CD138, SDC, гепарансульфатпротеогликановым рецептором фактора роста фибробластов, протеогликаном синдеканом 1, синдеканом, SYND1, синдеканом-1, антигеном CD138. Идентификаторы: HGNC: 10658, Entrez Gene: 6382, Ensembl: ENSG00000115884, OMIM: 186355, UniProtKB: P18827.

CEA также называют родственной карциноэмбриональному антигену молекулой клеточной адгезии 5 (CEACAM5), антигеном мекония 100, CD66e, карциноэмбриональным антигеном, антигеном CD66e. Идентификаторы: HGNC: 1817, Entrez Gene: 1048, Ensembl: ENSG00000105388, OMIM: 114890, UniProtKB: P06731.

CLEC12A также называют представителем А семейства 12 лектиновых доменов С-типа, лектиновым белком С-типа CLL-1, MICL, ассоциированным с дендритными клетками лектином 2, (молекулой) суперсемейства лектинов С-типа, ингибиторным лектиноподобным рецептором миелоидных клеток С-типа, подобной лектинам С-типа молекулой-1, CLL-1, DCAL2, CLL1, лектиноподобной молекулой 1 С-типа, DCAL-2, представителем 1 подсемейства L лектиноподобных рецепторов киллерных клеток (KLRL1), CD371 (Bakker A. et al. *Cancer Res.* 2004, 64, p8843-50, № доступа GenBank™: AY547296, Zhang W. et al., № доступа GenBank™: AF247788, A.S. Marshall, et al. *J Biol Chem* 2004, 279, p14792-802, № доступа GenBank™: AY498550, Y.Han et al. *Blood* 2004, 104, p2858 66, H.Floyd, et al., № доступа GenBank™: AY426759, C.H.Chen, et al. *Blood* 2006, 107, p1459-67). Идентификаторы: HGNC: 31713, Entrez Gene: 160364, Ensembl: ENSG00000172322, OMIM: 612088, UniProtKB: Q5QGZ9. CLEC12A представляет собой антиген, экспрессируемый на лейкозных бластных клетках и на лейкозных стволовых клетках при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ), в том числе CD34-отрицательных или экспрессирующих малые количества CD34 лейкозных стволовых клетках (боковая популяция) (A.V. Bakker et al. *Cancer Res* 2004, 64, p8443-50, Van Rhenen et al. 2007 *Blood* 110:2659, Moshaver et al. 2008 *Stem Cells* 26:3059). В иных случаях экспрессия CLEC12A, как считается, ограничена гематопозитической линией, в частности, миелоидными клетками в периферической крови и костном мозге, т.е. гранулоцитами, моноцитами и предшественниками дендритных клеток. Более важно то, что CLEC12A отсутствует на гематопозитических стволовых клетках. Указанный профиль экспрессии делает CLEC12A особенно благоприятной мишенью при ОМЛ. Полноразмерная форма CLEC12A содержит 275 остатков аминокислот, в том числе дополнительный внутриклеточный отрезок длиной 10 аминокислот, который отсутствует в большинстве других изоформ, и демонстрирует строго миелоидный профиль экспрессии (на уровне поверхностной экспрессии и уровне мРНК). Термин "CLEC12A или его функциональный эквивалент" означает все варианты (например, варианты сплайсинга или мутантные варианты), упомянутые выше, а также их изоформы, сохраняющие строго миелоидный профиль экспрессии (как на уровне поверхностной экспрессии, так и на уровне мРНК) согласно описанию в источниках: Bakker et al. *Cancer Res* 2004, 64, p8443-50 и Marshall 2004 - *J Biol Chem* 279(15), p14792-802. Связывающее CLEC12A антитело согласно настоящему изобретению связывает CLEC12A человека. При упоминании в настоящем документе CLEC12A имеется в виду CLEC12A человека, если конкретным образом не указано иное.

Т-клеточный корецептор CD3 (кластер дифференцировки 3) представляет собой белковый комплекс и состоит из четырех отдельных цепей. У млекопитающих указанный комплекс содержит цепь CD3γ, цепь CD3δ и две цепи CD3ε. Указанные цепи вступают в связь с молекулой, известной как Т-клеточный рецептор (TCR) и ζ-цепью с генерацией сигнала активации в Т-лимфоцитах. TCRα, TCRβ, ζ-цепь и молекулы CD3 вместе составляют комплекс TCR. CD3 экспрессируется на Т-клетках. Антитело, которое связывает CD3, может связывать цепь CD3γ, цепь CD3δ, цепь CD3ε или комбинацию CD3δ/CD3ε или CD3γ/CD3ε. Связывающее CD3 антитело согласно настоящему изобретению связывает цепь CD3ε. CD3ε известен под разными названиями, некоторые из которых перечислены ниже: "молекула CD3ε, эпсилон (комплекс CD3-TCR)"; "антиген CD3ε, полипептид эпсилон (комплекс TtT3)"; цепь эпсилон антигена поверхности Т-клеток T3/Leu-4; T3E; Т-клеточный антиген-рецепторный комплекс, эпсилон-

субъединица T3; антиген CD3ε; CD3-эпсилон 3; IMD18; TCRE. Идентификаторы гена CD3E: HGNC: 1674; Entrez Gene: 916; Ensembl: ENSG00000198851; OMIM: 186830 и UniProtKB: P07766. Как было показано, биспецифические связывающие CD3 антитела, нацеленные на цепь CD3ε, эффективны для рекрутинга Т-клеток к аберрантным клеткам. Соответственно, (биспецифическое) антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно содержит одну комбинацию тяжелой/легкой цепей, которая связывает CD3ε. Связывающее CD3 антитело согласно настоящему изобретению связывает CD3 человека. При упоминании в настоящем документе CD3 имеется в виду CD3 человека, если конкретным образом не указано иное.

CS-1 также называют цитрат-синтазой; EC 2.3.3.1; цитратсинтазой, митохондриальной (цитратсинтазой); EC 2.3.3. Идентификаторы: HGNC: 2422; Entrez Gene: 1431 Ensembl: ENSG00000062485; OMIM: 118950; UniProtKB: 075390.

рЭФР также называют рецептором эпидермального фактора роста, гомологом вирусного (V-Erb-B) онкогена (птичьего) эритробластического лейкоза, ERBB1, PIG61, прото-онкогеном C-ErbB-1, гомологом вирусного (V-Erb-B) онкогена птичьего эритробластического лейкоза, рецептором тирозинпротеинкиназы ErbB-1, ингибирующим клеточный рост белком 40, индуцирующим клеточную пролиферацию белком 61, HER1, mENA, EC 2.7.10.1, EC 2.7.10, рецептором эпидермального фактора роста (гомологом вирусного (V-Erb-B) онкогена птичьего эритробластического лейкоза). Идентификаторы: HGNC: 3236, Entrez Gene: 1956, Ensembl: ENSG00000146648, OMIM: 131550, UniProtKB: P00533.

рЭФР-vIII представляет собой распространенный вариант рЭФР (Oncogene. 2013 May 23,32(21):2670-81. ЦИО: 10.1038/onc.2012.280. Epub 2012 Jul 16).

Дельта-подобный лиганд 3 (DLL3) также называют дельта-подобным лигандом 3), гомологом дельта-3 дрозофилы, дельта-3, дельта-подобным лигандом (дрозофилы) 3, SCDO1. Идентификаторы DLL3: HGNC: 2909, Entrez Gene: 10683, Ensembl: ENSG00000090932, OMIM: 602768, и UniProtKB: Q9NYJ7.

LGR5 представляет собой содержащий богатый лейцином повтор сопряженный с G-белком рецептор 5. Альтернативные названия указанного гена или белка: содержащий богатый лейцином повтор сопряженный с G-белком рецептор 5, содержащий богатый лейцином повтор сопряженный с G-белком рецептор 5, сопряженный с G-белком рецептор HG38, сопряженный с G-белком рецептор 49, сопряженный с G-белком рецептор 67, GPR67, GPR49, орфанный сопряженный с G-белком рецептор HG38, сопряженный с G-белком рецептор 49, GPR49, HG38 и FEX. Белок или антитело согласно настоящему изобретению, который(ое) связывает LGR5, связывает LGR5 человека. Связывающий LGR5 белок или антитело согласно настоящему изобретению, за счет сходства последовательности и третичной структуры ортологов человека и других млекопитающих, также, однако не обязательно, может связывать такие ортологи. Номера доступа в базах данных белка LGR5 человека и кодирующего его гена: (NC_000012.12, NT_029419.13, NC_018923.2, NP_001264155.1, NP_001264156.1, NP_003658.1).

MSLN или мезотелин также называют мезотелином, потенцирующим пре- и промегакариоциты фактором, антигеном САК1, MPF, растворимым родственным мезотелину белком MPF, потенцирующим мегакариоциты фактором и SMRP. Идентификаторы MSLN: HGNC: 7371, Entrez Gene: 10232, Ensembl: ENSG00000102854, OMIM: 601051, UniProtKB: Q13421.

Фолатный рецептор 1 также называют FOLR1, фолатным рецептором 1, фолатным рецептором 1, ассоциированным с опухолью яичников антигеном MOv18, связывающим фолат белком взрослого возраста, фолатным рецептором взрослого возраста, FBP клеток KB, FR-альфа, FOLR, FBP, связывающим фолат белком, и фолатным рецептором 1. Идентификаторы FOLR1: HGNC: 3791, Entrez Gene: 2348, Ensembl: ENSG00000110195, OMIM: 136430, UniProtKB: P15328.

Фолатный рецептор 3 также называют FOLR3, фолатным рецептором 3 (гамма), FR-гамма, фолатным рецептором 3, гамма-HFR, и FR-G. Идентификаторы FOLR3: HGNC: 3795, Entrez Gene: 2352, Ensembl: ENSG00000110203, OMIM: 602469, и UniProtKB: P41439.

EPCAM также называют молекулой адгезии эпителиальных клеток, EGP40, M4S1, ESA, MIC18, KS1/4, опухолеассоциированным переносчиком кальциевого сигнала 1, МК-1, TACSTD1, эпителиальным гликопротеином-2 человека, TROP1, компонентом мембраны, расположенным на хромосоме 4, поверхностным маркером (гликопротеином 35 кДа), антигеном, ассоциированным с аденокарциномой, EGP, гликопротеином поверхности клеток Тгор-1, Ер-САМ, эпителиальным гликопротеином 314, GA733-2, основным ассоциированным с опухолью ЖКТ белком GA733-2, M1S2, EGP314, антигеном CD326, KSA, антигеном поверхности эпителиальных клеток, DIAR5, эпителиальным гликопротеином, HNPCC8, hEGP314, антигеном, идентифицируемым моноклональным антителом AUA1, антигеном KS 1/4, EGP-2, ACSTD1. Идентификаторы: HGNC: 11529, Entrez Gene: 4072, Ensembl: ENSG00000119888, OMIM: 185535, UniProtKB: P16422.

HER2 также называют гомологом V-Erb-B2 вирусного онкогена 2 птичьего эритробластического лейкоза, ERBB2, CD340, NGL, HER-2, HER-2/neu2, NEU2, TKR1, гомологом происходящего из нейро/глиобластомы онкогена, белком C-Erb B2/Neu, белком гена 19 метастатических лимфатических узлов, херстатином, протоонкогеном C-ErbB-2, происходящим из нейробластомы/глиобластомы гомологом онкогена, протоонкогеном Neu, рецепторной тирозиновой протеинкиназой ErbB-2, рецептором поверхно-

сти клетки HER2 тирозинкиназного типа, гомологом V-Erb-B2 вирусного онкогена 2 эритробластического лейкоза, гомологом происходящего из нейро/глиобластомы онкогена, MLN 19, MLN19, p185erbB2, антигеном CD340, EC 2.7.10.1, EC 2.7.10, гомологом V-Erb-B2 вирусного онкогена птичьего эритробластического лейкоза 2 (гомологом происходящего из нейро/глиобластомы онкогена). Идентификаторы: HGNC: 3430, Entrez Gene: 2064, Ensembl: ENSG00000141736, OMIM: 164870, UniProtKB: P04626.

HM1.24 также называют BST2, антигеном 2 стромальных клеток костного мозга, тетерином, BST-2, стромальным антигеном 2 костного мозга, антигеном HM1.24, CD317, антигеном CD317, NPC-A-7. Идентификаторы: HGNC: 1119, Entrez Gene: 684, Ensembl: ENSG00000130303, OMIM: 600534, UniProtKB: Q10589.

MSCP также называют ассоциированным с митохондриями сперматозоидов богатым цистеином белком (SMCP), MSCP, MCS, селенопротеином митохондриальной капсулы, HSMCSGEN1, богатым цистеином белком, ассоциированным с митохондриями спермы. Идентификаторы: HGNC: 6962, Entrez Gene: 4184, Ensembl: ENSG00000163206, OMIM: 601148, UniProtKB: P49901.

ПСМА также называют фолатгидролазой (простатическим специфическим мембранным антигеном) 1, FOLH1, NAALAD1, FOLH, mGCP, глутаматкарбоксипептидазой II, N-ацетилованной альфа-связанной кислотой дипептидазой I, PSM, NAALAD-азой I, ПСМА, EC 3.4.17.21, глутаматкарбоксилазой II, GCP2, белком ингибирующего клеточный рост гена 27, NAALA-дазой, фолил-поли-гамма-глутаматкарбоксипептидазой, глутаматкарбоксипептидазой 2, мембранной глутаматкарбоксипептидазой, N-ацетилованной альфа-связанной кислотой дипептидазой 1, птероилполи-гамма-глутаматкарбоксипептидазой, вариантом F простатического специфического мембранного антигена, FGCP, фолатгидролазой 1, GCP1, простатическим специфическим мембранным антигеном. Идентификаторы: HGNC: 3788, Entrez Gene: 2346, Ensembl: ENSG00000086205, OMIM: 600934, UniProtKB: Q04609.

ПСМА не следует путать с субъединицей 1 альфа-типа протеасомы (просомы, мультикалитической протеазы), которая также известна как PSMA1.

Номера доступа в основном приведены для обеспечения дополнительного способа идентификации мишени; фактическая последовательность связанного белка может варьировать, например, из-за мутации в кодирующем гене, такой как возникающие при некоторых видах рака или т.п. Сайт связывания антигена связывает антиген и различные его варианты, такие как экспрессируемые некоторыми положительными по антигену иммунными или опухолевыми клетками.

При упоминании в настоящем документе гена, белка, указанное упоминание относится предпочтительно к форме указанного гена или белка у человека. При упоминании в настоящем документе гена или белка указанное упоминание относится к естественному гену или белку и к формам вариантов указанного гена или белка, которые могут быть детектированы в опухолях, при раке и т.п., и предпочтительно могут быть детектированы в опухолях, при раке и т.п. у человека.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно связывается с белком BCMA, CD19, CD20, CD30, CD33, CD38, CD44, CD123, CD138, CEA, CLEC12A, CS-1, рЭФР, рЭФР- ν III, EPCAM, DLL3, LGR5, MSLN, FOLR1, FOLR3, HER2, HM1.24, MSCP, ПСМА человека или его вариант. Нет необходимости говорить, что связывающая антиген комбинация тяжелой/легкой цепи предпочтительно связывает внеклеточную часть указанного антигена. Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно связывается с CLEC12A человека или его вариантом. Предпочтительное биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением связывается с CD3 человека и CLEC12A человека или его вариантом.

HGNC относится к Комитету по номенклатуре генов HUGO. Число после аббревиатуры представляет собой номер доступа, на основании которого информация о гене и белке, кодируемом указанным геном, может быть найдена в базе данных HGNC. В Entrez Gene указан номер доступа или идентификатор гена, на основании которого информация о гене и белке, кодируемом указанным геном, может быть найдена в базе данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). В Ensemble указан номер доступа, на основании которого информация о гене и белке, кодируемом указанным геном, может быть найдена в базе данных Ensemble. Ensembl представляет собой совместный проект EMBL-EBI и Wellcome Trust Sanger Institute, посвященный разработке системы программного обеспечения для осуществления и поддержки автоматического аннотирования выбранных эукариотических геномов.

Согласно настоящему изобретению предложено антитело, которое связывает CD3 человека, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFDPWGGQ TLVTV SS
с 0-10, предпочтительно, 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

$X_1 = H$ и $X_2 = G$;
 $X_1 = D$ и $X_2 = G$ или
 $X_1 = H$ и $X_2 = A$.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот генового сегмента O12/IgVκ1-39*01, как показано на фиг. 23А с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Выражение "легкая цепь O12" в настоящем описании представляет собой сокращенное наименование "легкой цепи, содержащей вариабельную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот генового сегмента O12/IgVκ1-39*01 согласно фиг. 23А, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. IgVκ1-39 представляет собой сокращенное наименование гена 1-39 вариабельной области цепи каппа иммуноглобулина. Указанный ген также известен как ген вариабельной области каппа иммуноглобулина 1-39; IGKV139; IGKV1-39; O12a или O12. Внешние идентификаторы указанного гена: HGNC: 5740; Entrez Gene: 28930; Ensembl: ENSG00000242371. Предпочтительная последовательность аминокислот IgVκ1-39 приведена на фиг. 23А. На ней представлена последовательность V-области. Указанная V-область может быть скомбинирована с одной из пяти J-областей. Фиг. 23В и 23С описывают две предпочтительные последовательности IgVκ1-39 в комбинации с J-областью. Объединенные последовательности обозначены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия: IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 (номенклатура соответствует базе данных IMGT в сети Интернет по адресу: imgt.org).

Предпочтительно, чтобы содержащая O12/IgVκ1-39*01 последовательность вариабельной области легкой цепи представляла собой последовательность зародышевой линии. Также предпочтительно, чтобы содержащая IGJκ1*01 или IGJκ5*01 последовательность вариабельной области легкой цепи представляла собой последовательность зародышевой линии. Согласно предпочтительному варианту реализации указанные вариабельные области легких цепей IGKV1-39/jk1 или IGKV1-39/jk5 представляют собой последовательности зародышевой линии.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит O12/IgVκ1-39*01 зародышевой линии. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 легкой цепи каппа. Согласно предпочтительному варианту реализации IgVκ1-39*01/IGJκ1*01. Указанная вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 легкой цепи каппа зародышевой линии или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01 легкой цепи каппа зародышевой линии, предпочтительно IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 зародышевой линии.

Зрелые В-клетки, которые продуцируют антитело с легкой цепью O12, часто продуцируют легкую цепь, в которой возникла одна или более мутаций относительно последовательности зародышевой линии, т.е. нормальной последовательности в не-лимфоидных клетках организма. Процесс, ответственный за указанные мутации, часто называют соматической (гипер)мутацией. Итоговая легкая цепь называется легкой цепью с созревшей аффинностью. Такие легкие цепи, если они происходят из последовательности зародышевой линии O12, представляют собой происходящие из O12 легкие цепи. В настоящем описании выражение "легкие цепи/O12" включает "происходящий из легких цепей O12". Мутации, вводимые при соматической гипермутации, разумеется, могут также быть введены искусственным образом в лаборатории. Также в лаборатории могут быть введены и другие мутации, не влияющие на свойства легкой цепи в качественном, не обязательно в количественном смысле. Легкая цепь представляет собой по меньшей мере легкую цепь O12, если она содержит последовательность, приведенную на фиг. 23А, 23В или 23С, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную на фиг. 23А, 23В или 23С с 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную на фиг. 23А, 23В или 23С с 0-5, предпочтительно с 0-4, более предпочтительно с 0-3 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную на фиг. 23А, 23В или 23С с 0-2, более предпочтительно с 0-1, наиболее предпочтительно с 0 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь O12 представляет собой легкую цепь, содержащую последовательность, приведенную на фиг. 23А или 23В, с упомянутыми инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь содержит последовательность, приведенную на фиг. 23В.

