

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048275**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.14**

(51) Int. Cl. *A61P 37/08* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**202190601**

(22) Дата подачи заявки  
**2019.08.22**

(54) **АНТИТЕЛА АНТИ-Fc ЭПСИЛОН-R1 АЛЬФА (FcER1A), БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ FcER1A И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/721,921**

(32) **2018.08.23**

(33) **US**

(43) **2021.07.14**

(86) **PCT/US2019/047601**

(87) **WO 2020/041537 2020.02.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Оренго Джеми М., Лимнандер Андре,**

**Ким Дзее Х., Мерфи Эндрю Дж. (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2017053856**

JUNG YEON HONG ET AL.: "Antibody to Fc[epsilon]RI[alpha] Suppresses Immunoglobulin E Binding to High-Affinity Receptor I in Allergic Inflammation", YONSEI MEDICAL JOURNAL, vol. 57, no. 6, 1 November 2016 (2016-11-01), page 1412, XP055615091, KI, ISSN: 0513-5796, DOI: 10.3349/ymj.2016.57.6.1412, abstract, page 1415, left-hand column, paragraph 1 - right-hand column,

paragraph 2; figures 4B, 4C page 1417, paragraph Discussion - page 1419

Frank Riske ET AL.: "THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 0 1991 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. High Affinity Human IgE Receptor (FcRI) ANALYSIS OF FUNCTIONAL DOMAINS OF THE  $\alpha$ -SUBUNIT WITH MONOCLONAL ANTIBODIES", 15 June 1991 (1991-06-15), pages 11245-11251, XP055639038, Retrieved from the Internet: URL:http://www.jbc.org/content/266/17/11245.full.pdf, abstract, page 11246, paragraph Materials and Methods; figure 2; tables I, II page 11247, left-hand column, paragraph 1 - page 11248, left-hand column, paragraph 1  
US-A1-2006073142

J. JACKMAN ET AL.: "Development of a Two-part Strategy to Identify a Therapeutic Human Bispecific Antibody That Inhibits IgE Receptor Signaling", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 27, 2 July 2010 (2010-07-02), pages 20850-20859, XP055002016, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M110.113910, abstract, page 20851, left-hand column, paragraph 1; figure 1 page 20853, paragraph Results - page 20857 page 20858, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2

(57) Настоящее изобретение относится к новым полноразмерным человеческим антителам, которые связываются с человеческим Fc эpsilon-R1 альфа (моноспецифические антитела). Настоящее изобретение также обеспечивает новые биспецифические антитела (bsAbs), которые связываются как с Fc-эpsilon-R1 альфа, так и с CD3, и активируют Т-клетки через комплекс CD3 в присутствии клеток, экспрессирующих Fc-эpsilon-R1 альфа. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению полезны для лечения заболеваний и расстройств, при которых желателен и/или терапевтически полезен усиленный или индуцированный иммунный ответ, нацеленный на Fc-эpsilon-R1 альфа. Например, биспецифические антитела по изобретению полезны для лечения аллергии, включая анафилаксию.

**B1****048275****048275 B1**

### Родственные заявки

Данная заявка относится к предварительной заявке США № 62/721921, поданной 23 августа 2018 г., и испрашивает ее приоритет. Все содержание вышеупомянутой заявки прямо включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Ссылка на перечень последовательностей

Данная заявка включает посредством ссылки Перечень последовательностей, представленный в машиночитаемой форме в виде файла 10480WO01\_118003-45320\_SL.txt, созданного 21 августа 2019 г., и содержащего 67307 байт.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфичны для FcεR1α, и способам их применения. Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антигенсвязывающим молекулам, которые связывают FcεR1α и CD3, и способам их применения.

### Уровень техники

FcεR1 представляет собой высокоаффинный рецептор Fc для иммуноглобулина E (IgE), и FcεR1 связывается с IgE со значением равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) около  $10^{-10}$  M. Сшивание рецептора FcεR1 с помощью аллерген-связанного IgE приводит к клеточной дегрануляции и последующему аллергическому ответу, а уровень IgE в сыворотке положительно коррелирует с FcεR1.

FcεR1 человека экспрессируется в тучных клетках, базофилах, моноцитах, макрофагах, мДК (миелоидные дендритные клетки), пДК (перитонеальные дендритные клетки), клетках Лангерганса, эозинофилах и тромбоцитах. Тучные клетки и базофилы являются врожденными эффекторными клетками, которые играют роль в аллергии и анафилаксии посредством опосредованного аллергеном перекрестного связывания рецептора IgE, FcεR1α. Другие роли включают заживление ран и иммунитет слизистой оболочки.

Существует два типа рецепторов FcεR1 на поверхности мультимерных клеток человека: тетрамерная форма и тримерная форма. Тетрамерный человеческий FcεR1 содержит α-цепь, β-цепь и гомодимер γ-цепей ( $\alpha\beta\gamma_2$ ), а тримерный человеческий FcεR1 содержит α-цепь и гомодимер γ-цепей ( $\alpha\gamma_2$ ). Альфа-цепь FcεR1 связывается с одной молекулой антитела IgE, в то время как о роли β- и γ-цепей в связывании лиганда сообщения отсутствуют.

Человеческий FcεR1 связывается как с человеческим, так и с мышинным IgE, а интерлейкин-4 (IL-4) усиливает экспрессию α-цепи у человека. В отличие от этого мышинный FcεR1 имеет только тетрамерную изоформу  $\alpha\beta\gamma_2$  и экспрессируется в тучных клетках и базофилах. IL-4 не усиливает экспрессию α-цепи мышинного FcεR1.

CD3 представляет собой гомодимерный или гетеродимерный антиген, экспрессируемый на Т-клетках в ассоциации с Т-клеточным рецепторным комплексом (TCR), и он требуется для активации Т-клеток. Функциональный CD3 образуется в результате димерной ассоциации двух из четырех различных цепей: эпсилон, дзета, дельта и гамма. Димерные структуры CD3 включают гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета. Было показано, что антитела против CD3 образуют кластеры CD3 на Т-клетках, тем самым вызывая активацию Т-клеток аналогично вовлечению TCR (Т-клеточные рецепторы) нагруженными пептидами молекулами ГКГ (главный комплекс гистосовместимости). Таким образом, анти-CD3-антитела были предложены для терапевтических целей, включающих активацию Т-клеток.

Антигенсвязывающие молекулы, нацеленные на FcεR1 α, а также биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают как FcεR1α, так и CD3, могут быть полезны в терапевтических условиях, в которых желательно специфическое нацеливание и опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих FcεR1α.

### Раскрытие изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение предлагает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с человеческим FcεR1α. Антитела согласно этому аспекту полезны, среди прочего, для нацеливания на клетки, экспрессирующие FcεR1α. Настоящее изобретение также относится к биспецифическим антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают человеческий FcεR1α и человеческий CD3. Биспецифические антитела согласно этому аспекту полезны, среди прочего, для нацеливания на Т-клетки, экспрессирующие CD3, и для стимуляции активации Т-клеток, например, при обстоятельствах, когда опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих FcεR1α, является полезным или желательным. Например, биспецифические антитела могут направлять опосредованную CD3 активацию Т-клеток в специфические клетки, экспрессирующие FcεR1α, такие как тучные клетки или базофилы.