Указанное антитело предпочтительно представляет собой биспецифическое антитело. Указанное биспецифическое антитело предпочтительно содержит одну комбинацию вариабельной области тяжелой цепи/вариабельной области легкой цепи (VH/VL), которая связывает CD3, и вторую комбинацию

VH/VL, которая связывает антиген, отличный от антигена на CD3. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный антиген представляет собой опухолевый антиген. Согласно предпочтительному варианту реализации VL в указанной первой комбинации VH/VL аналогична VL в указанной второй комбинации VH/VL. Согласно более предпочтительному варианту реализации области VL в указанных первой и второй комбинациях VH/VL идентичны. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое содержит одну комбинацию тяжелой/легкой (H/L) цепей, которая связывает CD3 и одну комбинацию цепей H/L, которая связывает другой антиген, предпочтительно, опухолевый антиген. Согласно предпочтительному варианту реализации легкая цепь в указанной первой комбинации Тяжелой/легкой цепей аналогична легкой цепи в указанной второй комбинации цепей H/L. Согласно более предпочтительному варианту реализации легкие цепи в указанных первой и второй комбинациях цепей H/L идентичны, т.е. аналогичная или идентичная легкая цепь человека представляет собой так называемую "общую легкую цепь", представляющую собой легкую цепь, которая может быть скомбинирована с разными тяжелыми цепями с получением антител с функциональными связывающими антигены доменами. Согласно предпочтительному варианту реализации легкая цепь в указанной первой комбинации Тяжелой/легкой цепей содержит переменную область легкой цепи, которая аналогична переменной области легкой цепи в указанной второй комбинации цепей H/L. Согласно более предпочтительному варианту реализации переменные области легкой цепи в указанных первой и второй комбинациях цепей H/L идентичны, т.е. аналогичная или идентичная переменная область легкой цепи человека представляет собой так называемую "общую переменную область легкой цепи", представляющую собой переменную область легкой цепи, которая может быть скомбинирована с разными переменными областями тяжелых цепей с образованием антител с функциональными антигенсвязывающими доменами. Легкая цепь, содержащая общую переменную область легкой цепи, предпочтительно представляет собой общую легкую цепь. Указанная легкая цепь предпочтительно содержит переменную область легкой цепи, содержащую последовательность аминокислот генного сегмента O12/IgVκ1-39*01, представленную на фиг. 23A, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией, согласно дополнительному описанию в различных разделах в настоящем документе. Предпочтительно, общая легкая цепь содержит последовательность зародышевой линии. Предпочтительной последовательностью зародышевой линии является переменная область легкой цепи, часто используемая в репертуаре человека и отличающаяся хорошей термодинамической стабильностью, выработкой и растворимостью. Предпочтительной легкой цепью зародышевой линии является O12 согласно описанию выше в настоящем документе. Предпочтительная последовательность O12/IgVκ1-39 приведена на фиг. 23A. Представлена последовательность V-области. На фиг. 23B и 23C описаны две предпочтительные последовательности IgVκ1-39 в комбинации с J-областью. Объединенные последовательности представлены как IGKV1-39/jk1 и IGKV1-39/jk5; альтернативные названия: IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01.

Предпочтительно, чтобы переменная область легкой цепи O12/IgVκ1-39*01 представляла собой последовательность зародышевой линии. Предпочтительно, чтобы O12/IgVκ1-39*01, содержащая переменную область легкой цепи, представляла собой последовательность зародышевой линии. Также предпочтительно, чтобы IGJκ1*01 или IGJκ5*01, содержащая переменную область легкой цепи, представляла собой последовательность зародышевой линии. Согласно предпочтительному варианту реализации переменные области легких цепей IGKV1-39/jk1 или IGKV1-39/jk5 представляют собой последовательности зародышевой линии. Легкая цепь O12 указанного биспецифического антитела предпочтительно представляет собой легкую цепь O12 согласно описанию выше в настоящем документе.

Опухолевый антиген определяют по паттерну его экспрессии. Опухолеспецифический антиген, как правило, присутствует только на клетках опухоли, но не на каких-либо других клетках в постнатальном периоде, предпочтительно, в организме взрослого человека. Опухолеассоциированный антиген, как правило, присутствует на клетках опухоли, а также на некоторых нормальных клетках в постнатальном периоде, предпочтительно, в организме взрослого человека. Опухолевый антиген в настоящем документе представляет собой, как правило, опухолеспецифический или опухолеассоциированный антиген. Опухолевые антигены могут быть вовлечены или не вовлечены в онкогенный процесс. Они могут отличаться или не отличаться от "нормального" белка здоровых индивидуумов. Отметим, что различные опухолеспецифические антигены, как было показано позднее, экспрессируются также на некоторых других, не опухолевых клетках. Предпочтительные опухолевые антигены представляют собой опухолевые антигены, экспрессируемые на поверхности клетки и имеющие внеклеточную часть. Антитело, как правило, связывается с внеклеточной частью антигена.

Термин "антитело" в настоящем документе означает белковую молекулу, принадлежащую к классу белков иммуноглобулинов, содержащую один или более доменов, связывающих эпитоп на антигене, причем такие домены происходят из переменной области антитела или отличаются последовательностью, гомологичной переменной области антитела. Антитела, как правило, состоят из основных структурных единиц - каждое содержит две тяжелых цепи и две легких цепи. Антитела для терапевтического

применения предпочтительно в максимально возможной степени близки естественным антителам подлежащего лечению субъекта (например, антителам человека для субъектов-людей). Связывание антителом может быть выражено через специфичность и аффинность. Специфичность определяет, какой антиген или его эпитоп специфически связывает связывающий домен. Аффинность представляет собой меру силы связывания с конкретным антигеном или эпитопом. Связывание, или "специфическое распознавание" определено как связывание с аффинностью (KD), составляющей по меньшей мере 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, или по меньшей мере 1×10^{-9} М. Антитела для терапевтического применения могут иметь аффинность, составляющую 1×10^{-10} М или даже выше. Антитела согласно настоящему изобретению представляют собой, как правило, биспецифические антитела и относятся к подклассу IgG человека. Предпочтительно, антитела согласно настоящему изобретению относятся к подклассу IgG1 человека. Наиболее предпочтительно, антитела согласно настоящему изобретению представляют собой полноразмерные молекулы IgG. Согласно настоящему изобретению также предложено производное и/или аналог антитела согласно настоящему изобретению. Такое производное и/или аналог содержит домены VH/VL антитела согласно настоящему изобретению, предпочтительно, включая общую переменную область легкой цепи согласно описанию в различных разделах настоящего документа. Подходящими производными являются одноцепочечные Fv-фрагменты, монотела, VHH и Fab-фрагменты. Указанные производные могут быть слиты с доменом C_H2 и C_H3 тяжелой цепи антитела. Указанное производное предпочтительно дополнительно содержит домен C_H1 домен тяжелой цепи антитела и домен C_L легкой цепи антитела. Указанное производное может также быть представлено мультивалентным форматом, предпочтительно, биспецифическим форматом, причем один из доменов VH/VL указанного антитела содержит комбинацию переменной области тяжелой цепи/переменной области легкой цепи (VH/VL), которая связывает CD3 согласно настоящему изобретению, и по меньшей мере один другой домен VH/VL антитела, которое связывает антиген, не являющийся антигеном CD3. Указанный по меньшей мере один другой домен VH/VL антитела предпочтительно связывает опухолевый антиген, предпочтительно CLEC12A. Мультивалентные форматы легко получить, например, путем получения такого производного, как слитый белок, содержащий или не содержащий подходящий и/или стандартный пептидный линкер или спейсер между доменами VH/VL.

"Биспецифическое антитело" представляет собой антитело согласно описанию выше в настоящем документе, содержащее одну комбинацию переменной области тяжелой цепи/переменной области легкой цепи (VH/VL), которая связывает CD3, и вторую комбинацию VH/VL, которая связывает антиген, отличный от CD3, предпочтительно, опухолевый антиген. Согласно предпочтительному варианту реализации VL в указанной первой комбинации VH/VL аналогична VL в указанной второй комбинации VH/VL. Согласно более предпочтительному варианту реализации области VL в указанных первой и второй комбинациях VH/VL идентичны. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело представляет собой полноразмерное антитело, которое содержит одну комбинацию тяжелой/легкой цепей, которая связывает CD3, и одну комбинацию тяжелой/легкой цепей, которая связывает другой антиген, предпочтительно, опухолевый антиген.

Связывание комбинации тяжелой/легкой цепей с антигеном достигается за счет сайта связывания антигена в переменной области указанной комбинации тяжелой/легкой цепей.

Согласно настоящему изобретению также предложены альтернативные биспецифические форматы, такие как описанные в источнике: Spiess, C., et al., (Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. Mol. Immunol. (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2015.01.003>). Биспецифические форматы антител, не являющихся классическими антителами, с двумя комбинациями H/L, содержат по меньшей мере переменный домен, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи согласно настоящему изобретению. Указанный переменный домен может быть соединен с одноцепочечным Fv-фрагментом, монотелом, VHH и Fab-фрагментом, обеспечивающим второй вид связывающей активности.

Термин "биспецифическое антитело" может быть заменен более широким термином "биспецифический связывающий белок, содержащий переменный домен иммуноглобулина, связывающий CD3, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи согласно настоящему изобретению; и антигенсвязывающий (поли)пептид, который связывает другой антиген. Согласно указанному варианту реализации связывающий (поли)пептид предпочтительно представляет собой (поли)пептид согласно описанию Spiess с соавторами (выше).

В биспецифическом антителе согласно настоящему изобретению легкая цепь в связывающей CD3 комбинации цепей H/L предпочтительно аналогична легкой цепи в комбинации цепей H/L, способной связывать антиген, отличный от CD3, предпочтительно, опухолевый антиген. Согласно более предпочтительному варианту реализации указанная легкая цепь в обеих комбинациях цепей H/L идентична, т.е. указанная легкая цепь человека представляет собой так называемую "общую легкую цепь", представляющую собой легкую цепь, которая может быть скомбинирована с разными тяжелыми цепями с образованием антител с функциональными антигенсвязывающими доменами. Предпочтительно, общая легкая цепь содержит последовательность зародышевой линии. Предпочтительной последовательностью

зародышевой линии является переменная область легкой цепи часто используемая в репертуаре человека и отличающаяся хорошей термодинамической стабильностью, выработкой и растворимостью. Предпочтительной легкой цепью зародышевой линии является O12, предпочтительно реаранжированный IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 легкой цепи каппа зародышевой линии человека или его фрагмент или функциональный эквивалент (т.е. тот же генный сегмент IgVκ1-39, но другой генный сегмент IGJκ) (номенклатура соответствует базе данных IMGT в сети Интернет по адресу: imgt.org).

Термин "общая легкая цепь" в настоящем документе относится к двум легким цепям (или их VL-части) в биспецифическом антителе. Указанные две легкие цепи (или их VL-часть) могут быть идентичными или иметь несколько различающиеся последовательности аминокислот, при этом специфичность связывания полноразмерного антитела не нарушается. Например, в объем определения общих легких цепей в настоящем документе входит получение или поиск легких цепей, не являющихся идентичными, но при этом функционально эквивалентных, например, путем введения и тестирования консервативных изменений аминокислот, изменений аминокислот в областях, которые не вносят или только частично вносят вклад в специфичность связывания при спаривании с тяжелой цепью, и т.п. Все такие термины, как "общая легкая цепь", "общая VL", "одиночная легкая цепь", "одиночная VL", с добавлением или без добавления термина "реаранжированный" (перестроенный), используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Предпочтительно, общая легкая цепь содержит последовательность зародышевой линии. Предпочтительная последовательность зародышевой линии представляет собой переменную область легкой цепи, часто используемую в репертуаре человека. Предпочтительной легкой цепью зародышевой линии является O12, предпочтительно, реаранжированный IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 легкой цепи каппа зародышевой линии человека или его фрагмент или функциональный эквивалент (т.е. тот же генный сегмент IgVκ1-39, но другой генный сегмент IGJκ) (номенклатура соответствует базе данных IMGT в сети Интернет по адресу: imgt.org). Термины: реаранжированная легкая цепь каппа IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 зародышевой линии человека, IGKV1-39/IGKJ1, легкая цепь huVκ1-39 или, коротко, huVκ1-39 используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Очевидно, что специалистам в данной области техники будет понятно, что "общий" также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи с неидентичной последовательностью аминокислот. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, отличающихся присутствием мутаций (делеций, замен, инсерций и/или присоединения), существенно не влияющих на образование функциональных связывающих областей. Легкая цепь согласно настоящему изобретению может также представлять собой легкую цепь согласно описанию выше в настоящем документе, содержащую 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или комбинацию вышеперечисленного.

Антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой IgG-антитело, предпочтительно IgG1-антитело. Термин "полноразмерный IgG" в соответствии с настоящим изобретением определен как содержание по существу полного IgG, который, однако, не обязательно обладает всеми функциями интактного IgG. Во избежание разночтений уточним, что полноразмерный IgG содержит две тяжелых и две легких цепи. Каждая цепь содержит константные (C) и переменные (V) области, которые могут быть разбиты на домены, обозначаемые как CH1, CH2, CH3, VH, и CL, VL. IgG-антитело связывается с антигеном посредством доменов переменных областей, содержащихся в Fab-части, и после связывания может взаимодействовать с молекулами и клетками иммунной системы посредством константных доменов, преимущественно посредством Fc-части. Полноразмерные антитела в соответствии с настоящим изобретением включают молекулы IgG, отличающиеся тем, что в них могут присутствовать мутации, которые обеспечивают требуемые характеристики. Полноразмерный IgG не должен содержать делеций существенных частей любых из областей. Однако термином "полноразмерный IgG" охвачены молекулы IgG, в которых одна или несколько остатков аминокислот удалены, но при этом по существу не происходит изменения связывающих характеристик итоговой молекулы IgG. Например, в таких молекулах IgG может быть удалено от 1 до 10 остатков аминокислот, предпочтительно в не относящихся к CDR областям, при этом указанные удаленные аминокислоты не имеют существенного значения для специфичности связывания указанного IgG.

Полноразмерные IgG-антитела используют ввиду благоприятного времени полужизни и желания сохранить максимальную близость к полностью аутологичным молекулам (человека) по связанным с иммуногенностью причинам. IgG1 является благоприятным ввиду продолжительного времени полужизни в кровотоке у человека. Чтобы предотвратить или избежать иммуногенности у человека предпочтительно, чтобы биспецифическое полноразмерное IgG-антитело в соответствии с настоящим изобретением представляло собой IgG1 человека. Термин "биспецифические" означает, что одна комбинация тяжелой и легкой цепей (комбинация H/L) или одно плечо указанного антитела связывается с первым антигеном, тогда как другая комбинация H/L или другое плечо связывается с вторым антигеном, причем указанные первый и второй антигены неидентичны. Антиген, как правило, представляет собой молекулу, которая служит в качестве мишени антитела. Согласно настоящему изобретению предпочтительно, чтобы антиген представлял собой белок, экспрессируемый на мембране клетки индивидуума. В соответст-

вии с настоящим изобретением указанные первый и второй антигены расположены на двух разных молекулах, предпочтительно локализованных на клетках двух разных типов. Термин "одно плечо [антитела]" предпочтительно означает комбинацию тяжелой цепи/легкой цепи, содержащую одну Fab-часть полноразмерного IgG-антитела. Биспецифические антитела, которые опосредуют цитотоксичность путем рекрутинга и активации эндогенных иммунных клеток, представляют собой развивающийся класс терапевтических антител последнего поколения. Это может быть достигнуто путем комбинирования специфичности связывания антигенов на целевых клетках (т.е. опухолевых клетках) и эффекторных клетках (т.е. Т-клетках, NK-клетках и макрофагах) в одной молекуле (Cui et al. JBC 2012 (287) 28206-28214; Kontermann, MABS 2012 (4) 182-197; Chames and Baty, MABS 2009 (1) 539-547; Moore et al. Blood 2011 (117) 4542-4551; Loffler et al. 2000 Blood 95:2098; Zeidler et al. 1999 J. Immunol. 163:1246). В соответствии с настоящим изобретением предложены биспецифические антитела, отличающиеся тем, что одна комбинация тяжелой/легкой цепей связывает антиген CLEC12A на аберрантных (опухолевых) клетках, тогда как вторая комбинация тяжелой/легкой цепей связывает CD3 на иммунных эффекторных клетках.

Согласно настоящему изобретению предложены биспецифические IgG-антитела, отличающиеся тем, что одна комбинация тяжелой/легкой цепей специфически распознает CLEC12A или его функциональный эквивалент, в том числе функциональные эквиваленты CLEC12A, в которых отсутствует вышеупомянутый дополнительный внутриклеточный отрезок длиной 10 аминокислот. Биспецифическое IgG-антитело, отличающееся тем, что одна комбинация тяжелой/легкой цепей связывает полноразмерную форму CLEC12A, является предпочтительными. Нет необходимости говорить, что указанная связывающая опухолевый антиген комбинация тяжелой/легкой цепей связывает внеклеточную часть опухолевого антигена.

Термины "домен варибельной области", "варибельная область", "варибельный домен", "пара VH/VL", "VH/VL", "VH", "VL", "Fab-часть", "Fab-плечо", "Fab" или "плечо" используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

Связывание антигена антителом, как правило, опосредовано областями комплементарности указанного антитела и специфической трехмерной структурой как антигена, так и варибельного домена, обеспечивающей точное связывание указанных двум структур (взаимодействие, аналогичное взаимодействию замка и ключа), отличающееся от случайного неспецифического "слипания" антител. Поскольку антитело, как правило, распознает эпитоп антигена, и поскольку такой эпитоп может присутствовать также в других белках, антитела в соответствии с настоящим изобретением, связывающие CD3 или CLEC12A, могут распознавать также и другие белки, если такие другие белки содержат тот же эпитоп. Соответственно, термин "связывание" не исключает связывания антител с другим белком или белками, содержащими тот же эпитоп. Комбинация тяжелой/легкой цепей в антителе согласно настоящему изобретению, которая связывает CD3, не связывается с другими белками на мембране клеток в постнатальном периоде, предпочтительно, клеток взрослого человека. Комбинация тяжелой/легкой цепей, которая связывает CLEC12A согласно настоящему изобретению, не связывает другие белки на мембране клеток в постнатальном периоде, предпочтительно, клеток взрослого человека.

Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое связывает CD3 и опухолевый антиген, связывается с CD3 (предпочтительно CD3 на эффекторных клетках) с аффинностью связывания, составляющей по меньшей мере 1×10^{-6} М, как более подробно описано ниже. Согласно предпочтительному варианту реализации аффинность связывания CD3 составляет 1×10^{-6} М - 1×10^{-10} М, предпочтительно 1×10^{-7} М - 1×10^{-9} М. Биспецифическое антитело в соответствии с настоящим изобретением, которое связывает CD3 и опухолевый антиген, связывается с указанным опухолевым антигеном предпочтительно с аффинностью связывания, превышающей аффинность, с которой он связывает CD3. Согласно предпочтительному варианту реализации аффинность связывания опухолевого антигена на опухолевых клетках по меньшей мере в 2 раза, более предпочтительно в 4 раза более предпочтительно в 6 раз или в 10 раз превышает аффинность связывания с CD3. Согласно предпочтительному варианту реализации аффинность связывания опухолевого антигена составляет 1×10^{-6} М - 1×10^{-10} М, предпочтительно 1×10^{-7} М - 1×10^{-10} М, более предпочтительно по меньшей мере 1×10^{-8} , предпочтительно по меньшей мере 1×10^{-9} , предпочтительно, в комбинации с аффинностью к CD3, которая по меньшей мере в 2 раза, более предпочтительно в 4 раза, более предпочтительно в 6 раз или в 10 раз ниже заданной аффинности связывания с опухолевым антигеном. Согласно предпочтительному варианту реализации аффинность связывания опухолевого антигена составляет 1×10^{-8} - 1×10^{-10} .

Термин "аберрантные клетки" в настоящем документе включает опухолевые клетки, более конкретно, опухолевые клетки гематологического происхождения, в том числе и предлейкозные клетки, такие как клетки, вызывающие миелодиспластические синдромы (МДС), и такие лейкозные клетки, как опухолевые клетки острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) или клетки хронического миелоидного лейкоза (ХМЛ).

Термин "иммунная эффекторная клетка" или "эффекторная клетка" в настоящем документе относится к клетке, входящей в естественный репертуар клеток иммунной системы млекопитающих, которые могут быть активированы для влияния на жизнеспособность целевой клетки. Иммунные эффекторные

клетки включают клетки лимфоидных линий, такие как естественные киллерные (NK) клетки, Т-клетки, в том числе цитотоксические Т-клетки, или В-клетки, однако как иммунные эффекторный клетки также могут рассматриваться и клетки миелоидных линий, такие как моноциты или макрофаги, дендритные клетки и нейтрофильные гранулоциты. Соответственно, указанная эффекторная клетка предпочтительно представляет собой NK-клетку, Т-клетку, В-клетку, моноцит, макрофаг, дендритную клетку или нейтрофильный гранулоцит. В соответствии с настоящим изобретением рекрутинг эффекторных клеток к аберрантным клеткам означает, что иммунные эффекторные клетки приводят в непосредственную близость к аберрантным целевым клеткам, таким образом указанные эффекторные клетки могут осуществлять непосредственный киллинг или непрямо инициировать киллинг аберрантных клеток, к которым они рекрутированы. Предпочтительно, чтобы связывающее CD3 антитело связывало CD3 на поверхности эффекторных клеток.

Антитело, которое связывает CD3 человека, согласно настоящему изобретению включает переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS

с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A.

Переменная область тяжелой цепи может содержать 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного. Инсерции, делеции, замены, присоединения аминокислот относительно заданной последовательности или их комбинация вводят, подразумевается, только в положениях, отличных от положений, заданных как X₁X₂. В заданных X₁X₂ положениях могут находиться только заданные аминокислоты. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная переменная область тяжелой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного в положениях, отличных от положений, заданных X₁X₂. Комбинация инсерции, присоединения, делеции или замены представляет собой заявленную комбинацию в тех случаях, когда последовательности после выравнивания не различаются более чем в 10, предпочтительно не более чем в 5 положениях. Размер пропуска в одной из последовательностей после выравнивания рассчитывают по количеству пропущенных относительно другой последовательности аминокислот.

Указанные инсерции, делеции, замены, присоединения аминокислот или их комбинация находятся предпочтительно вне области CDR3 переменной области тяжелой цепи, предпочтительно вне области CDR1 и/или CDR2 переменной области тяжелой цепи. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная переменная область тяжелой цепи не содержит делеции, присоединения или инсерции относительно заданной последовательности. Согласно указанному варианту реализации переменная область тяжелой цепи может содержать 0-10, предпочтительно 0-5 замен аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот. Замена аминокислоты предпочтительно представляет собой консервативную замену аминокислоты.

Антитело, которое связывает CD3 человека согласно настоящему изобретению, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность аминокислот: QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS

с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A,

предпочтительно представляет собой антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность аминокислот, обозначенную номерами: 5192; 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12, 25 и 28. Указанная переменная область тяжелой цепи предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обо-

значенную номерами: 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12 и 25. Указанная варибельная область тяжелой цепи антитела предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номером: 5196, представленную на фиг. 12.

Согласно настоящему изобретению также предложено биспецифическое антитело, связывающее CD3 человека согласно настоящему изобретению, которое содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом варибельная область указанной тяжелой цепи содержит последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS
с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A.

Легкая цепь предпочтительно представляет собой общую легкую цепь согласно описанию в различных разделах в настоящем документе. Указанное биспецифическое антитело дополнительно содержит комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи, которая связывает другой антиген, предпочтительно, опухолевый антиген. Легкая цепь указанной комбинации тяжелой цепи и легкой цепи которая связывает другой антиген, предпочтительно представляет собой общую легкую цепь согласно описаниям в различных разделах настоящего документа. Тяжелая цепь, которая содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS
с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A, предпочтительно представляет собой тяжелую цепь, которая содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую последовательность аминокислот, обозначенную номерами: 5192; 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12, 25 и 28. Варибельная область тяжелой цепи указанного биспецифического антитела предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номерами: 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12 и 25. Варибельная область тяжелой цепи указанного биспецифического антитела предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номером: 5196 на фиг. 12.

Биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению, которое содержит варибельную область тяжелой цепи, которая содержит последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVASG FTFSS YGMHW VRQAP GKGLE WVAAI WYX₁X₂R
KQDYA DSVKG RFTIS RDNSK NTLYL QMNSL RAEDT AVYYC TRGTG YNWFD PWGQG TLVTV SS
с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A

предпочтительно дополнительно содержит комбинацию тяжелой/легкой цепей, которая связывает CLEC12A человека. Согласно предпочтительному варианту реализации тяжелая цепь указанной комбинации тяжелой/легкой цепей, которая связывает CLEC12A человека, содержит варибельную область, которая содержит последовательность аминокислот:

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT SYMH WVRQA PGQGL EWMGI INPSG
GSTSY AQKFQ GRVTM TRDTS TSTVY MELSS LRSED TAVYY CAKGT TGDWF DYWGQ GTLVT
VSS;

EVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT SYMH WVRQA PGQGL EWMGI INPSG

GSTSY AQKFQ GRVTM TRDTS TSTVY MELSS LRSED TAVYY CARGN YGDEF DYWGQ GTLVT VSS
или

QVQLV QSGAE VKKPG ASVKV SCKAS GYTFT GYYMH WVRQA PGQGL EWMGW INPNS
GGTNY AQKFQ GRVTM TRDTS ISTAY MELSR LRSDD TAVYY CARDG YFADA FDYWG QGTLV
TVSS;

с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией.

Вариабельная область тяжелой цепи указанной комбинации тяжелой/легкой цепей, которая связывает CLEC12A человека, может содержать 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного. Комбинация инсерции, делеции, присоединения или замены представляет собой заявленную комбинацию, если последовательности после выравнивания не различаются более чем в 5 положениях. Размер пропуска в одной из последовательностей после выравнивания рассчитывают по количеству пропущенных относительно другой последовательности аминокислот.

При инсерции, делеции, замене, добавлении аминокислоты или комбинация перечисленного в связывающей CD3 вариабельной области тяжелой цепи согласно описанию в настоящем документе H35, A61, Y102, N103 и W104 и положения в области CDR3 VH предпочтительно остаются неизменными. Если модифицирован A50, его предпочтительно заменяет S, Y, M или Q. Если модифицирован D59, его предпочтительно заменяют на Y или E, однако также возможна замена D59 на L, I, V, F, R, A, N, H, S, T. Если заменяют A61, предпочтительно, его заменяют на N, I, H, Q, L, R, Y, E, S, T, D, K, V. Если модифицирован F105, его предпочтительно заменяют на Y или M. В случае CD3 VH согласно настоящему изобретению релевантными для связывания CD3 предположительно являются остатки H35, Y102, N103 и W104. Другие специфические замены в положениях A50, D59, A61 и F105 также релевантны, однако не оказывают влияния на связывание CD3. В столбце 2 табл. 2 перечислены введенные замены аминокислот. Те из них, которые были использованы, приведены в столбце 3. Замены аминокислот, введенные, однако не использованные, предположительно, оказывают влияние на антитело и являются нежелательными. Например, нежелательна мутация A50I. Допустимые замены аминокислот могут легко быть обнаружены с применением способа, описанного в примере 5A, совместно с катионообменной ВЭЖХ (СІЕХ-НPLC) после хранения.

Инсерцию, делецию, замену, добавление аминокислоты или комбинация перечисленного предпочтительно не осуществляют в области интерфейса связывания тяжелой и легкой цепей.

Если изменяют аминокислоту в области интерфейса взаимодействия цепей H/L, предпочтительно, чтобы были изменены соответствующие аминокислоты в другой цепи для соответствия указанному изменению. Инсерция или добавление аминокислоты предпочтительно не включает инсерцию или добавление пролина.

Добавление аминокислоты может в принципе рассматриваться как инсерция. Добавление аминокислоты к одному из концов полипептидной цепи иногда считают не инсерцией, а строго добавлением (удлинением). Согласно настоящему изобретению и добавление внутри цепи, и добавление к одному из концов считают инсерцией.

Указанные инсерции, делеции, замены, присоединения аминокислот или их комбинация находятся предпочтительно вне области CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, предпочтительно вне области CDR1 или CDR2 вариабельной области тяжелой цепи. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи не содержит делеции, присоединения или инсерции относительно заданной последовательности. Согласно указанному варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи может содержать 0-5 замен аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот. Замена аминокислоты предпочтительно представляет собой консервативную замену аминокислоты. Области CDR1, CDR2 и CDR3 связывающей CD3 VH согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат, соответственно, последовательность аминокислот GFTFSSYG в случае CDR1 (в соответствии с IMGT), IWYNARKQ в случае CDR2 и GTGYNWFDP в случае CDR3. Области CDR1, CDR2 и CDR3 связывающей CLEC12A VH согласно настоящему изобретению предпочтительно содержат, соответственно, последовательность аминокислот GYTFSSYY в случае CDR1, INPSGGST в случае CDR2, и GTTGDWFDY в случае CDR3.

Вариабельная область легкой цепи содержит предпочтительно V-сегмент вариабельной области 012 зародышевой линии. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит V-сегмент легкой цепи каппа IgV κ 1-39*01. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит легкую цепь каппа IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*05. Согласно наиболее предпочтительному варианту rea-

лизации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность легкой цепи каппа зародышевой линии IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01.

Предпочтительно, чтобы в биспецифическом антителе согласно настоящему изобретению легкая цепь была одинаковой для обеих комбинаций тяжелой цепи/легкой цепи. Такую легкую цепь также называют "общей легкой цепью". Термин "общая легкая цепь" в соответствии с настоящим изобретением относится к легким цепям, которые могут быть идентичными или иметь несколько различающиеся последовательности аминокислот, при этом специфичность связывания антитела не нарушается. Например, в объем определения общих легких цепей в настоящем документе может входить получение или поиск легких цепей, не являющихся идентичными, но при этом функционально эквивалентных, например, путем введения и тестирования консервативных изменений аминокислот, изменений аминокислот в областях, которые не вносят или только частично вносят вклад в специфичность связывания при спаривании с тяжелой цепью, и т.п. Все такие термины, как "общая легкая цепь", "общая VL", "одиночная легкая цепь", "одиночная VL", с добавлением или без присоединения термина "реаранжированная", используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Согласно аспекту настоящего изобретения в качестве легкой цепи может быть использована легкая цепь человека, которая может быть скомбинирована с разными тяжелыми цепями с образованием антител с функциональными антигенсвязывающими доменами (WO2004/009618, WO2009/157771, Merchant et al. 1998, Nissim et al. 1994). Предпочтительно, общая легкая цепь имеет последовательность зародышевой линии. Предпочтительная последовательность зародышевой линии представляет собой вариабельную область легкой цепи, часто используемую в репертуаре человека и отличающуюся превосходной способностью к спариванию с множеством разных областей VH и хорошей термодинамической стабильностью, выработкой и растворимостью.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанная общая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит O12/IgV κ 1-39*01 зародышевой линии. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит легкую цепь каппа IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 или IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01. Согласно предпочтительному варианту реализации - IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01. Вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит легкую цепь каппа IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 зародышевой линии или легкую цепь каппа IgV κ 1-39*01/IGJ κ 5*01 зародышевой линии. Согласно предпочтительному варианту реализации -IgV κ 1-39*01/IGJ κ 1*01 зародышевой линии. Очевидным образом, специалистам в данной области техники будет понятно, что "общая" также относится к функциональным эквивалентам легкой цепи, последовательность аминокислот которой не идентична. Существует множество вариантов указанной легкой цепи, отличающихся присутствием мутаций (делеций, замен, добавлений), существенно не влияющих на образование функциональных связывающих областей.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK или DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот относительно указанной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного. Комбинация инсерции, делеции, присоединения или замены представляет собой заявленную комбинацию в тех случаях, когда последовательности после выравнивания не различаются более чем по 5 положениям. Размер пропуска в одной из последовательностей после выравнивания рассчитывают по количеству пропущенных относительно другой последовательности аминокислот. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK. Согласно другому предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK.

Указанные инсерции, делеции, замены, присоединения аминокислот или их комбинация предпочтительно находятся вне области CDR3 вариабельной области легкой цепи, предпочтительно вне области CDR1 или CDR2 вариабельной области тяжелой цепи. Согласно предпочтительному варианту реализа-

ции вариабельная область тяжелой цепи не содержит делеции, присоединения или инсерции относительно заданной последовательности. Согласно указанному варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи может содержать 0-5 замен аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот. Замена аминокислоты предпочтительно представляет собой консервативную замену аминокислоты. Области CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит, соответственно, последовательность аминокислот CDR1 -QSISSY, CDR2 - AAS, CDR3 - QQSYSTP, т.е. области CDR IGKV1-39 (в соответствии с IMGT).

Как упомянуто выше в настоящем документе, предпочтительно, чтобы антитело согласно настоящему изобретению представляло собой биспецифическое антитело. Согласно предпочтительному варианту реализации указанное биспецифическое антитело содержит связывающую CD3 комбинацию тяжелой/легкой цепей согласно описанию в настоящем документе, и комбинацию тяжелой/легкой цепей, которая связывает опухолевый антиген.

Согласно предпочтительному варианту реализации указанная связывающая опухолевый антиген комбинация тяжелой/легкой цепей связывает CLEC12A.

Константная область (биспецифического) антитела согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой константную область человека. Указанная константная область может содержать одно или более, предпочтительно не более чем 10, предпочтительно не более чем 5 различных аминокислот относительно константной области встречающегося в природе антитела человека. Различные вариабельные домены продуцируемых согласно настоящему описанию антител происходят из библиотеки вариабельных доменов антител человека. По существу, такие указанные вариабельные домены принадлежат человеку. Уникальные области CDR могут происходить от человека, быть синтетическими или происходить из другого организма. Антитело или биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно представляет собой антитело человека или гуманизованное антитело.

В данной области техники существуют различные способы получения антител. Антитела, как правило, продуцирует клетка, экспрессирующая нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Подходящими для продуцирования антитела клетками являются гибридная клетка, клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетка NS0 или клетка PER. С6. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO.

Различные организации и компании разработали линии клеток для крупномасштабного получения антител, например, для клинического применения. Неограничивающими примерами таких линий клеток являются клетки CHO, клетки NS0 или клетки PER.С6. Указанные клетки используют также для других целей, например, для получения белков. Линии клеток, разработанные для получения белков и антител в промышленных масштабах, далее в настоящем документе называются промышленными линиями клеток. Согласно предпочтительному варианту реализации в настоящем изобретении предложена промышленная линия клеток, которая продуцирует антитело согласно настоящему изобретению.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложена клетка, содержащая антитело в соответствии с настоящим изобретением и/или нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением. Указанная клетка предпочтительно представляет собой клетку животного, более предпочтительно, клетку млекопитающего, более предпочтительно, клетку примата, наиболее предпочтительно, клетку человека. Для целей настоящего изобретения подходящей клеткой является любая клетка, которая может содержать и предпочтительно продуцировать антитело в соответствии с настоящим изобретением и/или нуклеиновую кислоту в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно настоящему изобретению также предложена клетка, содержащая антитело в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно, указанная клетка (как правило, выделенная *in vitro* или рекомбинантная клетка) продуцирует указанное антитело. Согласно предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой гибридную клетку, Клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку NS0 или клетку PER. С6. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO. Дополнительно предложена культура клеток, содержащая клетку в соответствии с настоящим изобретением. Различные организации и компании разработали линии клеток для крупномасштабного получения антител, например для клинического применения. Неограничивающие примеры таких линий клеток представлены клетками CHO, клетками NS0 или клетками PER.С6. Указанные клетки также используют для других целей, например, для получения белков. Линии клеток, разработанные для получения белков и антител в промышленных масштабах, далее в настоящем документе называются промышленными линиями клеток. Соответственно, согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения предложено применение линии клеток, разработанной для крупномасштабного получения антитела, для получения антитела согласно настоящему изобретению. Согласно настоящему изобретению также предложена клетка для получения антитела, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую VH, VL и/или тяжелую и легкую цепи заявленного антитела. Предпочтительно, указанная молекула нуклеиновой кислоты кодирует VH, обозначенную номером 5196 на фиг. 12, кодирует VH, обозначенную номером 4327 на фиг. 24, или их комбинацию.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки согласно настоящему изобретению и сбор указанного антитела из указанной

культуры. Предпочтительно, указанную клетку культивируют в не содержащей сыворотки среде. Предпочтительно, указанная клетка адаптирована для суспензионного роста. Дополнительно предложено антитело, которое может быть получено с применением способа получения антитела в соответствии с настоящим изобретением. Указанное антитело предпочтительно очищено от культуральной среды. Предпочтительно, указанное антитело является аффинно очищенным.

Клетка согласно настоящему изобретению представляет собой, например, клетку гибридной линии, клетку CHO, клетку 293F, клетку NS0 или клетку другого типа, которая, как известно, подходит для получения антитела для клинического применения. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой клетку человека, предпочтительно, клетку, трансформированную областью аденовируса E1 или ее функциональным эквивалентом. Предпочтительным примером такой линии клеток является клеток PER.C6 или ее эквивалент. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная клетка представляет собой клетку CHO или ее вариант. Предпочтителен вариант с применением глутаминсинтетазной (GS) векторной системы для экспрессии антитела.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ получения антитела, включающий культивирование клетки согласно настоящему изобретению и сбор указанного антитела из указанной культуры. Предпочтительно, указанную клетку культивируют в не содержащей сыворотки среде. Предпочтительно, указанная клетка адаптирована для суспензионного роста. Дополнительно предложено антитело, которое может быть получено с применением способа получения антитела в соответствии с настоящим изобретением. Указанное антитело предпочтительно очищено от культуральной среды. Предпочтительно, указанное антитело является аффинно очищенным.

Биспецифические антитела, как правило, также продуцируют клетки, экспрессирующие нуклеиновую кислоту, кодирующие указанное антитело. В указанном случае клетка экспрессирует разные легкие и тяжелые цепи, составляющие биспецифическое антитело. Для этого указанная клетка экспрессирует две разных тяжелых цепи и по меньшей мере одну легкую цепь. Поскольку немодифицированные тяжелые цепи могут спариваться друг с другом с образованием димеров, такие клетки, как правило, продуцируют два моноклональных антитела (гомодимеры) помимо биспецифического антитела (гетеродимер). Число возможных комбинаций тяжелой/легкой цепи в продуцированных антителах увеличивается, если указанная клетка экспрессирует две или более легких цепи. Для снижения числа разных продуцированных видов антитела (комбинаций разных тяжелых и легких цепей) предпочтительно использование вышеупомянутой "общей легкой цепи".

Продуцирующая антитело клетка, которая экспрессирует общую легкую цепь и равные количества двух тяжелых цепей, как правило, продуцирует 50% биспецифического антитела и по 25% каждого из моноспецифических антител (т.е. содержащих идентичные комбинации тяжелых и легких цепей). Были опубликованы описания нескольких способов для преимущественного продуцирования указанного биспецифического антитела или, наоборот, моноспецифических антител. Согласно настоящему изобретению предпочтительно, чтобы клетка преимущественно продуцировала биспецифическое антитело, а не соответствующие моноспецифические антитела. Это, как правило, достигается путем модификации константной области тяжелых цепей таким образом, что они способствуют гетеродимеризации (т.е. димеризации с тяжелой цепью другой комбинации тяжелой/легкой цепей), а не гомодимеризации. Согласно предпочтительному варианту реализации биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению включает две разных тяжелых цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. Различные совместимые домены гетеродимеризации были описаны в данной области техники (см., например, Gunasekaran et al. JBC 2010 (285) 19637-19646). Указанные совместимые домены гетеродимеризации представляют собой предпочтительно совместимые домены гетеродимеризации CH3 тяжелых цепей иммуноглобулина. Из уровня техники известны различные способы достижения такой гетеродимеризации тяжелых цепей. Одним из способов является получение биспецифических антител согласно принципу "выступы-во-впадины". См. заявку на патент США 20030078385 (Arathoon et al. - Genentech).