Примерные антитела анти-FcεR1α по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 в данном документе. В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR) и переменных областей легкой цепи (LCVR), а также областей, определяющих комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), областей, определяющих

комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) примерных антител против FcεR1α. В табл. 2 представлены идентификаторы последовательностей молекул нуклеиновых кислот, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, HC и LC примерных антител против FcεR1α.

Настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCVR, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие LCVR, который содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в табл. 1, или их по существу аналогичную последовательность, содержащую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), которые содержат любую из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в табл. 1, в паре с любой аминокислотной последовательностью LCVR, указанных в табл. 1. Согласно определенным вариантам воплощения настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из примерных антител против FcεR1α, указанных в табл. 1. В некоторых вариантах воплощения пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR имеет SEQ ID NO: 2/26, 10/26 или 18/26 (например, mAb1710, mAb17111 или mAb17112).

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в табл. 1, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие HCDR3 и пару аминокислотных последовательностей LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащих любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, указанных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из примерных антител против FcεR1α, указанных в табл. 1. В некоторых вариантах воплощения пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 имеет SEQ ID NO: 8/32, 16/32 или 24/32 (например, mAb17110,

mAb17111 или mAb17112).

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из примерных антител против FcεR1α, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах воплощения набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-28-30-32, 12-14-16-28-30-32 или 20-22-24-28-30-32 (например, mAb17110, mAb17111 или mAb17112).

В родственном варианте воплощения настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор из шести CDR (то есть, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащийся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как определено любым из примерных антител против FcεR1α, указанных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID NO: 2/26, 26/10 или 18/26 (например, mAb17110, mAb17111 или mAb17112). Способы и методики идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны в данной области техники и могут использоваться для идентификации CDR в определенных аминокислотных последовательностях HCVR и/или LCVR, описанных в данном документе. Примерные условные обозначения, которые могут использоваться для идентификации границ CDR, включают, например, определение Kabat, определение Chothia и определение AbM. В общих чертах, определение Kabat основано на вариативности последовательности, определение Chothia основано на расположении участков структурной петли, а определение AbM представляет собой компромисс между подходами Kabat и Chothia. См, например, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); and Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989). Для идентификации последовательностей CDR в антителе также доступны общедоступные базы данных.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела анти-FcεR1α или их части. Например, настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей

мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей L<sub>CDR2</sub>, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты L<sub>CDR2</sub>, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей L<sub>CDR3</sub>, указанных в табл. 1; в некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты L<sub>CDR3</sub>, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (т.е. H<sub>CDR1</sub>-H<sub>CDR2</sub>-H<sub>CDR3</sub>), где набор аминокислотных последовательностей H<sub>CDR1</sub>-H<sub>CDR2</sub>-H<sub>CDR3</sub> определен любым их примерных антител против FcεR1α, указанных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (т.е. L<sub>CDR1</sub>-L<sub>CDR2</sub>-L<sub>CDR3</sub>), где набор аминокислотных последовательностей L<sub>CDR1</sub>-L<sub>CDR2</sub>-L<sub>CDR3</sub> определен любым их примерных антител против FcεR1α, указанных в табл. 1.

Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в табл. 1, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность любой из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в табл. 1. В некоторых вариантах воплощения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновых кислот LCVR, указанных в табл. 2, или ее по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности. В некоторых вариантах воплощения согласно данному аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где HCVR и LCVR происходят от одного и того же антигена анти-FcεR1α, перечисленного в табл. 1.

Настоящее изобретение также предоставляет рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела анти-FcεR1α. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из молекул нуклеиновых кислот, упомянутых выше, то есть молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, как указано в табл. 1. В объеме настоящего изобретения также включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела или фрагменты антител и извлекать антитела, и фрагменты антител, полученные таким образом.

Настоящее изобретение включает антитела анти-FcεR1α, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых вариантах воплощения, может быть, полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитела, лишённого фрагмента фруктозы, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см., Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификация галактозилирования может быть сделана для модификации комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ).

В другом аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую рекомбинантное человеческое антитело или его фрагмент, который специфически связывает FcεR1α и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение относится к композиции, которая представляет собой комбинацию антитела анти-FcεR1α и второго терапевтического агента. В одном варианте воплощения вторым терапевтическим агентом является любой агент, который преимущественно комбинируется с антителом против FcεR1α. Дополнительные комбинированные терапии и совместные составы, содержащие антитела анти-FcεR1α по настоящему изобретению, раскрыты в другом месте в настоящем документе.

В другом аспекте изобретение относится к терапевтическим способам нацеливания/уничтожения клеток, экспрессирующих FcεR1α (например, тучных клеток или базофилов), с использованием антитела анти-FcεR1α по настоящему изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевти-

чески эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело против FcεR1α по изобретению, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых случаях антитела анти-FcεR1α (или их антигенсвязывающие фрагменты) можно использовать для лечения аллергии или их можно модифицировать с тем, чтобы они были более цитотоксичными, с помощью способов, включая, помимо прочего, модифицированные домены Fc для увеличения АЗКЦ (см., например, Shield et al. (2002) JBC 277:26733), радиоиммунотерапии, конъюгатов антитело-лекарственное средство или других способов повышения эффективности уничтожения клеток, экспрессирующих FcεR1α.

Настоящее изобретение также включает применение антитела анти-FcεR1α по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства (например, аллергии), связанного с клетками, экспрессирующими FcεR1α, или вызванного ими.

В еще одном аспекте изобретение предоставляет моноспецифические антитела анти-FcεR1α для диагностических применений, такие как, например, реагенты для визуализации.

В еще одном аспекте изобретение относится к терапевтическим способам стимуляции активации Т-клеток с использованием антитела против CD3 или антигенсвязывающей части антитела по изобретению, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей антитело по настоящему изобретению.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает человеческий FcεR1α или связывает FcεR1α яванского макака (*Macaca fascicularis*) с равновесной константой диссоциации связывания ( $K_D$ ) менее около 250 нМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса при 25°C. В еще одном аспекте настоящее изобретение предоставляет изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает человеческий FcεR1α с диссоциативным периодом полужизни ( $t^{1/2}$ ) более чем около 0,54 мин или связывает FcεR1α яванского макака с диссоциативным периодом полужизни ( $t^{1/2}$ ) более чем около 0,6 мин при измерении с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

Изобретение далее предоставляет антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FcεR1α с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1. В другом аспекте изобретение предоставляет антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который конкурирует за связывание с человеческим FcεR1α с эталонным антителом, содержащим пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/26; 10/26 и 18/26.

Кроме того, изобретение предоставляет антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на человеческом FcεR1α, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, как указано в табл. 1. В другом аспекте антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на человеческом FcεR1α, что и эталонное антитело, содержащее пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/26; 10/26 и 18/26.

Кроме того, изобретение предоставляет изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает человеческий FcεR1α, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает: определяющие комплементарность области (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащие аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1; и CDR варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность, как указано в табл. 1. В другом аспекте изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из: 2/26; 10/26 и 18/26. В еще одном аспекте изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, соответственно, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-28-30-32; 12-14-16-28-30-32 и 20-22-24-28-30-32.

В другом аспекте изобретение предоставляет изолированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает человеческий FcεR1α, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) варибельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 10 и 18; и (б) варибельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26. В дополнительном аспекте изолированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2/26; 10/26 и 18/26.

Согласно другому аспекту, настоящее изобретение предоставляет биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, антитела), которые связывают FcεR1α и CD3. Такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также называются здесь как "биспецифические молекулы анти-FcεR1α/анти-CD3", "биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α", "анти-FcεR1α x CD3", "анти-CD3 x FcεR1α" или "FcεR1α x CD3 bsAbs". Анти-FcεR1α часть биспецифической молекулы анти-FcεR1α/анти-CD3 полезна для нацеливания на клетки, которые экспрессируют FcεR1α (например, туч-

ные клетки или базофилы), а анти-CD3-часть биспецифической молекулы полезна для активации Т-клеток. Одновременное связывание FcεR1α с тучными клетками или базофилами и CD3 с Т-клеткой способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) тучных клеток-мишеней или базофилов активированными Т-клеткой. Следовательно, биспецифические молекулы анти-FcεR1α/анти-CD3 по изобретению полезны, среди прочего, для лечения заболеваний и расстройств, связанных или вызванных клетками, экспрессирующими FcεR1α (например, аллергии).

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы согласно этому аспекту настоящего изобретения содержат первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α. Настоящее изобретение включает биспецифические молекулы анти-FcεR1α/анти-CD3 (например, биспецифические антитела), в которых каждый антигенсвязывающий домен содержит переменную область тяжелой цепи (HCVR), спаренную с переменной областью легкой цепи (LCVR). В некоторых иллюстративных вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающий домен анти-CD3 и антигенсвязывающий домен анти-FcεR1α, каждый, содержат разные, отдельные HCVR, спаренные с общим LCVR. Например, как проиллюстрировано здесь в примере 1, были сконструированы биспецифические антитела, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, где первый антигенсвязывающий домен включает HCVR и LCVR, каждый из которых происходит из анти-CD3-антитела; и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен включает HCVR, полученный из антитела анти-FcεR1α, спаренного с тем же LCVR. В таких вариантах воплощения изобретения первый и второй антигенсвязывающие домены содержат разные анти-CD3 и FcεR1α HCVR, но содержат общую LCVR. Аминокислотная последовательность этого LCVR показана, например, в SEQ ID NO: 26, а аминокислотные последовательности соответствующих CDR (т.е. LCDR1-LCDR2-LCDR3) показаны в, соответственно, SEQ ID NO: 28, 30 и 32. Можно использовать генетически модифицированных мышей для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая включает переменный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена переменной области легкой цепи человека. Альтернативно, переменные тяжелые цепи могут быть спарены с одной общей легкой цепью и рекомбинантно экспрессированы в клетках-хозяевах. По существу, антитела по изобретению могут содержать тяжелые цепи иммуноглобулина, связанные с одной перестроенной легкой цепью. В некоторых вариантах воплощения легкая цепь содержит переменный домен, полученный из сегмента гена Vκ1-39 человека или сегмента гена Vκ3-20. В других вариантах воплощения легкая цепь содержит переменный домен, происходящий из сегмента гена Vκ1-39 человека, реаранжированного сегментом гена Jκ5 человека или гена Jκ1 человека (WO 2017/053856, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

Настоящее изобретение предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает любую из аминокислотных последовательностей HCVR, любую из аминокислотных последовательностей LCVR, любую из пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, как указано в Публикации США 2014/0088295, опубликованной 27 марта 2014 г., и в WO 2018/067331, опубликованной 12 апреля 2018 г.

Кроме того, настоящее изобретение предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит любую из аминокислотных последовательностей HCVR, указанных в табл. 3 в данном документе. Первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, может также содержать любую из аминокислотных последовательностей LCVR, указанных в табл. 1 и 3 в данном документе. Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 тяжелой цепи, указанных в табл. 3, и/или любую из аминокислотных последовательностей CDR1-CDR2-CDR3 легкой цепи, указанных в табл. 1 и 3 в данном документе.

Согласно определенным вариантам воплощения, настоящее изобретение предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает переменную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 в данном документе или по существу аналогичную ее последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает переменную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 и 3 в данном документе, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере

90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), указанную в табл. 3 в данном документе.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, в которых первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 3 в данном документе, или по существу аналогичную ей последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 и 3 в данном документе, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

В некоторых вариантах воплощения первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, указанную в табл. 3 в данном документе.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, включает домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащий аминокислоту, указанную в табл. 3 в данном документе, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислоту, указанную в табл. 3, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислоту, указанную в табл. 3, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 и 3 в данном документе, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен легкой цепи CDR2 (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 и 3 в данном документе, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 и 3 в данном документе, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые неограничивающие примеры биспецифических антигенсвязывающих молекул против CD3/анти-FcεR1α по изобретению включают первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3, содержащий, соответственно, домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 с аминокислотными последовательностями, указанными в табл. 3 в данном документе.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность, указанную в табл. 3, и области, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность, указанную в табл. 1 и 3.

В другом аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, в которой первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, содержит определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и области, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

Изобретение также предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, включает HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44-46-48-28-30-32.

В дополнительном аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека, содержит CDR тяжелой и легкой цепей пары аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR SEQ ID

NO: 42/26.

В дополнительных вариантах воплощения изобретения примерные анти-CD3/анти-FcεR1α биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению включают биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, где первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, включает HCVR, содержащий HCDR1-HCDR2-HCDR3, имеющий аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44-46-48.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, включает вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 10 и 18, или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, включает вариабельную область легкой цепи (LCVR), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, включает пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/26, 10/26 и 18/26.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, включает домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 16 и 24 или по существу аналогичную им последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

В определенных вариантах воплощения изобретения второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, содержит пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/32, 16/32 и 24/32.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, включает домен CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 12 и 20 или их по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 14 и 22, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 16 и 24, или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; домен CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности; и домен CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32 или его по существу аналогичную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности.

Некоторые неограничивающие примеры биспецифических антигенсвязывающих молекул против CD3/анти-FcεR1α по изобретению включают второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α, содержащий, соответственно, домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-28-30-32, 12-14-16-28-30-32 и 20-22-24-28-30-32.

В родственном варианте воплощения изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен, который специфически свя-

зывает FcεR1α, включает CDR-домены тяжелой и легкой цепей, содержащиеся в последовательностях варибельной области тяжелой и легкой цепей (HCVR/LCVR), выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/26, 10/26 и 18/26.

В другом аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую: (а) первый антигенсвязывающий домен, который включает три определяющих комплементарности области тяжелой цепи, соответственно, HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46 и 48, и три области, определяющие комплементарность легкой цепи, соответственно, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32, где первый антигенсвязывающий домен специфически связывает человеческий CD3; и (б) второй антигенсвязывающий домен, который включает три области, определяющие комплементарность тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и три области, определяющие комплементарность легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3); где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4, 12 и 20; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6, 14 и 22; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8, 16 и 24; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, где второе антигенсвязывающее плечо специфически связывает человеческий FcεR1α.