В US13/866747 (в настоящее время присвоен номер US 9248181), US14/081848 (в настоящее время присвоен номер US 9358286) и PCT/NL2013/050294 (опубликована как WO2013/157954), которые включены в настоящий документ посредством ссылок, раскрыты способы и методы получения биспецифических антител с применением совместимых доменов гетеродимеризации. Указанные методы и способы могут также быть благоприятным образом использованы согласно настоящему изобретению. В частности, предпочтительные мутации для получения по существу только биспецифических полноразмерных молекул IgG представлены заменами аминокислот L351K и T366K (нумерация в соответствии с Kabat) в первом домене CH3 ("КК-вариант" тяжелой цепи) и заменами аминокислот L351D и L368E во втором домене ("DE-вариант" тяжелой цепи), или наоборот. Ранее авторами изобретения согласно патентам US 9248181 и US 9358286, а также заявке WO2013/157954 PCT, было продемонстрировано, что DE-вариант и КК-вариант преимущественно спариваются с образованием гетеродимеров (так называемые биспецифические молекулы "DEКК"). Гомодимеризация DE-варианта тяжелых цепей (гомодимеры DEDE) или КК-варианта тяжелых цепей (гомодимеры КККК) маловероятна ввиду сильно выраженного отталкивания заряженных остатков на поверхности взаимодействия CH3-CH3 идентичных тяжелых цепей.

Согласно одному варианту реализации комбинация тяжелой цепи/легкой цепи, которая содержит

вариабельный домен, связывающий CD3, содержит вариант тяжелой цепи КК. Согласно указанному варианту реализации комбинация тяжелой цепи/легкой цепи, которая содержит вариабельный домен, связывающий антиген, отличный от CD3, содержит вариант тяжелой цепи DE. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный антиген, отличный от CD3, представляет собой CLEC12A. Согласно предпочтительному варианту реализации VH вариабельного домена, который связывает CLEC12A, представляет собой MF4327_VH, представленную на фиг. 24.

Некоторые антитела модифицированы в CH2/нижней шарнирной области, например, для снижения взаимодействия с Fc-рецептором или снижения связывания с C1q. Согласно некоторым вариантам реализации антитело согласно настоящему изобретению представляет собой IgG-антитело с мутантным CH2 и/или нижним шарнирным доменом, обеспечивающим снижение взаимодействия указанного биспецифического антитела IgG с рецептором Fc-гамма. Такой мутантный CH2 и/или нижний шарнирный домен предпочтительно содержит замену аминокислоты в положении 235 и/или 236 (нумерация по Kabat), предпочтительно замену L235G и/или G236R.

Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака или риска возникновения рака у субъекта, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту биспецифического антитела, которое связывает CD3 человека, отличающегося тем, что оно содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит указанную последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA IWYX₁X₂R
KQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT GYNWF DPWGQ GTLVT VSS
с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X₁X₂;

где

X₁ = N и X₂ = A;

X₁ = N и X₂ = T;

X₁ = S и X₂ = G;

X₁ = H и X₂ = G;

X₁ = D и X₂ = G или

X₁ = H и X₂ = A; и

комбинацию тяжелой цепи - легкой цепи (H/L), которая связывает опухолевый антиген.

Легкая цепь предпочтительно содержит общую вариабельную область легкой цепи. Указанная общая вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит вариабельную область легкой цепи O12/IgVκ1-39. Указанная вариабельная область легкой цепи предпочтительно представляет собой вариабельную область O12/IgVκ1-39*01 зародышевой линии. Указанная вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит легкую цепь каппа IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01. Указанная вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит легкую цепь каппа зародышевой линии IgVκ1-39*01/IGJκ1*01 или IgVκ1-39*01/IGJκ5*01. Указанная вариабельная область легкой цепи предпочтительно содержит последовательность аминокислот

DIQMT QSPSS LSASV GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS
RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK или DIQMT QSPSS LSASV
GDRVT ITCRA SQSIS SYLNW YQQKP GKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP
EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK с 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией. Предпочтительно комбинация тяжелой цепи/легкой цепи (H/L), которая связывает опухолевый антиген, связывает CLEC12A.

Указанное антитело предпочтительно представляет собой антитело человека или гуманизованное антитело. Предпочтительно, указанное антитело содержит две разных тяжелых цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации. Указанные совместимые домены гетеродимеризации представляют собой предпочтительно совместимые домены гетеродимеризации CH3 тяжелых цепей иммуноглобулина. Указанное биспецифическое антитело предпочтительно представляет собой IgG-антитело с мутантным CH2 и/или нижним шарнирным доменом, обеспечивающим снижение взаимодействия указанного биспецифического антитела IgG с рецептором Fc-гамма. Мутантный CH2 и/или нижний шарнирный домен предпочтительно содержит замену аминокислоты в положении 235 и/или 236 (нумерация по Kabat), предпочтительно, замену L235G и/или G236R. Указанное антитело предпочтительно содержит общую легкую цепь.

Также предложено биспецифическое антитело, которое связывает CD3 человека, отличающееся тем, что оно содержит тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит указанную последовательность аминокислот:

QVQLV QSGGG VVQPG RSLRL SCVAS GFTFS SYGMH WVRQA PGKGL EWVAA IWYX₁X₂
RKQDY ADSVK GRFTI SRDNS KNTLY LQMNS LRAED TAVYY CTRGT GYNWF DPWGQ GTLVT
VSS

с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или

их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положения, обозначенного X_1X_2 ;

где

$X_1 = N$ и $X_2 = A$;

$X_1 = N$ и $X_2 = T$;

$X_1 = S$ и $X_2 = G$;

$X_1 = H$ и $X_2 = G$;

$X_1 = D$ и $X_2 = G$ или

$X_1 = H$ и $X_2 = A$; и

тяжелую цепь и легкую цепь, которые связывают опухолевый антиген.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело согласно настоящему изобретению или его производное, или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в лечении нуждающегося в этом субъекта. Для лечения субъекта с опухолью или подверженного риску возникновения опухоли предпочтительно, чтобы указанное антитело представляло собой биспецифическое антитело согласно настоящему изобретению. Предпочтительно, указанное связывающее CD3 антитело содержит комбинацию тяжелой/легкой цепей, которая связывает опухолевый антиген. Указанное биспецифическое антитело предпочтительно представляет собой связывающее CD3/CLEC12A антитело.

Предложены биспецифические антитела к CD3/опухолевому антигену и фармацевтические композиции, содержащие такие биспецифические антитела, для применения в лечении солидных или гематологических опухолей. Предпочтительными солидными опухолями являются опухоли эпителиального происхождения; гинекологический рак, например, опухоли яичников и эндометрия; рак предстательной железы, рак головного мозга или любая другая солидная опухоль.

Также предложено биспецифическое антитело к CD3/опухолевому антигену согласно настоящему изобретению или его производное, или фармацевтические композиции, содержащие такое биспецифическое антитело или его производное для применения в лечении различных лейкозов и предлейкозных заболеваний миелоидного происхождения, однако также и В-клеточных лимфом. Заболевания, лечение которых может проводиться в соответствии с настоящим изобретением, включают миелоидные лейкозы или предлейкозные заболевания, такие как острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелодиспластический синдром (МДС) и хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ); ходжкинские лимфомы и большинство неходжкинских лимфом. Также В-ОЛЛ; Т-ОЛЛ, мантийноклеточная лимфома являются предпочтительными мишенями для лечения антителом согласно настоящему изобретению. Соответственно, в настоящем изобретении предложено биспецифическое полноразмерное IgG-антитело в соответствии с настоящим изобретением для применения в качестве фармацевтического средства в лечении миелодиспластического синдрома (МДС), хронического миелогенного лейкоза (ХМЛ), множественной миеломы (ММ) или, предпочтительно, острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). Также предложено применение биспецифического IgG-антитела в соответствии с настоящим изобретением в составе медикамента для лечения или предотвращения МДС, ХМЛ, ММ или, предпочтительно, ОМЛ. Предпочтительно, чтобы опухолевый антиген представлял собой CLEC12A.

Количество антитела в соответствии с настоящим изобретением для введения пациенту, как правило, находится в терапевтическом окне, что означает использование количества, достаточного для получения терапевтического эффекта, однако без превышения порогового значения, которое приводит к неприемлемому уровню побочных эффектов. Чем меньшее количество антитела необходимо для получения требуемого терапевтического эффекта, тем больше, как правило, будет указанное терапевтическое окно. Антитело в соответствии с настоящим изобретением, проявляющее достаточные терапевтические эффекты в низкой дозировке является, соответственно, предпочтительным.

В Европе и США ОМЛ диагностируют приблизительно у 30000 пациентов ежегодно. Возраст большинства указанных пациентов составляет 60 лет или более. Старший возраст представляет собой основную негативный определяющий фактор исхода при ОМЛ, и долгосрочная выживаемость (через 5 лет) для получающих интенсивное лечение старших ОМЛ-пациентов составляет приблизительно 10%. Почти у всех пациентов с достигнутой после индукционной химиотерапии ремиссией наблюдается прогрессирование заболевания в пределах 3 лет. Существующие способы постремиссионного лечения продемонстрировали ограниченную эффективность или даже полное отсутствие эффективности у пациентов старших возрастов с ОМЛ. Соответственно, сохраняется значительная нагрузка остаточного устойчивого лейкоза, и выжившая субпопуляция устойчивых к лекарственным средствам лейкозных клеток быстро вызывает рецидив. Для нацеливания на указанные не реагирующие на химиотерапию опухолевые клетки ОМЛ требуются лекарственные средства новых типов, отличающиеся совершенно иными механизмами действия, направленные на индуцирование и поддержание полной ремиссии. Хотя в результате использования ряда комбинаций интенсивной химиотерапии может быть достигнута полная ремиссия (CR) более чем у 50% ОМЛ-пациентов старшего возраста и примерно у 80% пациентов более младшего возраста, улучшение отклика или выживаемости остается основной задачей исследований. В недавно опубликованном сетевом мета-анализе 65 рандомизированных клинических испытаний (15 110 пациентов) у пациентов старших возрастов с ОМЛ большинство измененных экспериментальных схем индукционной

терапии отличаются аналогичными или даже худшими профилями эффективности по сравнению со стандартными схемами индукционной терапии "3+7" с даунорубицином и цитарабином. Указанное стандартное лечение ОМЛ ассоциировано с высокой заболеваемостью и даже смертностью. У большинства пациентов с CR рецидивы происходят из-за оставшихся после химиотерапии лейкозных стволовых клеток. Дальнейшая интенсификация дозы ограничена ввиду неприемлемой токсичности. Соответственно, возникает насущная необходимость в новых видах лечения, предпочтительно отличающихся меньшей токсичностью, в частности, для пациентов старшего возраста с ОМЛ. Лечение нечувствительного к химиотерапии ОМЛ может осуществляться путем перенаправления Т-клеток собственной иммунной системы пациента на опухолевые клетки ОМЛ и последующей специфической в отношении опухолевой мишени активации Т-клеток с применением биспецифического антитела. Указанный процесс также известен как так называемый "подход с привлечением Т-клеток". Таким образом, иммунная система пациентов усиливается и перенаправляется для атаки и эрадикации опухолевых клеток ОМЛ. Согласно настоящему изобретению предложены биспецифические CD3xCLEC12A IgG-антитела, которые эффективно перенаправляют Т-клетки на опухолевые клетки ОМЛ, индуцируя таким образом лизис опухолевых клеток ОМЛ. Биспецифические CD3xCLEC12A антитела обеспечивают, соответственно, нацеленную терапию с меньшим числом побочных эффектов и специфической эрадикацией ОМЛ-бластов и лейкозных стволовых клеток, улучшающую прогноз для ОМЛ-пациентов. Поскольку CLEC12A экспрессируется на лейкозных стволовых клетках (LSC) и не экспрессируется на нормальных гематопоетических стволовых клетках, предполагается, что терапия, направленная против указанного антигена, будет обеспечивать эрадикацию LSC при сохранении нормальных стволовых клеток. Указанные полноразмерные биспецифические IgG-антитела клинически оценивали у пациентов с рецидивирующим и/или рефрактерным ОМЛ. Клиническую эффективность анализируют на основании уменьшения ОМЛ-бластов в костном мозге в качестве критерия объективного ответа. Эффективный биспецифический IgG при ОМЛ представляет собой новый вариант терапии для значительного сегмента пациентов, для которых в настоящее время отсутствует доступная терапия. Помимо обеспечения способа достижения устойчивой ремиссии, указанный вариант лечения также потенциально способен обеспечивать излечение ОМЛ при применении во время ремиссии. Скорее всего, наиболее действенным он будет в ситуациях минимальной остаточной болезни (MRD). Ожидается, что процент рецидивов упадет за счет эрадикации MRD. Таким образом, воздействие на ОМЛ-пациента указанного нового варианта лечения будет отличаться меньшей токсичностью при меньшем проценте рецидивов, что приведет к улучшению исхода, ассоциированного с лучшим качеством жизни.

Антитела 15C3 и 3056, описанные в данной области техники, имеют общую вариабельную область тяжелой цепи, но различаются в вариабельной области легкой цепи. Вариации показателей связывающего потенциала между партиями наблюдались в партиях антитела 3056. В случае антитела 15C3 указанные вариации не были отмечены. Поскольку указанные антитела различаются легкой цепью, разные легкие цепи должны быть причиной указанных различий в поведении. С помощью ДСН-ПААГ было обнаружено, что антитело 3056 было интактным и в партиях с менее активным антителом. 3D-моделирование вариабельных доменов антител позволило обнаружить некоторые изменения укладки домена VH/VL в двух указанных антителах. Поскольку указанные изменения могут объяснить разное поведение указанных антител, были разработаны эксперименты для придания укладке домена VH/VL антитела 3056 большего сходства с 15C3. К сожалению, это не объяснило различий между антителами 15C3 и 3056. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) обнаружило только незначительные различия 15C3 (3055) и 3056, связанных с основной полосой при высокой изоэлектрической точке антитела. Последующий анализ с применением СІЕХ-НPLC, хроматографической техники, которая позволяет разделить варианты по заряду, обнаруживал зависимый от партии очень сложный спектр удерживания с широким профилем элюции для антитела 3056, в отличие от профиля, наблюдаемого для 15C3 (3055). Кроме того, было обнаружено, что паттерн 3056 значимо изменялся с течением времени, что предполагает, что антителу 3056 свойственна нестабильность.

Указанное поведение менялось только после разработки вариантов, отличающихся тем, что цепь 3056_VH изменяли в одном или двух специфических положениях. Указанное поведение варьировало от нестабильности и полного отсутствия связывания до связывания без значимой вариабельности показателей между партиями.

Тяжелая цепь 3056 содержит NG-мотив деамидирования в области CDR2, WYNGRKQ, который мог бы быть вовлечен в наблюдаемую гетерогенность заряда антитела 3056. При моделировании *in silico* Fab 15C3 и 3056 не было обнаружено значимых различий укладки NG-мотива деамидирования в области HCDR2, что говорит против вовлеченности указанного мотива в наблюдаемую нестабильность антитела 3056. Однако, неожиданным образом, изменения, описанные в приведенной формуле изобретения, значимо снижали наблюдаемые вариации показателей между партиями антител согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее вариабельный домен, связывающий CD3, и вариабельный домен, связывающий CLEC12A, при этом вариабельный домен, связывающий CLEC12A, содержит VH, содержащий последовательность аминокислот, обозначенную номе-

ром: 4327 на фиг. 24, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией, а вариабельный домен, связывающий CD3, содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, обозначенную номерами: 5192, 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12, 25 и 28, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положений 54 и 55. Указанная легкая цепь предпочтительно содержит вариабельный домен с последовательностью аминокислот, показанной на фиг. 23, предпочтительно, на фиг. 23В.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее вариабельный домен, связывающий CD3, и вариабельный домен, связывающий CLEC12A, при этом вариабельный домен, связывающий CLEC12A, содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, обозначенную номерами: 4327 на фиг. 24, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией, и вариабельный домен, связывающий CD3, содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, обозначенную номером: 5196 на фиг. 12 с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положений 54 и 55.

Вариабельный домен тяжелой цепи, который связывает CD3, предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номерами 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12 и 25 с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положений 54 и 55. Указанный вариабельный домен, связывающий CD3, предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номером 5196 на фиг. 12, с 0-10, предпочтительно 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях, отличных от положений 54 и 55;

Согласно предпочтительному варианту реализации указанная вариабельная область тяжелой цепи содержит 0-9, 0-8, 0-7, 0-6, 0-5, 0-4, предпочтительно 0-3, предпочтительно 0-2, предпочтительно 0-1 и предпочтительно 0 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот относительно заданной последовательности аминокислот, или комбинацию перечисленного. В случае связывающей CD3 тяжелой цепи указанные инсерции, делеции, замены, присоединения аминокислот находятся в положениях, отличных от положений 54 и 55. Комбинация инсерции, присоединения, делеции или замены представляет собой заявленную комбинацию в тех случаях, когда последовательности после выравнивания не различаются более чем в 10, предпочтительно не более чем в 5 положениях. Размер пропуска в одной из последовательностей после выравнивания рассчитывают по количеству пропущенных относительно другой последовательности аминокислот.

Согласно настоящему изобретению также предложено антитело, содержащее вариабельный домен, связывающий CD3, и вариабельный домен, связывающий CLEC12A, при этом вариабельный домен, связывающий CLEC12A, содержит область VH, содержащую последовательность аминокислот, обозначенную номером: 4327 на фиг. 24, и вариабельный домен, связывающий CD3, содержит VH, содержащую последовательность аминокислот, обозначенную номерами: 5192, 5193; 5196; 5197; 5351; 5354; 5356; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12, 25 и 28. Вариабельный домен тяжелой цепи, который связывает CD3, предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номерами 5196; 5197; 5603; 5616; 5626; 5630; 5648; 5661; или 5694 на фиг. 12 и 25. Вариабельный домен, связывающий CD3, предпочтительно содержит последовательность аминокислот, обозначенную номером: 5196 на фиг. 12.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - ИЭФ PG3055 и PG3056.

Фиг. 2 - анализ PG3055 и PG3056 с применением катионообменной ВЭЖХ.

Фиг. 3 - анализ вариабельности показателей между партиями и стабильности PG3055 и PG3056 с применением катионообменной ВЭЖХ. Слева: партии 3055 с течением времени, справа: партии 3056 с течением времени, сверху образцы, хранившиеся при -80°C, снизу образцы, хранившиеся при 2-8°C в течение > 3 месяцев.

Фиг. 4 - проточно-цитометрический анализ на связывание PG3055 и PG3056 с CD3 на очищенных Т-клетках человека при инкубации в среде IMDM+10% ФБС при 2-8°C или 37°C в течение 7 дней. PG3055 и PG3056: инкубировали в среде IMDM+10% ФБС при 2-8°C в течение 7 дней. PG3055 37°C и PG3056 37°C: PG3055 и PG3056 инкубировали в среде IMDM+10% ФБС при 37°C в течение 7 дней.

Фиг. 5 - слева: модель гомологии Fab PG3056, увеличено изображение вариабельных доменов, VL выделена светло-серым, VH - черным цветом, петли HCDR1-3 - светло-серым цветом. Отмечены остатки Asn54 и Gly55, образующие мотив деамидирования HCDR2. Справа: Наложение моделей гомологии Fab PG3055 (светло-серый) и PG3056 (темно-серый).

Фиг. 6 - выравнивание VH MF3056 (MF3056_VH) и последовательности VH3-33 зародышевой линии.

Фиг. 7 - выравнивание VH MF3056 с VH MF3872, MF3873 и MF3905.

Фиг. 8 - проточно-цитометрический анализ на связывание с CD3 на клетках НРВ-ALL вариантов PG3872, PG3873 и PG3905, PG3056 включали в качестве эталонного контроля.

Фиг. 9 - выравнивание VH MF3056 с VH MF3874, MF3878, MF3883, MF3886 и MF3891.