В другом аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает человеческий FcεR1α, где второй антигенсвязывающий домен происходит из антитела или антигенсвязывающего фрагмента любого из антител против FcεR1α по изобретению. В дополнительном аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий FcεR1α.

Изобретение также предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая связывает человеческие клетки, экспрессирующие человеческий CD3. В другом аспекте биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает человеческие клетки, экспрессирующие человеческий FcεR1α, и/или клетки, экспрессирующие FcεR1α яванского макака.

В другом аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая ингибирует аллергическую реакцию у субъекта (например, мышей), экспрессирующего человеческий FcεR1α. Изобретение также предоставляет биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые истощают базофилы или другие клетки, экспрессирующие FcεR1α, у субъекта (например, мышей), экспрессирующего человеческий FcεR1α.

В другом аспекте изобретение предоставляет биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, содержащую второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает клетку-мишень, экспрессирующую человеческий FcεR1α, с коэффициентом связывания более 200 в присутствии или в отсутствие IgE или связывает клетку-мишень, экспрессирующую FcεR1α яванского макака с коэффициентом связывания более 140 в присутствии или в отсутствие IgE, причем такое соотношение связывания измеряют в анализе связывания *in vitro* FACS (сортировка флуоресцентно-активированных клеток).

В некоторых вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающая молекула индуцирует опосредованное Т-клетками уничтожение клеток, экспрессирующих FcεR1α, со значением EC<sub>50</sub> менее около 20 нМ, как измерено в анализе опосредованного Т-клетками уничтожения клеток *in vitro*, например, где клетки, экспрессирующие FcεR1α, представляют собой базофилы.

В некоторых применениях второй антигенсвязывающий домен связывает FcεR1α человека или яванского макака со значением K<sub>D</sub> менее около 467 нМ, как измерено в анализе связывания поверхностного плазмонного резонанса *in vitro* при 25°C. В некоторых случаях второй антигенсвязывающий домен связывает каждый из FcεR1α человека и FcεR1α яванского макака со значением K<sub>D</sub> менее около 450 нМ, менее около 400 нМ, менее около 350 нМ, менее около 300 нМ, менее около 250 нМ, менее около 200 нМ, менее около 150 нМ, менее около 100 нМ или менее около 50 нМ.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антитела анти-FcεR1α по изобретению, их антигенсвязывающие фрагменты и биспецифические антитела были получены путем поэтапной замены аминокислотных остатков родительского антитела на основе различий между последовательностью зародышевой линии и последовательностью родительского антитела.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет изолированную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая конкурирует за связывание с FcεR1α или связывается с тем же эпитопом на FcεR1α, что и эталонное антитело, где эталонное антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42/26, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую ами-

нокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/26, 10/26 или 18/26.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет изолированную биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая конкурирует за связывание с CD3 человека или связывается с тем же эпитопом на CD3 человека, что и эталонное антитело, где эталонное антитело включает первый антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 42/26, и второй антигенсвязывающий домен, содержащий пару HCVR/LCVR, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2/26, 10/26 или 18/26.

Любая из биспецифических антигенсвязывающих молекул, обсуждаемых выше или здесь, может быть биспецифическим антителом. В некоторых вариантах воплощения изобретения биспецифическое антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG. В одном варианте воплощения изобретения константная область тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой изотип IgG1. В одном варианте воплощения изобретения константная область тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой изотип IgG4. В различных вариантах воплощения изобретения биспецифическое антитело содержит химерный шарнир, который снижает связывание рецептора Fcγ по сравнению с шарниром дикого типа того же изотипа.

Настоящее изобретение также предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, указанных в табл. 1 в паре с любой из аминокислотных последовательностей LC, указанных в табл. 1. Согласно некоторым вариантам воплощения настоящее изобретение предоставляет антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC/LC, содержащихся в любом из примерных антител против FcεR1α, указанных в табл. 1. В некоторых вариантах воплощения пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34/40, 36/40 и 38/40.

Настоящее изобретение также предоставляет биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие первую тяжелую цепь, вторую тяжелую цепь и общую легкую цепь, содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC или LC, указанных в табл. 7. В некоторых вариантах воплощения биспецифические антитела содержат первую HC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; вторую HC, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 50, 52 и 54; и общую легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

В одном аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую антигенсвязывающую молекулу анти-FcεR1α или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу анти-FcεR1α/анти-CD3 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В изобретении дополнительно предложен способ лечения заболевания, аллергии или IgE-связанного заболевания у субъекта, связанного с FcεR1α, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающую молекулу против FcεR1α или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу анти-FcεR1α/анти-CD3 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В некоторых вариантах воплощения изобретения аллергия или другие связанные с IgE заболевания выбраны из группы, состоящей из аллергической астмы, аллергического ринита, сенной лихорадки, анафилаксии, атопического дерматита, хронической крапивницы, пищевой аллергии, круглогодичной аллергии, лекарственной аллергии и аллергии на пыльцу. В одном варианте воплощения изобретения аллергия является тяжелой аллергией. В некоторых случаях аллергия приводит к анафилаксии. В некоторых вариантах воплощения изобретения заболевание, связанное с FcεR1α, включает тяжелую аллергию, нарушение активации тучных клеток или мастоцитоз. В некоторых вариантах воплощения изобретения способ лечения аллергии включает введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей антигенсвязывающую молекулу анти-FcεR1α или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу анти-FcεR1α/анти-CD3 в определенной дозе, как описано в другом месте в настоящем документе.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из последовательностей HCVR, LCVR или CDR анти-FcεR1α и биспецифических антигенсвязывающих молекул анти-CD3/анти-FcεR1α, описанных в данном документе, включая молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотидные последовательности, указанные в табл. 2 и 4 в данном документе, а также молекулы нуклеиновых кислот, содержащие две или более полинуклеотидных последовательностей, указанных в табл. 2 и 4, в любой их функциональной комбинации или расположении. Рекомбинантные векторы экспрессии, несущие нуклеиновые кислоты по изобретению, и клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, также охватываются изобретением, как и способы получения антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих продуцировать антитела, и извлечение полученных антител.

Настоящее изобретение предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей тяжелой цепи, указанных в табл. 7. Настоящее изобретение также предоставляет молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей легкой цепи, указанную в табл. 7.

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, где любой из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают CD3, скомбинированы, соединены или иным образом связаны с любым из вышеупомянутых антигенсвязывающих доменов, которые специфически связывают FcεR1α с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая связывает CD3 и FcεR1α.

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, имеющие модифицированный паттерн гликозилирования. В некоторых применениях, может быть, полезна модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антителиа, лишённого фрагмента фруктозы, присутствующего в цепи олигосахарида, например, для увеличения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) (см., Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других применениях модификация галактозилирования может быть сделана, чтобы изменить комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ).

В другом аспекте изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическую антигенсвязывающую молекулу анти-CD3/анти-FcεR1α, как раскрыто в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В родственном аспекте изобретение предоставляет композицию, которая представляет собой комбинацию биспецифической антигенсвязывающей молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α и второго терапевтического агента. В одном варианте воплощения изобретения второй терапевтический агент представляет собой любой агент, который преимущественно комбинируется с биспецифической антигенсвязывающей молекулой анти-CD3/анти-FcεR1α. Примерные агенты, которые можно выгодно комбинировать с биспецифической антигенсвязывающей молекулой анти-CD3/анти-FcεR1α, подробно обсуждаются в другом месте в настоящем документе.

В еще одном аспекте изобретение предоставляет терапевтические способы нацеливания/удаления клеток, экспрессирующих FcεR1α, с использованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению анти-CD3/анти-FcεR1α, где терапевтические способы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей биспецифическую антигенсвязывающую молекулу анти-CD3/анти-FcεR1α по изобретению субъекту, нуждающемуся в этом. Антитело или его фрагмент можно вводить подкожно, внутривенно, внутривожно, внутривентриально, перорально или внутримышечно. В некоторых вариантах воплощения изобретения антитело по изобретению вводят в дозе от около 0,001 мг/кг веса тела до около 200 мг/кг веса тела субъекта. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъекту, нуждающемуся в этом, вводят антитело по изобретению в дозе, содержащей от 1 до 2500 мг антителиа.

Настоящее изобретение также включает применение биспецифической антигенсвязывающей молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими FcεR1α, или вызванного ими.

Другие варианты воплощения изобретения станут очевидными из обзора последующего подробного описания.

### **Подробное описание изобретения**

Перед описанием настоящего изобретения следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для описания конкретных вариантов воплощения изобретения и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается обыкновенным специалистом в области техники, к которой принадлежит это изобретение. Используемый здесь термин "около", когда он используется по отношению к конкретному приведенному числовому значению, означает, что значение может отличаться от указанного значения не более чем на 1%. Например, как используется здесь, выражение "около 100" включает 99 и 101, и все значения между ними (например, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут использоваться на практике или при тестировании настоящего изобретения, теперь описаны предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Определения.

Выражение "CD3" в контексте настоящего описания относится к антигену, который экспрессируется на Т-клетках как часть мультимолекулярного Т-клеточного рецептора (TCR) и который состоит из гомодимера или гетеродимера, образованного ассоциацией двух из четырех рецепторных цепей: CD3-эпсилон, CD3-дельта, CD3-дзета и CD3-гамма. Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белков в данном документе предназначены для обозначения человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они принадлежат к видам, не относящимся к человеку. Таким образом, выражение "CD3" означает человеческий CD3, если не указано иное, как при-

надлежащий к нечеловеческому виду, например, "мышинный CD3", "обезьяний CD3" и т.д. Человеческий CD3-эпсилон содержит аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 59; CD3-дельта человека содержит аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 60; CD3-дзета содержит аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 61; и CD3-гамма содержит аминокислотную последовательность, указанную как SEQ ID NO: 62.

В данном контексте "антитело, которое связывает CD3" или "антитело против CD3" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают одну субъединицу CD3 (например, эпсилон, дельта, гамма или дзета), а также антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают димерный комплекс из двух субъединиц CD3 (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета). Антитела и антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут связывать растворимый CD3 и/или CD3, экспрессируемый на поверхности клетки. Растворимый CD3 включает природные белки CD3, а также варианты рекомбинантных белков CD3, такие как, например, мономерные и димерные конструкции CD3, в которых отсутствует трансмембранный домен или которые иным образом не связаны с клеточной мембраной.

В данном контексте выражение "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" означает один или более белков CD3, который/которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo*, так что по меньшей мере часть белка CD3 находится на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна антигенсвязывающей части антитела. "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" включает белки CD3, содержащиеся в контексте функционального T-клеточного рецептора в мембране клетки. Выражение "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" включает белок CD3, экспрессируемый как часть гомодимера или гетеродимера на поверхности клетки (например, димеры CD3 гамма/эпсилон, дельта/эпсилон и дзета/дзета). Выражение "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" также включает цепь CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), которая экспрессируется сама по себе, без других типов цепей CD3, на поверхности клетки. "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок CD3. В качестве альтернативы, "CD3, экспрессируемый на клеточной поверхности" может содержать или состоять из белка CD3, экспрессируемого на поверхности клетки, которая обычно не экспрессирует CD3 человека на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии CD3 на своей поверхности.

В данном контексте выражение "FcεR1α" относится к α-цепи высокоаффинного Fc рецептора (FcεR1) для IgE. FcεR1α отвечает за связывание IgE с FcεR1. FcεR1α экспрессируется в тучных клетках, базофилах, моноцитах, макрофагах, мДК, пДК, клетках Лангерганса, эозинофилах и тромбоцитах. Аминокислотная последовательность человеческого FcεR1α представлена как SEQ ID NO: 63. Термин "FcεR1α" включает рекомбинантный белок FcεR1α или его фрагмент. Термин также включает белок FcεR1α или его фрагмент, связанный, например, с гистидиновой меткой, мышинным или человеческим Fc, или с сигнальной последовательностью, такой как ROR1 (например, SEQ ID NO: 57 или 58).

В данном контексте "антитело, которое связывает FcεR1α" или "антитело против FcεR1α" включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически распознают FcεR1α.

Используемый здесь термин "заболевание или расстройство, связанное с экспрессией FcεR1α" включает любое заболевание или расстройство, при котором ожидается ингибирование экспрессии и/или активности (например, передачи сигналов) FcεR1α и/или уничтожение клеток, экспрессирующих FcεR1α, для облегчения симптомов и/или прогрессирования заболевания. Например, такие заболевания и расстройства включают, помимо прочего, нарушения активации тучных клеток, мастоцитоз и аллергию, включая, помимо прочего, пищевую аллергию, аллергию на пыльцу, аллергию на перхоть домашних животных и т.д.

Термин "аллергия" в контексте настоящего описания относится к состоянию, вызванному гиперчувствительностью иммунной системы к веществу (аллергену) в окружающей среде. Аллергии включают, без ограничений, аллергическую астму, сенную лихорадку, атопический дерматит, хроническую крапивницу, пищевую аллергию, аллергию на перхоть домашних животных и аллергию на пыльцу. Симптомы аллергии могут включать, но не ограничиваются ими, крапивницу (например, сыпь), ангионевротический отек, ринит, астму, рвоту, чихание, насморк, одышку, воспаление носовых пазух, слезотечение, хрипы, бронхоспазм, снижение максимальной скорости выдоха (МСВ), желудочно-кишечные расстройства, покраснение, опухшие губы, опухший язык, снижение артериального давления, анафилаксию и дисфункцию/недостаточность органов. В одном варианте воплощения изобретения аллергия представляет собой анафилактическую аллергию, которая является тяжелой формой аллергии, которая может вызвать смерть. Симптомы анафилаксии могут включать, помимо прочего, сыпь, отек горла или языка, отек дыхательных путей, одышку, рвоту, головокружение, низкое кровяное давление и т.д.