Фиг. 10 - проточно-цитометрический анализ на связывание с CD3 на клетках НРВ-ALL вариантов PG3874, PG3878, PG3883, PG3886 и PG3891, PG3056 включали в качестве эталонного контроля.

Фиг. 11 - анализ PG3891 с применением катионообменной ВЭЖХ.

Фиг. 12 - выравнивание VH MF3056 с VH MF5192-5197 VH.

Фиг. 13 - проточно-цитометрический анализ на связывание с CD3 на клетках НРВ-ALL вариантов PG5192-5197, PG3056 включали в качестве эталонного контроля.

Фиг. 14 - ИЭФ-анализ PG5196p06.

Фиг. 15 - хроматограмма PG5196, полученная с применением катионообменной ВЭЖХ.

Фиг. 16 - связывание биспецифического антитела (bsAb) 5196x4327 DM-Fc с экспрессируемым на мембране CD3 (НРВ-ALL) и CLEC12A (HL-60).

Фиг. 17 - 5196x4327 DM-Fc bsAb сохраняло способность к CLEC12A-специфической активации CD4 и CD8 Т-клеток, что отражает положительная регуляция раннего маркера активации CD69. Антитело bsAb и контрольные IgG тестировали в концентрации 1000 нг/мл. Проточно-цитометрические данные по активации Т-клеток выражают как процент положительных по CD69 клеток в составе популяций CD4+ или CD8+ Т-клеток. HD1 и HD2 соответствуют двум разным экспериментам с применением Т-клеток, полученных от разных здоровых доноров.

Фиг. 18 - индуцированный 5196x4327 антиген-опосредованный лизис целевых клеток Фиг. 19. Сенсограммы, отражающие скорости связывания и диссоциации белка CD3δε-Fc (А) и CLEC12A (В) с иммобилизованным 5196x4327 DM-Fc bsAb. Сенсограммы отражают ответ (количество белка, связанного с чипом, в условных единицах) как функцию от времени (в секундах). На обеих панелях приведены сенсограммы, полученные с использованием диапазона концентраций антигена (выделены цветом), и соответствующие аппроксимирующие кривые, полученные с применением программного обеспечения BIAevaluation (выделены черным цветом).

Фиг. 20 - первичный образец от ОМЛ-пациента фенотипировали в отношении экспрессии CLEC12A и фракции Т-клеток и ОМЛ-бластов с помощью проточно-цитометрического анализа в начале (день 0) совместного культивирования. Через 7 дней совместного культивирования с 5196x4327 DM-Fc bsAb или изотипическим контролем количественно определяли фракцию и общее число Т-клеток и ОМЛ-бластов с помощью проточно-цитометрического анализа.

Фиг. 21 - DSC-анализ согласно описанию в примере 9.

Фиг. 22 - последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH) антитела 15C3 согласно описанию в WO2005/118635. В указанной патентной публикации описано два варианта антитела 15C3. Оба варианта содержат один и тот же вариабельный домен тяжелой цепи, однако указанный вариабельный домен тяжелой цепи комбинируют с двумя разными вариабельными доменами легкой цепи. При упоминании в настоящем документе антитела 15C3 подразумевается антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи согласно указанной фигуре в комбинации с вариабельным доменом легкой цепи L2 согласно указанной фигуре. Fab-продукт, полученный из VH 15C3 и легкой цепи L2, далее в настоящем документе называется MF3055.

Антитело PG3056 содержит VH согласно настоящему документу в комбинации с вариабельной областью легкой цепи IGKV1-39 согласно указанной фигуре. Fab-продукт, полученный из VH 15C3 и легкой цепи IGKV1-39, далее называется MF3056.

Фиг. 23 - антитело согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит общую легкую цепь. А) Указанная общая легкая цепь предпочтительно содержит последовательность аминокислот, представленную на указанной фигуре как последовательность IGKV1-39. В) Согласно предпочтительному варианту реализации указанная общая легкая цепь содержит последовательность аминокислот, представленную как IGKV1-39/jk1 или IGKV1-39/jk5. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации указанная общая легкая цепь содержит последовательность аминокислот IGKV1-39/jk1 согласно указанной фигуре.

Фиг. 24 - последовательность аминокислот области VH Fab связывающего CLEC12A антитела (MF4327) и последовательность аминокислот области VH связывающего столбнячный токсин (ТТ) Fab (MF1337). Совместно с последовательностью аминокислот общей легкой цепи, представленной на фиг. 23, указанные VH образуют вариабельные домены Fab MF4327 и Fab MF1337, связывающие CLEC12A и столбнячный токсин, соответственно.

Фиг. 25 - примеры связывающих CD3 вариантов MF5196 представлены MF5603, MF5616, MF5626, MF5630, MF5648, MF5661 и MF5694, все указанные варианты содержат реаранжированную область VL IGKV1-39/IGKJ1 человека. Указаны последовательности аминокислот VH Fab.

Фиг. 26 - связывание антител, содержащих VH MF5196; VH MF5603; VH MF5616; VH MF5626; VH MF5630; VH MF5648; VH MF5661 и VH MF5694, и общую легкую цепь, как показано на фиг. 23В, с CD3, экспрессируемым на мембране клеток НРВ-ALL, по результатам анализа с помощью проточной цитометрии.

Фиг. 27 - СІЕХ-НРІС-хроматограмма PG5661.

Фиг. 28 - связывающие CD3 Fab MF5351, Fab MF5354 и Fab MF5356, состоящие из реаранжированной области VL IGKV1-39/IGKJ1 человека, содержат соответствующую изображенную VH.

Фиг. 29 - связывание в PG-формате с CD3, экспрессируемым на мембране клеток HPB-ALL; все указанные примеры связывали CD3.

Примеры

В настоящем документе "MFXXXX", где X представляет собой независимым образом число от 0 до 9, относится к Fab, содержащему вариабельный домен, отличающийся тем, что VH содержит последовательность аминокислот, обозначенную указанными 4 цифрами. Если не указано иное, вариабельная область легкой цепи вариабельного домена, как правило, содержит последовательность согласно фиг. 23, как правило, 23B. "MFXXXX VH" относится к последовательности аминокислот VH, обозначенную указанными 4 цифрами. MF дополнительно содержит константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи, которая в норме взаимодействует с константной областью легкой цепи. PG относится к моноспецифическому антителу, содержащему идентичные тяжелые и легкие цепи. PB относится к биспецифическому антителу с двумя разными тяжелыми цепями. Вариабельные области указанных тяжелых цепей различаются и, как правило, также различается область CH3, причем одна из тяжелых цепи содержит мутацию KK домена CH3, а другая содержит комплементарную мутацию DE домена CH3 (для справки см. PCT/NL2013/050294 (опубликована как WO2013/157954).

Пример 1. Гетерогенность заряда mAb 3055 и 3056.

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) применяли для определения pI и гетерогенности заряда PG3056, полноразмерного моноклонального IgG1-антитела, содержащего VH MF3056, спаренную с общей легкой цепью IGVK1-39/JK1, и PG3055, полноразмерного моноклонального IgG1-антитела, содержащего ту же VH, спаренную с 15C3 VL2 - легкой цепью IGKV1-13. С указанной целью Focusgel с диапазоном pI 6-11 (WebScientific, кат. № 1006-03) проводили через аппарат для электрофореза GE Healthcare Multiphor II, оснащенный охлаждающей пластиной, которую охлаждали до 10°C. 10 мкг необработанного образца загружали в пробозаборник за маркером диапазона высоких значений pI (GE Healthcare, кат. № 17047301V). Программа электрофореза состояла из трех фаз; начальное фокусирование в течение 10 минут при 500 В с последующим 90 минутным фокусированием при 1500 В и, наконец, фаза фокусирования при 2000 В в течение 10 минут. Затем гель фиксировали и окрашивали с применением коллоидного красителя кумасси (Pierce, кат. № 24590).

В результате ИЭФ-анализа PG3056 и PG3055 получали гель, показанный на фиг. 1. Для PG3055 главная полоса наблюдается при высоком pI (~ 9) с сателлитной полосой при несколько более высоком значении pI. PG3056 проявлял аналогичный паттерн ИЭФ, однако при слегка более высоких значениях pI и немного более размытой главной полосой.

Оба IgG анализировали с применением катионообменной ВЭЖХ-хроматографии (катионообменной ВЭЖХ) для анализа гетерогенности их заряда с применением ортогонального способа. Катионообменную ВЭЖХ проводили при температуре окружающей среды на системе для ВЭЖХ Dionex, оснащенной 7 мкм колонкой SP STAT и детектором излучения в ультрафиолетовой и видимой области спектра (UV/Vis). Вводили 10 мкг образца; для разделения вариантов антител с разным зарядом использовали градиент 25 mM фосфатного буфера pH 6,0 с возрастающей концентрацией NaCl. Данные анализировали с применением программного обеспечения Chromeleon.

Хроматограммы катионообменной ВЭЖХ для PG3055 и PG3056 показаны на фиг. 2. PG3055 демонстрирует главный пик на 18,8 минутах, фланкированный небольшими пиками, соответствующими кислотным и основным изоформам IgG. Неожиданным образом, хроматограмма PG3056 содержит несколько пиков, соответствующих значительному интервалу времени; два широких главных пика видимы на 18,4 и 20,4 минутах. Указанные хроматограммы отражают значимо увеличенную гетерогенность заряда антитела против CD3 с общей легкой цепью IGVK1-39/JK1 (PG3056) по сравнению с IgG, содержащим 15C3 VL2 -легкую цепь IGKV1-13 (PG3055).

Катионообменную ВЭЖХ также использовали для оценки вариабельности показателей между партиями и стабильности антител против CD3. Оба антитела анализировали после хранения при 2-8°C на протяжении более чем 3 месяцев и после долгосрочного хранения при -80°C. Наложение образцов PG3055 (фиг. 3, слева) показывает, что между указанными образцами наблюдается незначительная разница; относительные площади второстепенных пиков на 17,1 минутах и 19,8 минутах слегка изменяются при хранении при 2-8°C в течение длительного периода времени. Различия, наблюдаемые между образцами PG3056 (фиг. 3, справа), являются значительно более существенными. Пик на 20,4 минутах значительно уменьшается при хранении при 2-8°C, тогда как пик на 18,4 минутах увеличивается до такой степени, что становится главным пиком для указанного образца. Другие рано элюирующие пики, соответствующие другим кислотным изоформам IgG, также демонстрируют относительное увеличение площади пиков, например, пика на 16,4 минутах. Наблюдаемые изменения хроматограмм при катионообменной ВЭЖХ после долгосрочного хранения при 2-8°C показывают, что антитело против CD3, содержащее общую легкую цепь IGVK1-39/JK1, нестабильно при хранении в указанных условиях, тогда как антитело PG3055, содержащее 15C3 VL2 - легкую цепь IGKV1-13, значительно более стабильно.

Пример 2. Влияние вариации показателей между партиями антитела PG3056 на связывание антиге-

на.

Для оценки стабильности антител против CD3 в присутствии сыворотки антитела PG3055 и PG3056 разводили до концентрации 10 мкг/мл в IMDM (Invitrogen, кат. № 21980-065) с добавлением 10% ФБС (РАА, кат. № A15-101), а затем инкубировали при 37°C в течение семи дней. В указанный анализ включали изотипическое контрольное IgG (PG1207). Через семь дней связывание указанных IgG с CD3 на происходящих от здоровых доноров очищенных методом разделения на магнитных микроносителях (MACS) Т-клетках оценивали с помощью проточно-цитометрического анализа. Для сравнения в проточно-цитометрический анализ включали PG3055 и PG30566, которые хранили в одинаковой среде в течение семи дней при 2-8°C. Связывание CD3 всеми антителами тестировали в концентрациях 10, 1, 0,1 и 0,01 мкг/мл, используя разведения в IMDM+10% ФБС. Связанные антитела визуализировали с применением антитела козы против Fc человека (Southern Biotech, 2043-02) в соответствии с процедурой FACS согласно приведенному ранее в WO2014/051433 описанию, за исключением того, что окрашивание выполняли IMDM+10% ФБС. Эти данные показывают (фиг. 4), что PG3055 и PG3056 демонстрируют аналогичное связывание с Т-клетками при инкубации в условиях температуры 2-8°C в присутствии сыворотки. При том, что на связывание PG3055 не влияла 7-дневная инкубация при 37°C в IMDM+10% ФБС (PG3055 или PG3055 37°C), связывание PG3056 с CD3 на Т-клетках значительно снижалось (PG3056 или PG3056 37°C).

В заключение, PG3056, антитело против CD3, содержащее общую легкую цепь IGVK1-39/JK1, продемонстрировало сильное снижение связывания с CD3 после инкубации с сывороткой при 37°C в течение 7 дней. И напротив, антитело PG3055 полностью сохраняло способность к связыванию CD3 в тех же условиях.

Пример 3. В чем разница между антителами PG3055 и PG3056?

Антитела PG3055 и PG3056 имеют идентичные последовательности, за исключением вариабельной области легкой цепи. По-видимому, общая легкая цепь не очень хорошо работает в контексте других аминокислотных последовательностей указанного антитела и, в частности, с вариабельной областью тяжелой цепи, с которой находится в близком контакте. Самым очевидным способом для того, чтобы попытаться исправить указанный недостаток антитела 3056, была бы проверка того, может ли общая легкая цепь быть каким-либо образом изменена для достижения большего сходства с легкой цепью в антителе 3055. Кроме того, легкая цепь антитела PG3056 не была выбрана в качестве части сайта связывания антигена, которое связывает молекулу CD3. Для указанной цели была выбрана вариабельная область тяжелой цепи. Это является еще одной причиной для проверки того, возможно ли добиться большего сходства общей легкой цепи с легкой цепью в исходном антителе PG3055.

Для выяснения того, отличаются ли вариабельные области PG3055 и PG3056 в результате разных легких цепей были созданы модели их областей Fab. Модель гомологии областей Fab PG3056 и PG3055 строили с применением MODELLER (Sali et al, 1993: J. Mol. Biol. 234, 779-815). Из полученной совокупности структур выбирали модельную структуру с оптимальными энергетическими показателями. Алгоритмы оптимизации боковых цепей и минимизации энергии использовали для замены шаблонных боковых цепей в случае отличия от целевой последовательности. Модели гомологии Fab 3055 и 3056 визуальным образом исследовали с применением Yasara (<http://www.yasara.org>). Наложение моделей для PG3055 и PG3056 (фиг. 5, правое изображение) показывает, что различия последовательностей легкой цепи вызывают только незначительные структурные изменения; для двух IgG ориентация некоторых частей легкой цепи относительно тяжелой цепи до некоторой степени изменяется. Измененным частям может быть присуща меньшая стабильность, и это может быть основной причиной наблюдаемых различий в стабильности. Как вариант, измененные части могут быть более или менее подвержены другим индуцирующим гетерогенность процессам. Различные процессы, известные и неизвестные, могут быть причиной наблюдаемых признаков антитела PG3056. Ферментативные и неферментативные модификации включают образование дисульфидных связей, гликозилирование, циклизацию N-концевых глутаминов, процессинг C-концевых лизинов, деамидирование, окисление, гликирование и расщепление пептидных связей, относящиеся к процессам, которые могут вызывать гетерогенность (Liu et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 97, 2426-2447 (2008)). В зависимости от типа модификации, гетерогенность моноклональных антител может быть внесена внутриклеточными процессами, внеклеточными процессами, например, происходящими в сыворотке, асците и/или клеточной культуральной среде. Гетерогенность может также быть внесена путем инкубации с буферами, во время процесса очищения, при хранении, в других стрессовых условиях, таких как повышенная температура или воздействие интенсивного света.

Моделирование не определяло точное положение конкретной аминокислоты или области для направленного введения мутаций в вариабельной области PG3056. Наблюдаемые различия моделей гомологии PG3055 и PG3056 были незначительными.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что нет необходимости изменять последовательность аминокислот легкой цепи антитела PG3056. Внедрение тяжелой цепи может обеспечивать получение антитела с хорошими связывающими свойствами, хорошей стабильностью и хорошей однородностью даже при наличии тяжелой цепи в вариабельной области с общей легкой цепью. Как будет более подробно описано на примерах ниже в настоящем документе, неожиданно было обнаружено, что специфиче-

ские изменения в области CDR2 тяжелой цепи допустимы в отношении связывания и обеспечивают получение антитела с требуемыми стабильностью и однородностью.

Указанные изменения приводят к изменению NG-мотива дезаминирования в области CDR2 тяжелой цепи. Область HCDR2 как PG3055, так и PG3056 содержит остатки Asn54 и Gly55. Указанные остатки экспонированы на поверхности в обоих антителах, как показано на фиг. 5. Структурное положение и экспонирование на поверхности очень сходны в обеих молекулах, с незначительными отличиями ориентации боковой цепи аспарагина. Учитывая, что указанный мотив экспонирован на поверхности в обоих антителах и, соответственно, легкодоступен для окружения, и что значимые различия в укладке HCDR2 NG-мотива в PG3055 и в P3056 отсутствуют, можно считать маловероятным, что усиленное деамидирование Asn54 в PG3056 является основной причиной наблюдаемых вариаций в связывании разных партий PG3056.

Пример 4. Получение и характеристика вариантов PG3056.

Анализ характеристик PG3056 с применением CIEХ-HPLC показал, что указанный IgG является высокогетерогенным. Поскольку указанная гетерогенность может препятствовать очищению биспецифического CD3хCLEC12A IgG, основанному на CIEХ-HPLC, авторы изобретения попытались улучшить CIEХ-HPLC-профиль MF3056 Fab. Указанная вариабельная область тяжелой цепи MF3056 содержит несколько остатков и/или мотивов, которые могут вносить вклад в гетерогенность PG3056. Это С-концевой остаток лизина, NG-мотив деамидирования аспарагина в HCDR2 и кислотно-лабильный DP-мотив в HCDR3 (см. на фиг. 6 выравнивание последовательностей MF3056VH и VH 3-33 зародышевой линии).

Хотя моделирование *in silico* не указывало в какой-либо степени на NG-мотив HCDR2 как на вероятную причину наблюдаемой гетерогенности, была предпринята попытка идентифицировать варианты VH MF3056, в которых отсутствует указанный мотив посттрансляционной модификации, и одновременно способные проявлять улучшенный профиль удерживания при CIEХ-FIPLC, а также улучшенную стабильность. Для этого получали и тестировали следующие варианты VH MF3056: MF3872, MF3873 и MF3905 (фиг. 7).

Указанные Fab, содержащие указанные варианты VH и общую легкую цепь (MF3872, MF3873 и MF3905), экспрессировали в виде полноразмерного моноклонального IgG (PG3872, PG3873 и PG3905) и тестировали на связывание с экспрессируемым на мембране CD3 на клетках FIPB-ALL с помощью проточной цитометрии (в соответствии с процедурой FACS согласно приведенному ранее описанию в WO2014/051433). Получали следующие результаты (фиг. 8).

Эти результаты показывают, что варианты PG3873 и PG3905 полностью утрачивали способность к связыванию CD3, тогда как у варианта PG3872 сохранялось очень незначительное связывание с CD3.

В качестве альтернативного подхода для получения усовершенствованных вариантов со сниженной гетерогенностью и сниженной иммуногенностью, VH MF3056 модифицировали на уровне генов зародышевой линии в направлении сходства с последовательностью VH3-33 по нескольким остаткам путем осуществления индивидуальных замен аминокислот или их комбинаций. Получали следующие варианты MF3056_VH: MF3874_VH, MF3878_VH, MF3883_VH, MF3886_VH и MF3891_VH (фиг. 9).

В свою очередь, Fab, содержащие указанные варианты VH и общую легкую цепь (MF3874_VH, MF3878_VH, MF3883_VH, MF3886_VH и MF3891_VH), экспрессировали в виде полноразмерного моноклонального IgG (PG3874, PG3878, PG3883, PG3886 и PG3891) и тестировали на связывание CD3 согласно описанию выше. Получали следующие результаты (фиг. 10).