Термин "аллерген" в контексте настоящего описания включает любое вещество, химическое вещество, частицу или композицию, которые способны стимулировать аллергическую реакцию у восприимчивого человека. Аллергены могут содержаться в пищевых продуктах или происходить из них, например, в таких продуктах, как: молочные продукты (например, коровье молоко), яйца, сельдерей, кунжут,

пшеница, соя, рыба, моллюски, сахара (например, сахара, присутствующие в мясе, такие как альфа-галактоза), арахис, другие бобовые (например, фасоль, горох, соя и т.д.) и древесные орехи. В качестве альтернативы, аллерген может содержаться в непищевом объекте или происходить из него, например, таком как пыль (например, содержащая пылевого клеща), пыльца, яд насекомых (например, яд пчел, ос, комаров, огненных муравьев и т.д.), плесень, мех животных, клетки кожи животных, шерсть, латекс, металлы (например, никель), бытовые чистящие средства, моющие средства, лекарства, косметика (например, парфюмерия и т.д.), лекарства (например, пенициллин, сульфаниламиды, салицилат и т.д.), терапевтические моноклональные антитела (например, цетуксимаб), амброзия, трава и береза. Примерные аллергены пыльцы включают, например, пыльцу деревьев, такую как пыльца березы, пыльца кедра, пыльца дуба, пыльца ольхи, пыльца граба, пыльца конского каштана, пыльца ивы, пыльца тополя, пыльца подорожника, пыльца липы, пыльца оливы, пыльца можжевельника Эш и пыльца *Alstonia scholaris*.

Термин "антигенсвязывающая молекула" включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, включая, например, биспецифические антитела.

Термин "антитело" в контексте настоящего описания означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается с конкретным антигеном (например, FcεR1α или CD3) или взаимодействует с ним. Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидных цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначаемую здесь как HCVR или V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи включает три домена: C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2 и C<sub>H</sub>3. Каждая легкая цепь включает переменную область легкой цепи (сокращенно LCVR или V<sub>L</sub>) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи включает один домен (C<sub>L</sub>1). Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут далее быть подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вкраплениями областей, которые являются более консервативными, называемых каркасными областями (FR). Каждая V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца до карбокси-конца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. В различных вариантах воплощения изобретения FR антитела анти-FcεR1α или антитела против CD3 (или его антигенсвязывающей части) могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Аминокислотная консенсусная последовательность может быть определена на основе параллельных анализов двух или более CDR.

Термин "антитело" в данном контексте также включает антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антитела. Термин "антигенсвязывающая часть" антитела, "антигенсвязывающий фрагмент" антитела и т.п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативно, синтетический или созданный с помощью генной инженерии полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое расщепление или методики рекомбинантной генной инженерии, включающие манипулирование и экспрессию ДНК, кодирующей вариабельные и необязательные константные домены антитела. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаг-антитело), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована и обработана химически или с использованием способов молекулярной биологии, например, для упорядочивания одного или более переменных и/или константных доменов в подходящую конфигурацию или для введения кодонов, создания остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) фрагменты F(ab')<sub>2</sub>; (iii) фрагменты Fd; (iv) фрагменты Fv; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) фрагменты dAb; и (vii) минимальные единицы распознавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гипервариабельную область антитела (например, изолированную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3), или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как доменно-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, три-тела, тет-тела, мини-тела, нанотела (например, моновалентные нанотела, двухвалентные нанотела и т.д.), мелкомолекулярные иммунофармацевтические препараты (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также охватываются выражением "антигенсвязывающий фрагмент", используемым в данном документе.

Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или любой аминокислотный состав и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, которая находится рядом с одной или более каркасными последовательностями или находится в рамке с ними. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V<sub>H</sub>, связанный с доменом V<sub>L</sub>, домены V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> могут располагаться относительно друг друга в любом подхо-

дядшем порядке. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры  $V_H-V_H$ ,  $V_H-V_L$  или  $V_L-V_L$ . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен  $V_H$  или  $V_L$ .

В некоторых вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один вариабельный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела по настоящему изобретению, включают: (i)  $V_H-C_H1$ ; (ii)  $V_H-C_H2$ ; (iii)  $V_H-C_H3$ ; (iv)  $V_H-C_H1-C_H2$ ; (v)  $V_H-C_H1-C_H2-C_H3$ ; (vi)  $V_H-C_H2-C_H3$ ; (vii)  $V_H-C_L$ ; (viii)  $V_L-C_H1$ ; (ix)  $V_L-C_H2$ ; (x)  $V_L-C_H3$ ; (xi)  $V_L-C_H1-C_H2$ ; (xii)  $V_L-C_H1-C_H2-C_H3$ ; (xiii)  $V_L-C_H2-C_H3$ ; и (xiv)  $V_L-C_L$ . В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из примерных конфигураций, перечисленных выше, вариабельные и константные домены могут быть либо напрямую связаны друг с другом, либо могут быть связаны посредством полной или частичной шарнирной или линкерной области. Шарнирная область может состоять по меньшей мере из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, которые приводят к гибкой или полугибкой связи между соседними вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Более того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по настоящему изобретению может включать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций вариабельного и константного доменов, перечисленных выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами  $V_H$  или  $V_L$  (например, посредством дисульфидной связи(ей)).

Как и в случае с полными молекулами антител, антигенсвязывающие фрагменты могут быть моноспецифическими или мультиспецифическими (например, биспецифическими). Мультиспецифический антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере два разных вариабельных домена, где каждый вариабельный домен способен специфически связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на одном и том же антигене. Любой формат мультиспецифического антитела, включая иллюстративные форматы биспецифического антитела, раскрытые в данном документе, можно адаптировать для использования в контексте антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению с использованием стандартных способов, имеющихся в данной области техники.

Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) или антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). "Комплемент-зависимая цитотоксичность" (КЗЦ) относится к лизису антиген-экспрессирующих клеток антителом по изобретению в присутствии комплемента. "Антителозависимая клеточная цитотоксичность" (АЗКЦ) относится к клеточно-опосредованной реакции, в которой неспецифические цитотоксические клетки, которые экспрессируют Fc-рецепторы (FcR) (например, естественные киллерные (NK) клетки, нейтрофилы и макрофаги) узнают связанное антитело на клетке-мишени и, таким образом, приводят к лизису клетки-мишени. КЗЦ и АЗКЦ могут быть измерены с применением хорошо известных анализов, имеющихся в данной области техники. (См., например, Патент США №№ 5500362 и 5821337 и Clynes et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и опосредовать клеточно-зависимую цитотоксичность. Таким образом, изотип антитела может быть выбран на основе того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

В некоторых вариантах воплощения изобретения моноспецифические антитела анти-FcεR1α или биспецифические антитела анти-FcεR1α/анти-CD3 по настоящему изобретению являются человеческими антителами. Термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, предназначен для включения антител, имеющих вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин "человеческое антитело", используемый в данном документе, не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты к каркасным последовательностям человека.

Антитела по изобретению в некоторых вариантах воплощения изобретения могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. Термин "рекомбинантное человеческое антитело", используемый здесь, предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с помощью рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описаны ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (описанной ниже), антитела, выделенные от животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (см, например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека

с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах воплощения изобретения такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используются животные, трансгенные по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей  $V_H$  и  $V_L$  рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей  $V_H$  и  $V_L$  зародышевой линии человека и относятся к ним, могут не существовать в природе в репертуаре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, которые связаны с гетерогенностью шарнира. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию приблизительно 150-160 кДа, в которой димеры удерживаются вместе дисульфидной связью межцепочечной тяжелой цепи. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями, и образуется молекула около 75-80 кДа, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепей (полуантитело). Эти формы было чрезвычайно трудно разделить даже после аффинной очистки.

Частота появления второй формы в различных изотипах интактного IgG обусловлена, без ограничений, структурными различиями, связанными с изотипом шарнирной области антитела. Простая аминокислотная замена в шарнирной области шарнира человеческого IgG4 может значительно снизить появление второй формы (Angal et al. (1993) *Molecular Immunology* 30: 105) до уровней, обычно наблюдаемых при использовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение охватывает антитела, имеющие одну или более мутаций в шарнирной области, области  $C_H2$  или  $C_H3$ , которые могут быть желательны, например, при получении, для повышения выхода желаемой формы антитела.

Антитела по изобретению могут быть изолированными антителами. "Изолированное антитело" в контексте настоящего описания означает антитело, которое было идентифицировано и отделено и/или выделено, по меньшей мере, из одного компонента его естественного окружения. Например, антитело, которое было отделено или удалено по меньшей мере из одного компонента организма, или из ткани или клетки, в которых антитело существует или вырабатывается в природе, является "изолированным антителом" для целей настоящего изобретения. Изолированное антитело также включает антитело *in situ* в рекомбинантной клетке. Изолированные антитела - это антитела, прошедшие по меньшей мере одну стадию очистки или выделения. Согласно некоторым вариантам воплощения изобретения изолированное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

Настоящее изобретение также включает одно-плечевые антитела, которые связывают FcεR1α. Используемый здесь термин "одно-плечевое антитело" означает антигенсвязывающую молекулу, содержащую одну тяжелую цепь антитела и одну легкую цепь антитела. Одно-плечевые антитела по настоящему изобретению могут содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1.

Описанные здесь антитела анти-FcεR1α или анти-FcεR1α/анти-CD3 могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области и/или областях CDR вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, имеющимися, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или участках CDR мутированы до соответствующего остатка (остатков) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии человека, или до консервативной аминокислотной замены соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе называются вместе как "мутации зародышевой линии"). Обычный специалист в данной области техники, начиная с последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах воплощения изобретения все остатки каркасной области и/или CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутированы обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой произошло антитело. В других вариантах воплощения изобретения только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнаруженные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах воплощения изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR мутированы до соответствующего остатка (ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последователь-

ности зародышевой линии, из которой антитело было получено изначально). Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной области и/или участков CDR, например, где определенные отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются из исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или видоизменяются до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким общим способом, охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает антитела анти-FcεR1α или анти-FcεR1α/анти-CD3, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в данном документе, с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела анти-FcεR1α или анти-FcεR1α/анти-CD3, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в табл. 1 и 3 в данном документе.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в варибельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп - это эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать части сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда относится к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, означает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими нуклеотидными вставками или делециями с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности по меньшей мере около 95%, а более предпочтительно по меньшей мере около 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью любого хорошо известного алгоритма идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или Gap, как описано ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, имеющая существенную идентичность с эталонной молекулой нуклеиновой кислоты, может в некоторых случаях кодировать полипептид, имеющий такую же или по существу аналогичную аминокислотную последовательность, что и полипептид, кодируемый эталонной молекулой нуклеиновой кислоты.

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пробелов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, даже более предпочтительно идентичность последовательности по меньшей мере 98 или 99%. Предпочтительно, чтобы неидентичные положения остатков различались консервативными аминокислотными заменами. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства может быть увеличена для корректировки консервативного характера замены. Средства для выполнения этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См, например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331, включенный здесь посредством ссылки. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативная замена - это любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой Gonnet et al.

(1992) Science 256: 1443-1445, включенном в данный документ посредством ссылки. "Умеренно консервативная" замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя измерения сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См., например, GCG Version 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, программы в GCG версии 6.1., используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 и Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-402, каждый включен в данный документ посредством ссылки.

Мутации зародышевой линии.

Антитела против FcεR1α и/или против CD3, раскрытые в настоящем документе, содержат одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных и/или CDR-областях переменных доменов тяжелой цепи по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые происходят из любой из аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или областях CDR мутированы в соответствующий остаток (остатки) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток (остатки) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка (остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности называются в данном документе вместе как "мутации зародышевой линии") и обладают желаемыми свойствами связывания с антигеном FcεR1α или CD3, например, слабое связывание анти-CD3-антител с CD3 или отсутствие детектируемого связывания. Несколько таких примерных антител, распознающих FcεR1α, описаны в табл. 1. Несколько таких примерных антител, распознающих CD3, описаны в табл. 3.

Кроме того, антитела по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной области и/или областей CDR, например, когда определенные отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохраняются или мутируются до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно тестировать на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, слабая или пониженная аффинность связывания, улучшенные или усиленные фармакокинетические свойства, пониженная иммуногенность и т.д. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, полученные таким образом с учетом руководства настоящего описания изобретения, охвачены настоящим изобретением.

Настоящее изобретение также включает антитела против FcεR1α, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, описанных в настоящем документе, с одной или более консервативными заменами. Например, настоящее изобретение включает антитела к CD3, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, приведенных в табл. 1 в данном документе. Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению содержат одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены отдельные антигенсвязывающие домены при сохранении или улучшении желаемого связывания с FcεR1α или CD3, например, слабого связывания анти-CD3-антител с антигеном CD3 или отсутствия его детектирования. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен дру-

гим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка, то есть аминокислотная замена поддерживает или улучшает желаемую аффинность связывания в случае молекул, связывающих анти-FcεR1α и/или анти-CD3, например, слабое или не определяемое связывание антител против CD3 с антигеном CD3. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат, и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытое в Gonnet et al. (1992) *Science* 256: 1443-1445. "Умеренно консервативная" замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, при сохранении или улучшении желаемого свойства антигена FcεR1α и/или CD3. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пробелов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичности последовательности. Предпочтительно, чтобы неидентичные положения остатков различались консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства может быть увеличен для корректировки консервативного характера замены. Способы выполнения этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331.

Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности, используя измерения сходства, относящиеся к различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См, например, GCG Version 6.1. Последовательности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, программы в GCG Version 6.1., используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См, например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402.

После получения антигенсвязывающие домены, содержащие одну или более мутаций зародышевой линии, тестируют на снижение аффинности связывания с использованием одного или более анализов *in vitro*. Хотя антитела, которые распознают конкретный антиген, обычно подвергаются скринингу для их цели путем тестирования на высокую (то есть сильную) аффинность связывания с антигеном, антитела по настоящему изобретению демонстрируют слабое связывание или отсутствие детектируемого связывания. Биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных этим общим способом, также охватываются настоящим изобретением и, как обнаружено, являются полезными в качестве терапии аллергии, обусловленной авидностью.

С помощью описанных здесь способов могут быть получены неожиданные преимущества, например улучшенные фармакокинетические свойства и низкая токсичность для пациента.

Связывающие свойства антител.