Как показано на фиг. 10, все модифицированные на уровне генов зародышевой линии индивидуальные (PG3874 (Q6E), PG3878(V23A), PG3883 (A50V), PG3886 (T97A)) и комбинированные (PG3891 (Q6E/V23A/T97A)) варианты сохраняли полный потенциал связывания CD3. Затем анализировали PG3891 с применением CIEХ-HPLC (согласно описанию в примере 1) для оценки того, приводила ли модификация на уровне генов зародышевой линии к снижению гетерогенности.

Как показано на фиг. 11, CIEХ-HPLC-профиль PG3891, тем не менее, указывает на значимую гетерогенность заряда. Аналогичные CIEХ-HPLC-профили получали для индивидуальных модифицированных на уровне генов зародышевой линии вариантов (данные не показаны).

При следующей попытке снизить гетерогенность заряда PG3056 получали варианты MF3056_VH без NG-мотива HCDR2 (фиг. 12).

Получали Fab, содержащие указанные варианты VH и общую легкую цепь (MF5192-5197_VH), и экспрессировали в виде полноразмерного моноклонального IgG (нумерация PG) и тестировали на связывание с экспрессируемым на мембране CD3 на клетках HPB-ALL с помощью проточной цитометрии согласно описанию выше. Указанный анализ (фиг. 13) показал, что PG5196 (замена N54G55 на N54A55) сохранял способность к связыванию CD3, сопоставимую с PG3056, тогда как все другие протестированные варианты MF3056 продемонстрировали значимое снижение (PG5192, PG5193 или PG5197) или отсутствие связывания CD3 (PG5194 и PG5195).

Для оценки гетерогенности заряда PG5196 mAb проводили изоэлектрическое фокусирование согласно описанию в примере 1. После окрашивания геля для PG5196 наблюдается узкая полоса при высоком pI с второстепенной сателлитной полосой при несколько более высоком значении pI (см. фиг. 14).

Для более подробной оценки гетерогенности заряда PG5196 проводили CIEХ-HPLC в соответствии

с процедурой, описанной в примере 1; итоговая хроматограмма приведена на фиг. 15. На указанной хроматограмме виден основной пик со временем удерживания, составляющим 19 минут, которому предшествует небольшой пик на 16,9 минутах.

Неожиданным образом, эти данные демонстрируют, что PG5196 проявляет значимо улучшенный профиль гетерогенность заряда по сравнению с PG3056.

Пример 5. Получение дополнительных вариантов PG5196 с использованием вариантов, отобранных с применением фагового дисплея.

На основе VH MF5196 разрабатывали библиотеки фагового дисплея с целью получения дополнительных связывающих CD3 Fab с аналогичным образом сниженной гетерогенностью заряда. Получали библиотеки фагового дисплея, содержащие реаранжированную область VL IGKV1-39/IGKJ1 человека (De Kruif et al. *Biotechnol Bioeng.* 2010 (106)741-50), и коллекцию областей VH на основе MF5196, содержащих замены аминокислот, потенциально способных улучшать границу взаимодействия VH/VL. Специфические замены и допустимые альтернативные аминокислоты в каждом положении перечислены в табл. 1. В каждое мутированное положение все указанные замены, а также оригинальная аминокислота вводили в равном соотношении.

Таблица 1

| Аминокислота и положение в MF5196_VH | Область | Замены, введенные в каждое положение |
|--------------------------------------|---------|--------------------------------------|
| H35 | FR2 | FYASN |
| A50 | FR2 | ILFYNRQSK |
| N54 | HCDR2 | H |
| A55 | HCDR2 | GTN |
| D59 | HCDR2 | LIVFYRANEHST |
| A61 | FR3 | FNIHQLRYE STDKV |
| Y102 | HCDR3 | ARNDCEQGHILKMFPSTWV |
| N103 | HCDR3 | ARDCEQGHILKMFPSTWYV |
| W104 | HCDR3 | MFYHLIV |
| F105 | HCDR3 | WMYHLIV |

Бактериофаги из указанных библиотек фагового дисплея выбирали в ходе одного или двух раундов с применением клеток НРВ-ALL и/или рекомбинантного белка CD3 $\delta\epsilon$ -Fc человека с применением процедур, известных специалисту в данной области техники. Связывающие фаги химически элюировали и использовали для повторного инфицирования бактерий. Путем отбора ряда выживших бактериальных колоний выделяли фаги и проводили их скрининг на связывание с экспрессируемыми на поверхности клетки комплексами CD3/TCR с помощью проточной цитометрии. Для амплификации и секвенирования областей VH проводили ПЦР колоний для всех фагов, продемонстрировавших связывание CD3.

Анализ генов VH показал, какие варианты с заменами сохраняли способность к связыванию CD3. Выбранные варианты MF5196_VH содержали следующие замены: A50 в QSYL, D59 в LIVFRANEHST, A61 в NIHQLRYESTDKV и/или F105 в MY (табл. 2). И напротив, перечисленные в табл. 1 замены в положениях H35, Y102, N103 и W104 не допускались, поскольку во всех выбранных связывающих CD3 вариантах в положениях 35, 102, 103 и 104 была сохранена оригинальная аминокислота. Это показывает, что остатки H35, Y102, N103, и W104 остатки представляют собой аминокислоты, критические важные для связывания CD3.

Примеры связывающих CD3 вариантов MF5196_VH представлены MF5603_VH, MF5616_VH, MF5626_VH, MF5630_VH, MF5648_VH, MF5661_VH и MF5694_VH, все варианты скомбинированы с реаранжированной областью VL IGKV1-39/IGKJ1 человека. Последовательности VH указанных MF перечислены на фиг. 25. Тестирование связывания указанных вариантов MF в формате моносpezifического IgG с экспрессируемым на мембране CD3 на клетках НРВ-ALL с помощью проточной цитометрии согласно описанию выше показало, что все указанные примеры связывались с CD3 (фиг. 26). Для демонстрации примера присущей им стабильности анализировали PG5661 путем проведения CIEХ-НPLC в соответствии с процедурой, описанной в примере 1; итоговая хроматограмма приведена на фиг. 27. На указанной хроматограмме виден основной пик со временем удерживания, составляющим ~20 минут, аналогично профилю, показанному для PG5196.

Таблица 2

| Аминокислота и ее положение в MF5196_VH | Замены, введенные в MF5196 | Обнаруженные связывающие CD3 варианты MF5196 с заменами |
|---|----------------------------|---|
| A50 | ILFYNRQSK | QSYL |
| D59 | LIVFYRANEHST | LIVFRANEHST |
| A61 | FNIHQLRYESTDKV | NIHQLRYESTDKV |
| F105 | WMYHLIV | MY |

Пример 5В.

На основе VH MF5196 разрабатывали библиотеки фагового дисплея с целью получения дополнительных стабильных связывающих CD3 Fab. Получали библиотеки фагового дисплея, содержащие реаранжированную область VL IGKV1-39/IGKJ1 человека (De Kruif et al. Biotechnol Bioeng. 2010 (106)741-50), и коллекцию вариантов VH3-33, с которыми сливали область CDR3 тяжелой цепи MF5196.

Бактериофаги из указанных библиотек фагового дисплея выбирали в ходе одного или двух раундов с применением клеток НРВ-ALL и/или рекомбинантного белка CD3 $\delta\epsilon$ -Fc человека с применением процедур, известных специалисту в данной области техники. Связывающие фаги химически элюировали и использовали для повторного инфицирования бактерий. Путем отбора ряда выживших бактериальных колоний, выделяли фаги и проводили их скрининг на связывание с экспрессируемыми на поверхности клетки комплексами CD3/TCR с помощью проточной цитометрии. Для амплификации и секвенирования областей VH проводили ПЦР колоний для всех фагов, продемонстрировавших связывание CD3.

Примеры итоговых дополнительных связывающих CD3 вариантов MF5196_VH представлены MF5351_VH, MF5354_VH и MF5356_VH (перечислены на фиг. 28), все варианты скомбинированы с реаранжированной областью VL IGKV1-39/IGKJ1 человека.

Тестирование связывания указанных вариантов MF в формате моноспецифического IgG с экспрессируемым на мембране CD3 на клетках НРВ-ALL с помощью проточной цитометрии согласно описанию выше показало, что все указанные примеры связывались с CD3 (фиг. 29).

Пример 6. Определение функциональных характеристик Fab MF5196 в формате биспецифического IgG к CD3xCLEC12A.

Для изучения функциональной активности Fab MF5196, указанный CD3 Fab и MF3056 CD3 Fab экспрессировали совместно с CLEC12A Fab MF4327 в виде фиксированного плеча. Указанные биспецифические IgG к CD3xCLEC12A экспрессировали в формате полноразмерного биспецифического IgG согласно описанию в WO2014/051433, в том числе конструировали нижний шарнир/CH2 в положениях 235-236 (называемый DM-Fc, двойная мутация CH2 в Fc-области). Как и в MF3056 и MF5196, в MF4327 Fab используется легкая цепь IGKV1-39/IGKJ1 человека. Последовательность MF4327 Fab приведена в заявке на патент WO2014/051433. Сначала демонстрировали связывание 5196x4327 DM-Fc bsAb с CD3 и CLEC12A с помощью проточной цитометрии с применением CD3+ клеток НРВ-ALL и CLEC12A+ клеток HL-60 (в соответствии с процедурами согласно приведенному ранее в WO2014/051433 описанию). 3056x4327 DM-Fc bsAb включали в качестве референсного антитела, а нерелевантный изотипический контрольный IgG1, PG1337, включали в качестве контроля (фиг. 16). Оба CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb связывали экспрессируемый на мембране CD3 и НРВ-ALL, при этом 5196x4327 DM-Fc bsAb обеспечивало несколько лучшее связывание.

Затем тестировали функциональную активность 5196x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb. Сначала исследовали стимулирующий потенциал в отношении Т-клеток на покоящихся Т-клетках здоровых доноров. Очищенные покоящиеся Т-клетки получали в соответствии с процедурой, описанной в патенте WO2014/051433. Очищенные покоящиеся Т-клетки затем инкубировали с клетками происходящей из лейкозных клеток линии HL-60 в 10% сыворотке человека (HS) при отношении эффекторных: целевых клеток, составляющем 5:1 в течение двух дней согласно описанию в WO2014/051433. 3056x4327 DM-Fc bsAb включали в качестве референсного антитела. В качестве негативного контроля включали эталонные IgG как изотипический контрольный IgG (контрольный IgG) и 5196x1337 DM-Fc bsAb. 5196x1337 DM-Fc bsAb связывает CD3 посредством одного плеча (MF5196) и столбчатый токсин (TT) посредством второго плеча (MF1337), и включено для изучения потенциальной индукции нецелевой активности MF5196. Указанное bsAb и контрольные IgG тестировали в концентрации 1000 нг/мл. Данные активации Т-клеток выражают через процент положительных по CD69 клеток в популяции положительных по CD4 или положительных по CD8 Т-клеток (фиг. 17). 5196x4327 DM-Fc bsAb индуцировало активацию CD4 и CD8 Т-клеток, что отражает положительная регуляция раннего маркера активации CD69. Также 3056x4327 DM-Fc bsAb индуцировало положительную регуляцию CD69 на CD4 и CD8 Т-клетках, однако в меньшей степени, чем 5196x4327 DM-Fc bsAb. Наблюдаемая положительная регуляция CD69 на Т-клетках обеих подгрупп была специфической в отношении антигена CLEC12A, поскольку 5196x1337 DM-Fc bsAb не индуцировало положительную регуляцию CD69.

Указанный анализ показал, что 5196x4327 DM-Fc bsAb обладает потенциалом индукции антиген-специфической активации CD4- и CD8-Т-клеток, незначительно превышающим потенциал 3056x4327

DM-Fc bsAb (фиг. 17). Индуцированная 5196x4327 DM-Fc bsAb активация Т-клеток была CLEC12A-специфической, поскольку контрольное 5196x1337 DM-Fc bsAb не индуцировало активацию Т-клеток. В совокупности эти данные указывают на полное сохранение CLEC12A-специфической активации Т-клеток HCDR2 при замене аминокислоты N→A, приводящей к образованию связывающего CD3 Fab MF5196.

Для исследования достаточности степени активации Т-клеток 5196x4327 или 3056x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb для индуцирования лизиса целевых клеток, клетки HL-60 метили сложным карбоксифлуоресцеин-диацетатсукцинимидиловым эфиром (CFSE) и культивировали совместно с Т-клетками от здорового донора при отношении эффекторных:целевых клеток, составляющем 5:1, в присутствии 10% HS. 5196x1337 CD3xTT.

DM-Fc bsAb включали для изучения потенциального нецелевого лизиса. Биспецифические IgG тестировали с применением 4-кратных разведений в диапазоне от 1000 нг/мл. Через два дня выжившие положительные по CFSE клетки HL-60 количественно определяли с помощью проточной цитометрии. Результаты выражали в виде процента специфического лизиса относительно ФСБ-контроля (фиг. 18).

Указанный анализ показал, что 5196x4327 DM-Fc bsAb полностью сохраняло потенциал индукции специфического в отношении антигена CLEC12A лизиса целевых клеток. Неожиданным образом, удельная активность 5196x4327 DM-Fc была значимо выше, чем у 3056x4327 DM-Fc bsAb.

В заключение, указанный пример показал, что Fab MF5196 функционален, поскольку 5196x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb эффективно индуцировало специфическую в отношении антигена CLEC12A активацию Т-клеток и лизис CLEC12A+ клеток HL-60. Кроме того, указанный пример показал, что 5196x4327 DM-Fc bsAb отличается повышенной удельной активностью по сравнению с 3056x4327 DM-Fc bsAb.

Пример 7. Аффинность направленных против CD3 и против CLEC12A плеч 5196x4327 DM-Fc bsAb.

Аффинность MF5196 CD3 и MF4327 CLEC12A Fab в отношении их мишеней измеряли с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с применением BIACore T100. Моноклональное антитело мыши против IgG человека (Becton and Dickinson, кат. № 555784) конъюгировали с поверхностью сенсорного чипа CM5 с применением химии свободных аминов (NHS/ЭДК). Затем 5196x4327 DM-Fc bsAb захватывали на поверхности указанного сенсора. Затем рекомбинантные очищенные антигены CLEC12A человека (Sino Biological Inc, кат. № 11896-H07H) и белок CD3δε-Fc человека пропускали по поверхности сенсора в диапазоне концентраций для измерения скоростей связывания и диссоциации. После каждого цикла поверхность сенсора регенерировали импульсным воздействием HCl и повторно захватывали 5196x4327 DM-Fc bsAb. На основании полученных сенсограмм с применением программного обеспечения BIAevaluation определяли скорости связывания и диссоциации.

Эти данные (фиг. 19) показали, что антитело 5196x4327 DM-Fc bsAb имело аффинность 3 нМ в отношении CLEC12A человека и аффинность 177 нМ в отношении CD3. Это показало, что аффинность плеча CLEC12A была приблизительно в 60 раз выше аффинности связывающего CD3 человека плеча 5196x4327 DM-Fc bsAb.

Таблица 3

Скорости связывания и диссоциации и значения аффинности для связывания с CD3 человека и CLEC12A человека. Указанное значение представляет собой среднее значение для трех измерений. KD: константа аффинности (равновесной диссоциации)

| Антиген | KD (M) |
|----------|----------------------|
| CLEC12A | 3×10^{-9} |
| CD3δε-Fc | 177×10^{-9} |

Пример 8. Эффективность индуцирования лизиса бластов ОМЛ антителом 5196x4327 DM-Fc bsAb в первичных образцах от ОМЛ-пациентов.

На примере 6 было показано, что 5196x4327 DM-Fc bsAb действительно индуцирует лизис целевых клеток HL-60 происходящими от здоровых доноров Т-клетками. В патенте WO2014/051433 авторы настоящего изобретения описали способность CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb индуцировать лизис ОМЛ-бластов аутологичными происходящими от ОМЛ-пациентов Т-клетками при отношении эффекторных клеток к целевым, составляющем 5:1. В данном случае была исследована эффективность индуцирования лизиса ОМЛ-бластов антителом CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb, более конкретно, 5196x4327 CD3xCLEC12A DM-Fc bsAb, в первичных образцах ОМЛ с низким отношением эффекторов к мишеням, Т-клеток ОМЛ-бластам.

Образцы от ОМЛ-пациентов, взятые при диагностике (ОМЛ M1, M2, M4, M4/M5 по FAB-классификации, табл. 4), размораживали и характеризовали в отношении фракций Т-клеток и ОМЛ-бластов путем проточно-цитометрического анализа на CD4, CD8, CD14, CD33, CD34, CD45 и 7AAD. В проанализированных образцах ОМЛ отношение эффекторных клеток к целевым находилось в диапазоне от 1:7 до 1:40.

Затем культивировали первичные образцы костного мозга ОМЛ-пациентов в среде IMDM с добавлением 10% нормальной HS плюс 20 нг/мл ИЛ-15 (Miltenyi, №130-095-766), 2,5 нг/мл GM-CSF (Immunotools, №11343125), 12,5 нг/мл Г-КСФ (согласно описанию в источнике: Norde et al., 2009), 6,25 нг/мл ИЛ-3 (Immunotools, №11340035), 3,0 нг/мл SCF (Immunotools, №11343325) и 2,5 нг/мл Flt3L (Immunotools, №311340035). Протестированные условия включали ФСБ, изотипическое контрольное антитело WT-Fc, 5196x4327 DM-Fc bsAb, 5196x1337 DM-Fc bsAb и положительное контрольное антитело CD3 WT-Fc Ab (все антитела в концентрации 1000 нг/мл). Через семь дней культивирования размножение Т-клеток и ОМЛ киллинг бластов определяли путем проточно-цитометрического анализа с применением тех же маркеров, что и на 0 день. Результаты выражали в виде кратности размножения Т-клеток или частоты лизиса бластов ОМЛ относительно условий с ФСБ.

Указанные данные продемонстрировали (табл. 4 и фиг. 20), что антитело 5196x4327 DM-Fc bsAb эффективно индуцировало размножение Т-клеток (5-30-кратное размножение Т-клеток) через 7 дней. Что еще более важно, указанные данные показали, что антитело 5196x4327 DM-Fc bsAb эффективно индуцировало лизис (26-88%) опухолевых клеток ОМЛ пациента в 5/5 протестированных первичных образцов от ОМЛ-пациентов, даже в ОМЛ образцах с очень низкими отношениями эффекторных клеток к целевым.

Таблица 4

| № Пациента | Соотношение E:T на день 0 | FAB-классификация ОМЛ | % Киллинга бластов (через 7 дней) | Кратности размножения Т-клеток (через 7 дней) |
|------------|---------------------------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| №1 | 1:21 | M4/M5 | 26% | 30 |
| №2 | 1:10 | M4 | 44% | 8 |
| №3 | 1:7 | M2 | 88% | 4 |
| №4 | 1:39 | M4/M5 | 65% | 6 |
| №5 | 1:40 | M1 | 83% | 6 |

Эффективность 5196x4327 DM-Fc bsAb в отношении индуцирования пролиферации Т-клеток и лизиса бластов ОМЛ анализировали в дополнительных образцах от ОМЛ-пациентов, взятых при диагностике.

Образцы от ОМЛ-пациентов, взятые при диагностике (по FAB-классификации ОМЛ M1, M2, M4, M4/M5, табл. 5) размораживали и характеризовали в отношении фракций Т-клеток и ОМЛ-бластов путем проточно-цитометрического анализа на CD4, CD8, CD14, CD33, CD34, CD45 и 7AAD. Проанализированные образцы ОМЛ отличались отношением эффекторных клеток к целевым в диапазоне от 1:3-1:97. Затем культивировали первичные образцы от ОМЛ-пациентов согласно описанию выше в примере 8. Протестированные условия включали ФСБ, изотипическое контрольное антитело WT-Fc, 5196x4327 DM-Fc bsAb, 5196x1337 DM-Fc bsAb и положительное контрольное антитело CD3 WT-Fc Ab (все антитела в концентрации 200 нг/мл). Через семь и десять дней культивирования определяли размножение Т-клеток и киллинг ОМЛ-бластов путем проточно-цитометрического анализа с применением тех же маркеров, что и на 0 день. Результаты выражали в виде кратности размножения Т-клеток или частоты лизиса бластов ОМЛ относительно условий с ФСБ.

Указанные данные продемонстрировали (табл. 5), что 5196x4327 DM-Fc bsAb эффективно индуцировало размножение Т-клеток (7-226-кратное размножение Т-клеток) через 10 дней. Что еще более важно, указанные данные показали, что 5196x4327 DM-Fc bsAb эффективно индуцировало лизис (38-99%) опухолевых клеток ОМЛ пациента в 6/8 протестированных первичных образцов от ОМЛ-пациентов, даже в образцах ОМЛ с очень низкими отношениями эффекторных клеток к целевым, составляющими 1:45-1:97.

Таблица 5

| № пациента | Соотношение Е:Т на день 0 | FAB-классификация ОМЛ | Классификация рисков ОМЛ | % Киллинга бластов (через 10 дней) | Кратности размножения Т-клеток (через 10 дней) |
|------------|---------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------------|--|
| №6 | 1:45 | M1 | Хороший уровень | 95% | 20 |
| №7 | 1:3 | M2 | Хороший уровень | 99% | 39 |
| №8 | 1:17 | M2 | Неудовлетворительный уровень | 87% | 226 |
| №9 | 1:94 | M4 | Неудовлетворительный уровень | 0% | 7 |
| №10 | 1:46 | M4/M5 | Неудовлетворительный уровень | 38% | 23 |
| №11 | 1:97 | M4/M5 | Неудовлетворительный уровень | 39% | 55 |
| №12 | 1:31 | M4/M5 | Промежуточный уровень | 0% | 9 |
| №13 | 1:15 | M4/M5 | Промежуточный уровень | 67% | 130 |

Пример 9.

Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) применяли для измерения термической стабильности доменов описанных в настоящем документе IgG. DSC-эксперименты выполняли на Micro-Cal VP-DSC с применением программного обеспечения Origin v7.0 (VPViewer и VPAnalyzer). Сначала проводили диализ антител в буфере, содержащем 10 mM фосфат, 150 mM NaCl, при pH 6,5. Образцы IgG анализировали при концентрации белка, составляющей 0,25 мг/мл по оценке с применением поглощения УФ, буфер для диализа применяли в качестве референсного образца. Сканирование проводили в диапазоне 50°C - 95°C с частотой сканирования 1°C/мин и анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism 5 и Microsoft Excel 2010.

DSC-анализ IgG1 дикого типа (WT) давал два пика, как показано на фиг. 21 (обозначены как WT/WT для CH2/CH3). Tm1, составляющая 70,9°C, соответствует плавлению CH2-домена, а пик при 85,0°C (Tm2) отражает плавление Fab и CH3-домена. На DSC-графике для IgG1 с идентичными Fab, содержащими две мутации (L235G, G236R) в CH2-доме (DM/WT) виден очень сходный с Tm2 пик при 85,0°C. Пик Tm1, однако, сдвигается к 73,5°C, что указывает на значимое увеличение стабильности CH2-домена за счет указанных мутаций. Поскольку CH2-домен представляет собой самый неустойчивый домен не только IgG1 WT, но и биспецифического IgG1 со сконструированным CH3, можно сделать вывод, что сконструированный CH2 домен с мутациями L235G, G236R также придает дополнительную стабильность биспецифическим IgG-антителам к CD3xCLEC12A, несущим указанные мутации CH2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое связывает CD3 человека, которое содержит комбинацию тяжелая/легкая (H/L) цепь, содержащую тяжелую цепь и легкую цепь, при этом указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот, выбранную из

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYHGRKQDYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYHARKQDYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQDYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNTRKQDYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYID
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYN
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQDYA
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWYDPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYL
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;
QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYS
DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS;

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYS
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAMIWYDGNKNTYYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIYYDGSRTYYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIWHDGRKTTY AD-
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS

с 0-10 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях вне областей CDR, и при этом указанная легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи IgVκ1-39/Jκ1 или IgVκ1-39/Jκ5 с 0-10 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях вне областей CDR.

2. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот, выбранную из

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYHGRKQD
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYHARKQD
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQD
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNTRKQD
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQE
 YIDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQE
 YNDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQE
 YRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQD
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWYDPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQE
 YLDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQE
 YSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQE
 YSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAMIWYDGNKNTY
 YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIYYDGSRTYY AD-
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS;
 QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIWHDGRKTTY AD-
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS

с 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях вне областей CDR, и/или указанная легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи IgVκ1-39/Jκ1 или IgVκ1-39/Jκ5 с 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией в одном или более положениях вне областей CDR.

3. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYHGRKQDYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS.

4. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYHARKQDYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS.

5. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQDYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS.

6. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит вариабельную область, которая содержит последовательность аминокислот
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNTRKQDYADSV
 KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLTVSS.

7. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYIDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

8. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYNDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

9. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYRDSVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

10. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWYDPPWGQGLTLTVSS.

11. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYLDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

12. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYSDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

13. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYNARKQEYSDVSKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

14. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYDGNKNTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

15. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIYDGNKNTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

16. Антитело по п.1, характеризующееся тем, что указанная тяжелая цепь содержит переменную область, которая содержит последовательность аминокислот QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAIWIWHDGRKNTYYADSV KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPPWGQGLTLTVSS.

17. Антитело по любому из пп.1-16, характеризующееся тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит IgV_k1-39*01/IGJk1*01 или IgV_k1-39*01/IGJk5*01 легкой цепи каппа.

18. Антитело по п.17, характеризующееся тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит IgV_k1-39*01/IGJk1*01 или IgV_k1-39*01/IGJk5*01 легкой цепи каппа зародышевой линии.

19. Антитело по пп.1-16, характеризующееся тем, что указанная переменная область легкой цепи содержит последовательность аминокислот

DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKPKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PTFGQ GTKVE IK или DIQMT QSPSS LSASV GDRVITCRA SQSIS SYLNW YQQKPKAPK LLIYA ASSLQ SGVPS RFSGS GSGTD FTLTI SSLQP EDFAT YYCQQ SYSTP PITFG QGTRL EIK с 0-5 инсерциями, делециями, заменами, присоединениями аминокислот или их комбинацией, в одном или более положений вне областей CDR.

20. Биспецифическое антитело, содержащее комбинацию H/L цепь по любому из пп.1-19.

21. Биспецифическое антитело по п.20, дополнительно содержащее комбинацию H/L цепей, которая связывает опухолевый антиген.

22. Биспецифическое антитело по п.21, характеризующееся тем, что указанная комбинация H/L, которая связывает опухолевый антиген, связывает CLEC12A.

23. Антитело или биспецифическое антитело по любому из пп.1-22, которое представляет собой антитело человека или гуманизованное антитело.

24. Биспецифическое антитело по любому из пп.20-23, содержащее две разные тяжелые цепи иммуноглобулина с совместимыми доменами гетеродимеризации.

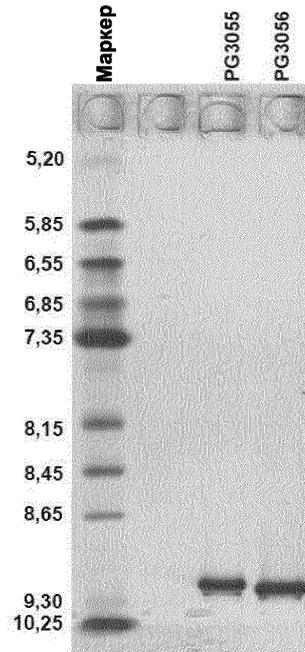
25. Биспецифическое антитело по п.24, характеризующееся тем, что указанные совместимые домены гетеродимеризации представляют собой совместимые домены гетеродимеризации СНЗ тяжелых цепей иммуноглобулина.

26. Биспецифическое антитело по любому из пп.20-25, характеризующееся тем, что указанное биспецифическое антитело представляет собой антитело IgG с мутантным CH2 и/или нижним шарнирным доменом, в результате чего снижено взаимодействие указанного биспецифического антитела IgG с рецептором Fc-гамма.

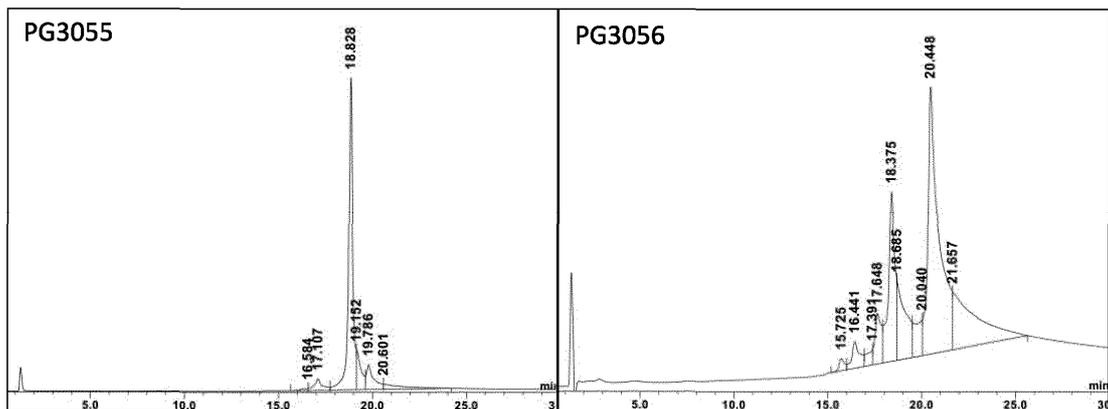
27. Биспецифическое антитело по п.26, характеризующееся тем, что указанный мутантный CH2 и/или нижний шарнирный домен содержат замену аминокислоты в положении 235 и/или 236, предпочтительно замену L235G и/или G236R.

28. Биспецифическое антитело по любому из пп.20-27, содержащее общую легкую цепь.

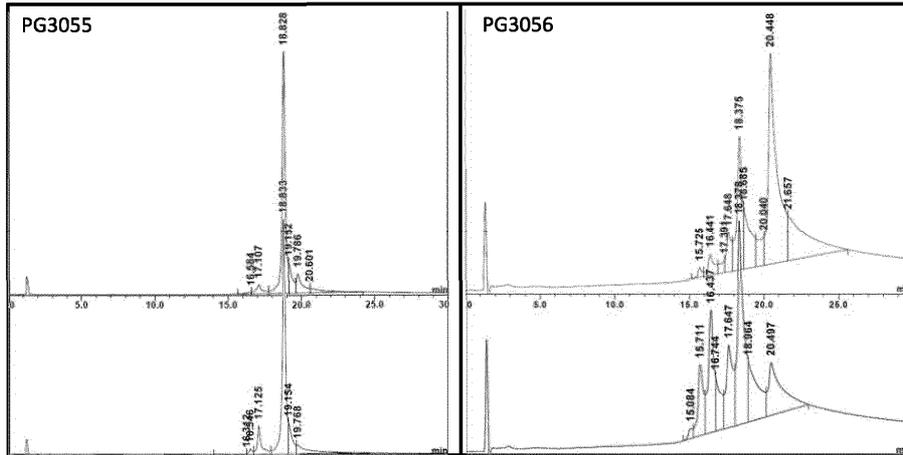
29. Применение антитела по любому из пп.1-19 или биспецифического антитела по любому из пп.20-28 в лечении нуждающегося в этом субъекта.



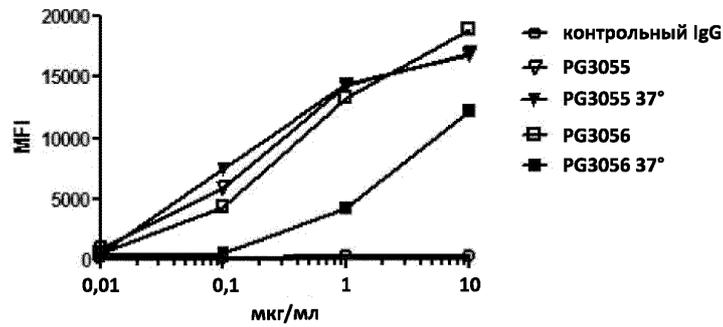
Фиг. 1



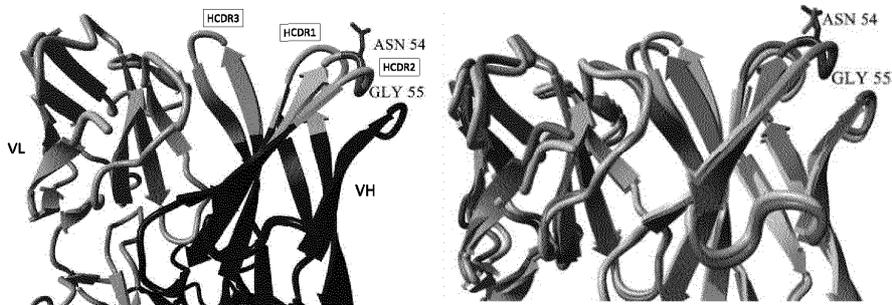
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

```

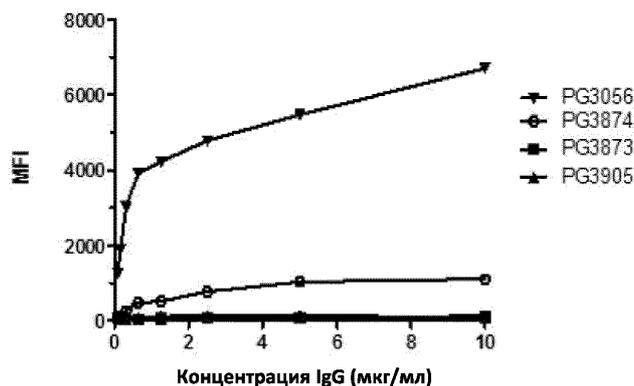
1                                     50
3-33_VH (1) QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV
MF3056_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSRLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
Консенсусная последовательность
(1) QVQLV SGGGVVQPGRSRLRLSC ASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVA
51                                     100
3-33_VH (51) IWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR--
MF3056_VH (51) IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
Консенсусная последовательность
(51) IWY G YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYC R
101                                     115
3-33_VH (99) -----
MF3056_VH (101) GYNWFDPWQGTLVT
Консенсусная последовательность
(101)

```

Фиг. 6

| | | |
|-----------|-------|--|
| | 1 | 50 |
| MF3056_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3872_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3873_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3905_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| | 51 | 100 |
| MF3056_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3872_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3873_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3905_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| | 101 | 118 |
| MF3056_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3872_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3873_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3905_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |

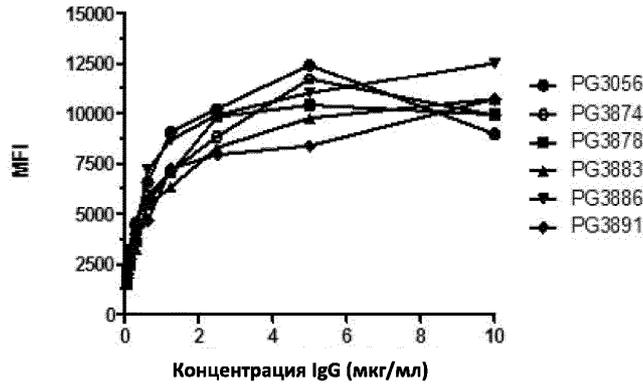
Фиг. 7



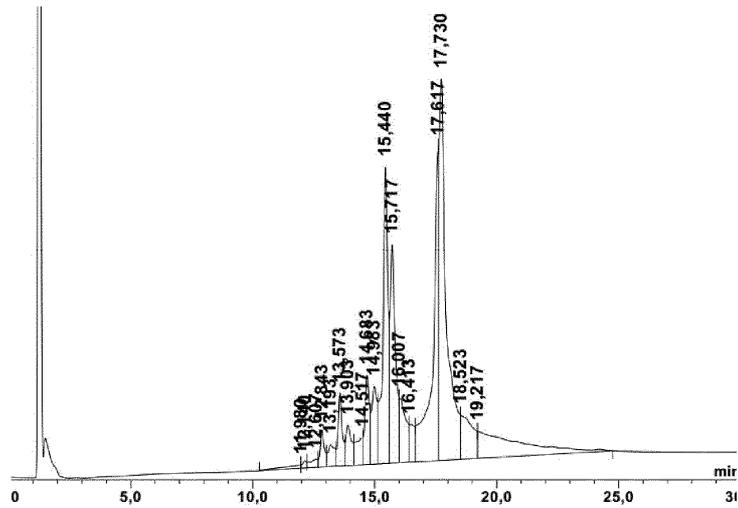
Фиг. 8

| | | |
|---------------------------------|-------|--|
| | 1 | 50 |
| MF3056_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3874_VH | (1) | QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3878_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3883_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV |
| MF3886_VH | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| MF3891_VH | (1) | QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| Консенсусная последовательность | (1) | QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA |
| | 51 | 100 |
| MF3056_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3874_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3878_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3883_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| MF3886_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGT |
| MF3891_VH | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARGT |
| Консенсусная последовательность | (51) | IWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT |
| | 101 | 118 |
| MF3056_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3874_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3878_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3883_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3886_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| MF3891_VH | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |
| Консенсусная последовательность | (101) | GYNW FDPWQQGTLVTVSS |

Фиг. 9



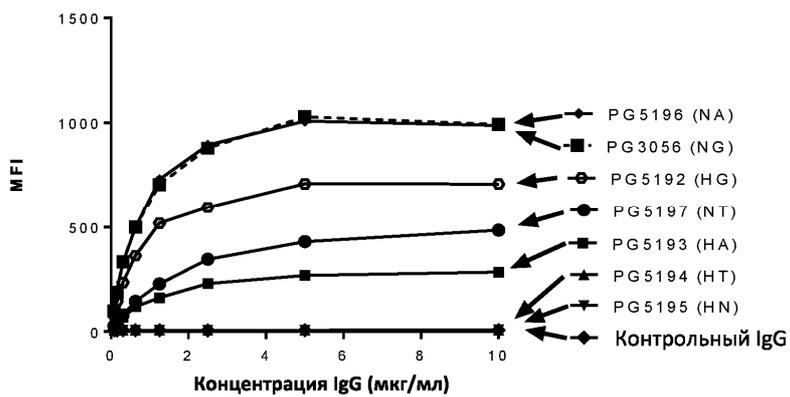
Фиг. 10



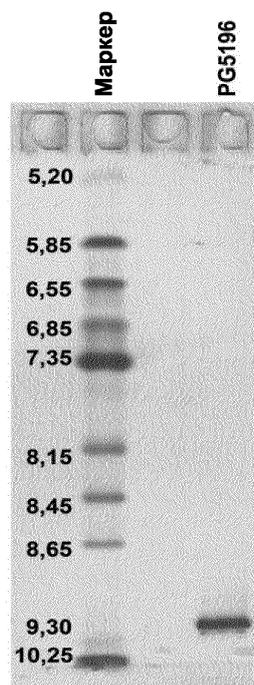
Фиг. 11

| | | |
|---------------------------------|--|-----|
| | 1 | 50 |
| MF3056_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| MF5192_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| MF5193_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| MF5194_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| MF5195_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| MF5196_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| MF5197_VH | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| Консенсусная последовательность | (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWRQAPGKGLEWVAA | |
| | 51 | 100 |
| MF3056_VH | (51) IWY NG RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| MF5192_VH | (51) IWY HG RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| MF5193_VH | (51) IWY HA RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| MF5194_VH | (51) IWY HT RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| MF5195_VH | (51) IWY HN RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| MF5196_VH | (51) IWY NA RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| MF5197_VH | (51) IWY NT RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| Консенсусная последовательность | (51) IWY HA RKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT | |
| | 101 | 118 |
| MF3056_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| MF5192_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| MF5193_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| MF5194_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| MF5195_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| MF5196_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| MF5197_VH | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |
| Консенсусная последовательность | (101) GYNWFD PWQGT LVT VSS | |

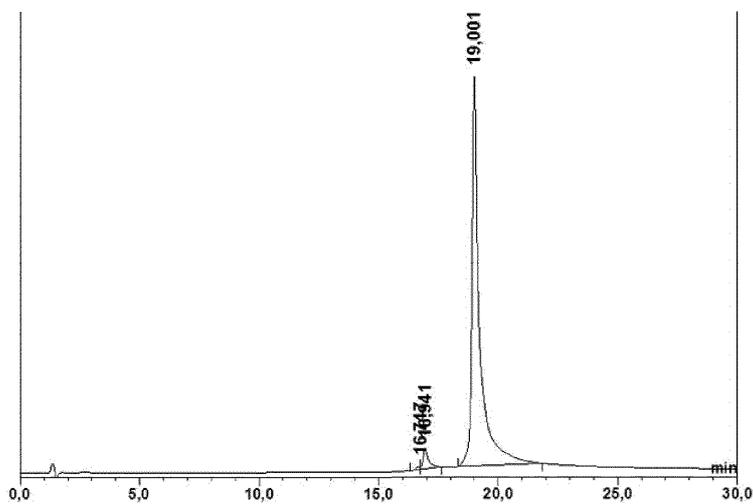
Фиг. 12



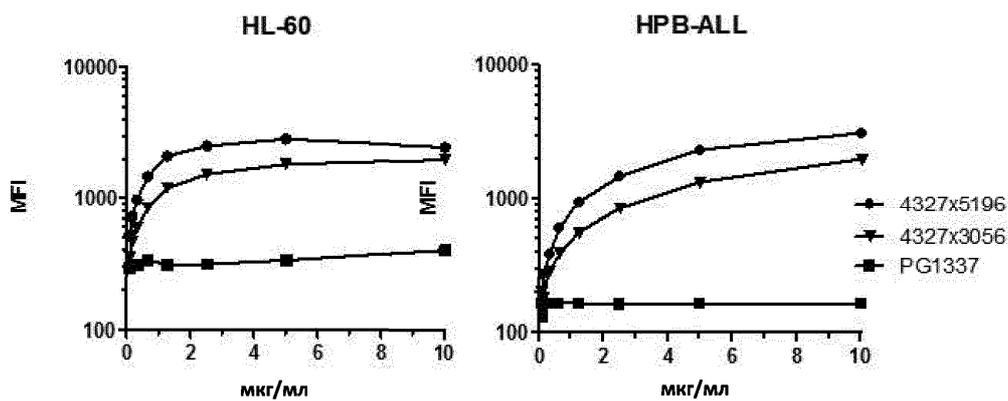
Фиг. 13



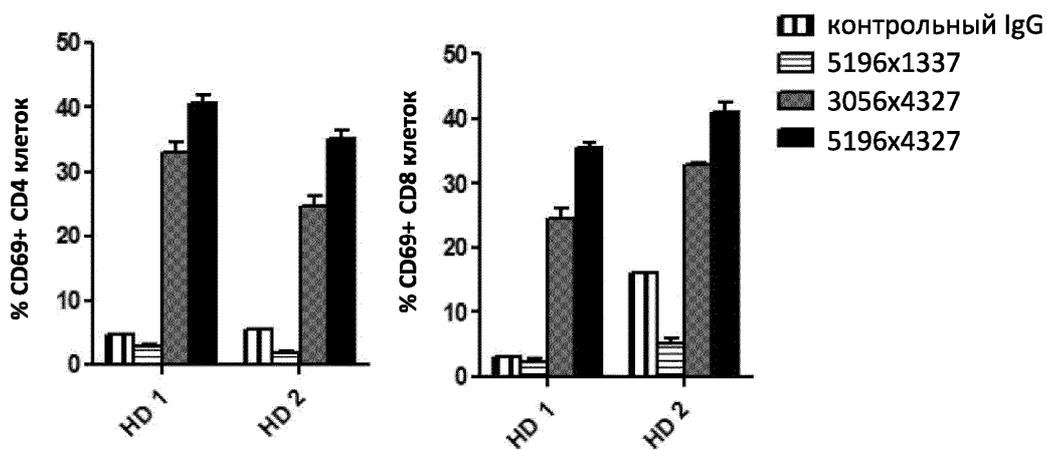
Фиг. 14



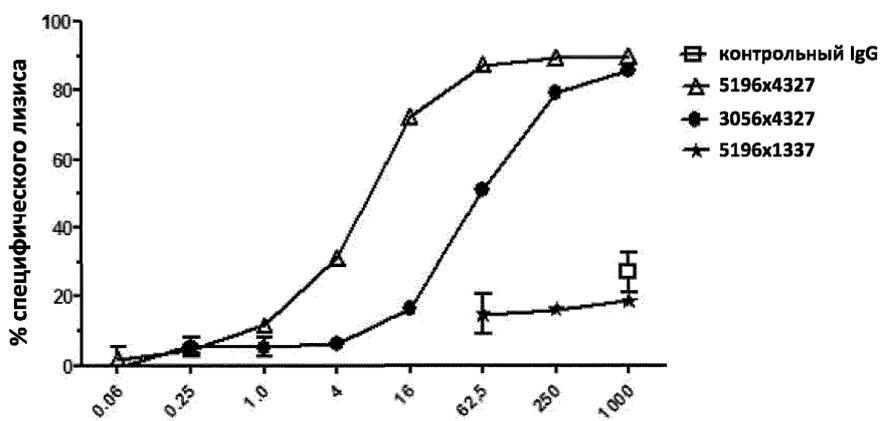
Фиг. 15



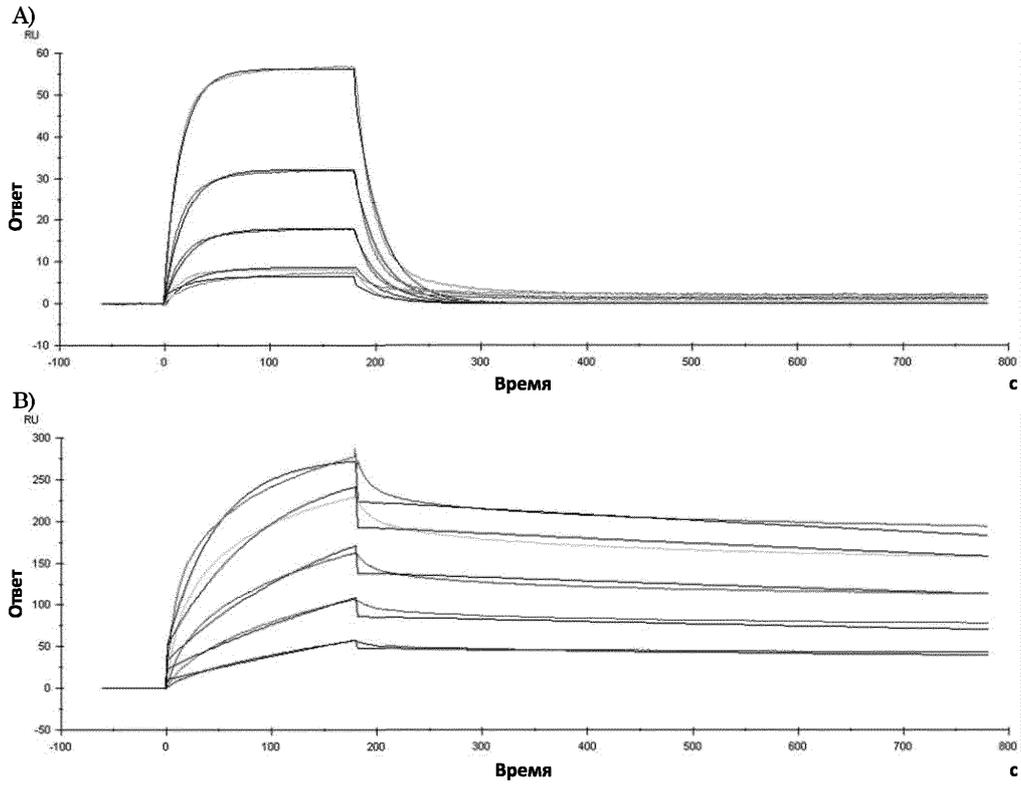
Фиг. 16



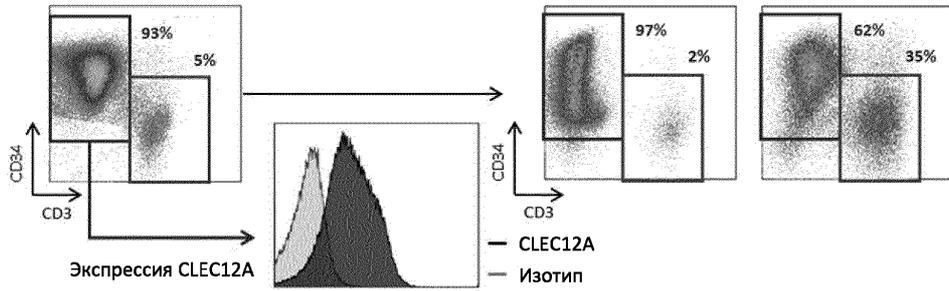
Фиг. 17



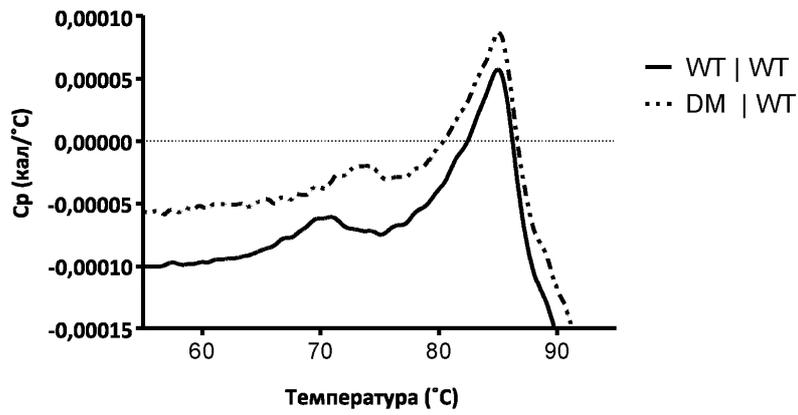
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



| Образец | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) |
|---------|----------|----------|
| WT WT | 70,9 | 85,0 |
| DM WT | 73,5 | 85,0 |

Фиг. 21

046108

15C3 VH (MF3055_VH)
QVQLVQSGGQVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAAIWYNGRQDYADSVKGRFTISRDN
NSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWPWGQGLTLVTVSS

15C3 VL1 - IGKV3-11*
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPASFSGSGSGTDFTL
TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPWTFGQGTKVEIK

15C3 VL2 - IGKV1-13 (MF3055_VL)
AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIK

IGKV1-39 (MF3056_VL)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Фиг. 22

IGKV1-39A

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSYSTP

Фиг. 23A

IGKV1-39/jk1
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTKVEIK

Фиг. 23B

IGKV1-39/jk5
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPTFGQGTRLEIK

Фиг. 23C

MF1337_VH

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSKASDYIFTKYDINWVRQAPGQGLEWVGWMSANTGNTGYAQKFGQGRVTM
TRDTSINTAYMELSSLTSGDTAVYFCARSSLFKTETAPYYHFALDVWGQGTTLVTVSS

MF4327_VH

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHWVRQAPGQGLEWVGIIINPSSGTSYAQKFGQGRVTM
TRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYYCAKGTGDFWFDYWGQGTTLVTVSS

Фиг. 24

1 50

MF5196_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5603_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5616_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5626_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5630_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5648_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5661_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
MF5694_VH (1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
Консенсусная последовательность
(1) QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
51 100

MF5196_VH (51) IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5603_VH (51) IWYNARKQEYIDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5616_VH (51) IWYNARKQEYND SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5626_VH (51) IWYNARKQEYRDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5630_VH (51) IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5648_VH (51) IWYNARKQEYLD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5661_VH (51) IWYNARKQEYSD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
MF5694_VH (51) IWYNARKQEYSD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
Консенсусная последовательность
(51) IWYNARKQEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGT
101 118

MF5196_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
MF5603_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
MF5616_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
MF5626_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
MF5630_VH (101) GYNWYD PWGQGLVTVSS
MF5648_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
MF5661_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
MF5694_VH (101) GYNWFD PWGQGLVTVSS
Консенсусная последовательность
(101) GYNWFD PWGQGLVTVSS

MF5196_VH QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQDYADSV
KGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS

MF5603_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQEYIDSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS

MF5616_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQEYND SVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS

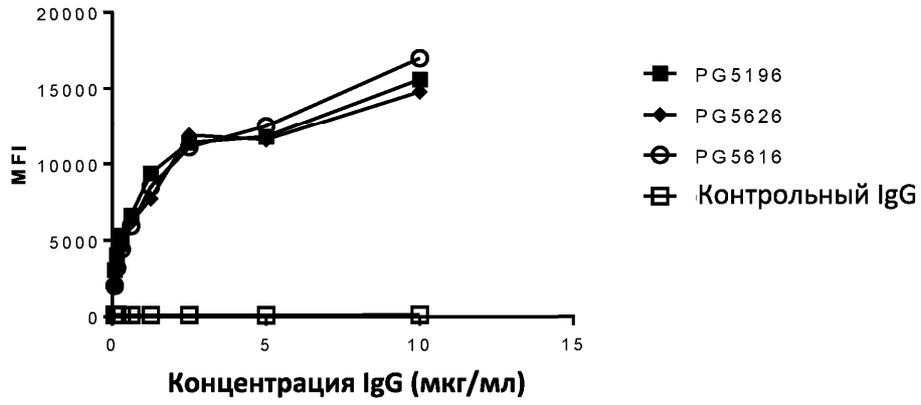
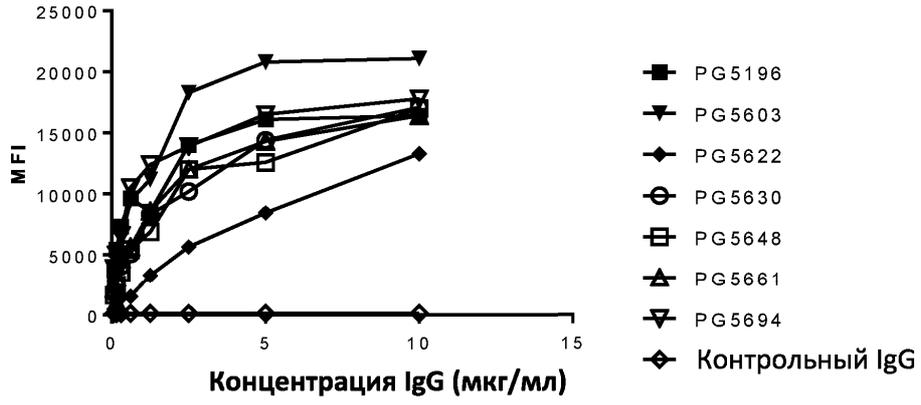
MF5626_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQEYRDSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS

MF5630_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQDYADSVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWYD PWGQGLVTVSS

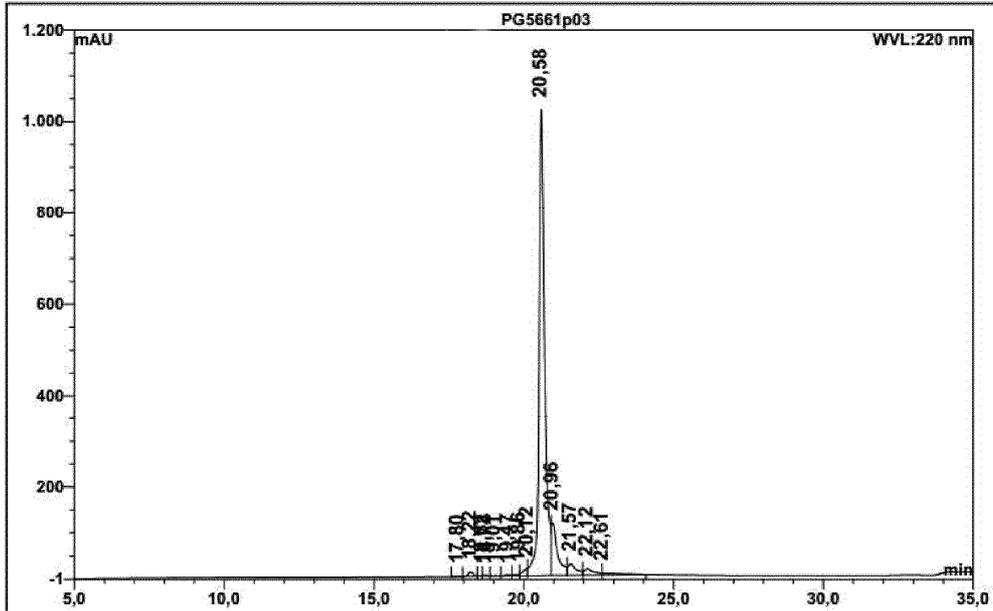
MF5648_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQEYLD SVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS

MF5661_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQEYSD SVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS

MF5694_VH
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYNARKQEYSD SVKGRFTI
SRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFD PWGQGLVTVSS



Фиг. 26



Фиг. 27

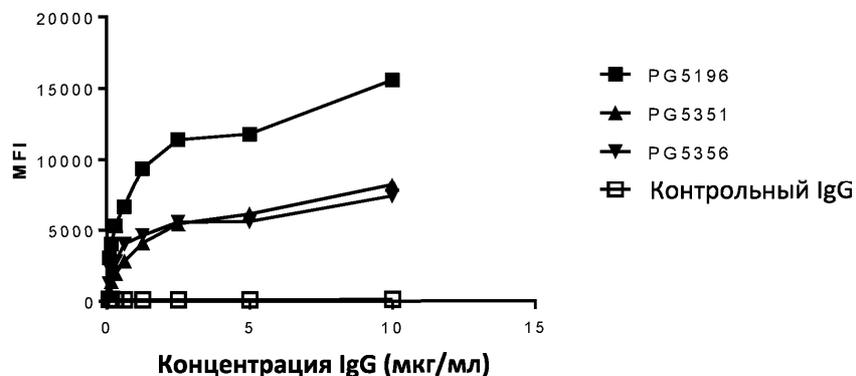
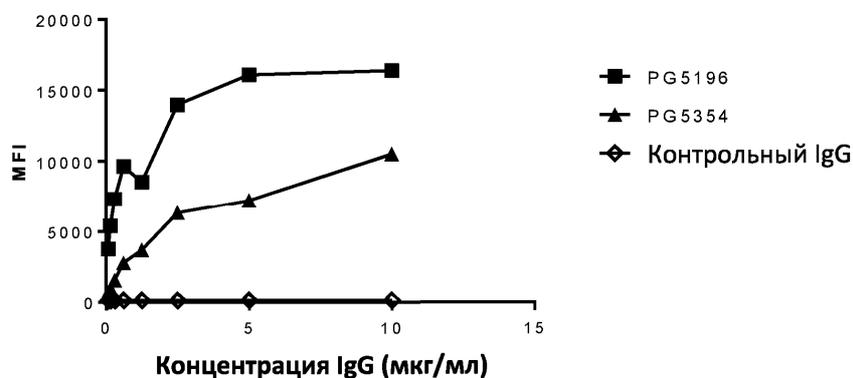
1 50
 MF5196 (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAA
 MF5351 (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAM
 MF5354 (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
 MF5356 (1) QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
 Консенсусная последовательность
 (1) QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAQ
 51 100
 MF5196 (51) IWYNARKQDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
 MF5351 (51) IWYDGKNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
 MF5354 (51) IYYDGSRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
 MF5356 (51) IWHDGRKTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
 Консенсусная последовательность
 (51) IWYDGRKTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGT
 101 118
 MF5196 (101) GYNWFDPWGQGTTLVTVSS
 MF5351 (101) GYNWFDPWGQGTTLVTVSS
 MF5354 (101) GYNWFDPWGQGTTLVTVSS
 MF5356 (101) GYNWFDPWGQGTTLVTVSS
 Консенсусная последовательность
 (101) GYNWFDPWGQGTTLVTVSS

MF5351_VH
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAMIWYDGKNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTTLVTVSS

MF5354_VH
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIYYDGSRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTTLVTVSS

MF5356_VH
 QVQLVESGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSKYGMHWVRQAPGKGLEWVAQIWHDGRKTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGTTLVTVSS

Фиг. 28



Фиг. 29



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2