Используемый в данном документе термин "связывание" в контексте связывания антитела, иммуноглобулина, связывающего антитело фрагмента или Fc-содержащего белка, например, с заранее определенным антигеном, таким как белок клеточной поверхности или его фрагментом, как правило, отно-

сится к взаимодействию или ассоциации между минимум двумя объектами или молекулярными структурами, такому как взаимодействие антитело-антиген.

Например, аффинность связывания обычно соответствует значению  $K_D$  около  $10^{-6}$ М или менее, например около  $10^{-7}$ М или менее, например около  $10^{-8}$ М или менее, например около  $10^{-9}$ М или менее при определении, например, с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе ВІАscore 3000 с использованием антигена в качестве лиганда и антитела, Ig, связывающего антитело фрагмента или Fc-содержащего белка в качестве аналита (или антилиганда). Также обычно используются стратегии связывания на основе клеток, такие как анализ связывания с сортировкой флуоресцентно-активированных клеток (FACS), и данные FACS хорошо коррелируют с другими способами, такими как конкурентное связывание радиолигандов и SPR (Benedict, CA, J Immunol Methods. 1997, 201(2):223-31; Geuijen, CA, et al. J Immunol Methods. 2005, 302(1-2):68-77).

Соответственно, антитело или антигенсвязывающий белок по изобретению связывается с заранее определенным антигеном или молекулой (рецептором) на клеточной поверхности, имеющей сродство, соответствующее значению  $K_D$ , которое по меньшей мере в десять раз ниже, чем его сродство к связыванию с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеин). Согласно настоящему изобретению аффинность антитела, соответствующего значению  $K_D$ , которое равно или менее чем в десять раз ниже, чем у неспецифического антигена, может рассматриваться как недетектируемое связывание, однако такое антитело может быть спарено со вторым антигенсвязывающим плечом для продукции биспецифического антитела по изобретению.

Термин " $K_D$ " (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе диссоциации связывания антитела или связывающего антитело фрагмента с антигеном. Существует обратная зависимость между  $K_D$  и сродством связывания, поэтому чем меньше значение  $K_D$ , тем выше, то есть сильнее, аффинность. Таким образом, термин "более высокая аффинность" или "более сильная аффинность" относятся к большей способности образовывать взаимодействие и, следовательно, к меньшему значению  $K_D$ , и, наоборот, термин "более низкая аффинность" или "более слабая аффинность" относятся к меньшей способности формировать взаимодействие и, следовательно, большему значению  $K_D$ . В некоторых случаях более высокая аффинность связывания (или  $K_D$ ) конкретной молекулы (например, антитела) с ее интерактивной партнерской молекулой (например, антигеном X) по сравнению со связывающей аффинностью молекулы (например, антитела) с другой интерактивной партнерской молекулой (например, антигеном Y), в зависимости от обстоятельств, может быть выражено как отношение аффинности связывания, определяемое делением большего значения  $K_D$  (более низкая или более слабая аффинность) на меньшее значение  $K_D$  (более высокое или более сильное сродство), например выраженное как 5-кратная или 10-кратная большая аффинность связывания.

Термин " $k_d$ " (с-1 или 1/с) относится к константе скорости диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или к константе скорости диссоциации антитела или связывающего антитело фрагмента. Указанное значение также называется значением  $k_{off}$ .

Термин " $k_a$ " (М-1 x sec-1 или 1/М) относится к константе скорости ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или константе скорости ассоциации антитела или связывающего антитело фрагмента.

Термин " $K_A$ " (М-1 или 1/М) относится к равновесной константе ассоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген или равновесной константе ассоциации антитела или связывающего антитело фрагмента. Равновесная константа ассоциации получается делением  $k_a$  на  $k_d$ .

Термин "EC50" или "EC<sub>50</sub>" относится к половине максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которая вызывает ответ на полпути между исходным уровнем и максимумом после определенного времени воздействия. EC<sub>50</sub>, по существу, представляет концентрацию антитела, при которой наблюдается 50% его максимального эффекта. В некоторых вариантах воплощения изобретения значение EC<sub>50</sub> равно концентрации антитела по изобретению, которая дает половину максимального связывания с клетками, экспрессирующими CD3 или связанный с аллергией антиген, как определено, например, с помощью анализа связывания FACS. Таким образом, уменьшенное или более слабое связывание наблюдается при повышенном EC<sub>50</sub> или половине максимального значения эффективной концентрации.

В одном варианте воплощения изобретения снижение связывания можно определить как повышенную EC<sub>50</sub> концентрации антитела, которая делает возможным связывание с половинным максимальным количеством клеток-мишеней.

В другом варианте воплощения изобретения значение EC<sub>50</sub> представляет концентрацию антитела по изобретению, которая вызывает половину максимального истощения клеток-мишеней цитотоксической активностью Т-клеток. Таким образом, повышенная цитотоксическая активность (например, опосредованное Т-клетками уничтожение базофилов) наблюдается при снижении EC<sub>50</sub> или половине максимального значения эффективной концентрации.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы.

Антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими или

мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные для более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol. 22: 238-244. Моноспецифические антитела анти-FcεR1α или биспецифические антитела анти-FcεR1α/анти-CD3 по настоящему изобретению могут быть связаны или коэкспрессированы с другой функциональной молекулой, например, с другим пептидом или белком. Например, антитело или его фрагмент могут быть функционально связаны (например, путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более других молекулярных объектов, таких как другое антитело или фрагмент антитела, с образованием биспецифического или мультиспецифического антитела со второй или дополнительной специфичностью связывания.

Использование выражения "антитело анти-CD3" или "антитело анти-FcεR1α" в данном документе предназначено для включения как моноспецифических антител анти-CD3 или анти-FcεR1α, так и биспецифических антител, содержащих CD3-связывающее плечо и FcεR1α-связывающее плечо. Таким образом, настоящее изобретение включает биспецифические антитела, в которых одно плечо иммуноглобулина связывает человеческий CD3, а другое плечо иммуноглобулина специфично для человеческого FcεR1α. CD3-связывающее плечо может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 3 в данном документе.

В определенных вариантах воплощения изобретения CD3-связывающее плечо связывается с человеческим CD3 и индуцирует активацию человеческих Т-клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения CD3-связывающее плечо слабо связывается с человеческим CD3 и индуцирует активацию человеческих Т-клеток. В других вариантах воплощения изобретения CD3-связывающее плечо слабо связывается с человеческим CD3 и индуцирует удаление тучных клеток и/или базофилов в контексте биспецифического или мультиспецифического антитела. В других вариантах воплощения изобретения CD3-связывающее плечо слабо ассоциировано или связано с человеческим CD3, однако взаимодействие связывания не обнаруживается с помощью анализов *in vitro*, известных в данной области техники. Связывающее плечо FcεR1α может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, как указано в табл. 1 в данном документе.

Согласно некоторым примерным вариантам воплощения, настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и FcεR1α. Такие молекулы могут называться в данном документе, например, "анти-CD3/анти-FcεR1α", или "анти-CD3xFcεR1α", или "анти-FcεR1α/анти-CD3", или "анти-FcεR1αxCD3", или "CD3xFcεR1α" биспецифические молекулы, или биспецифические молекулы "FcεR1αxCD3", или может использоваться другая подобная терминология (например, анти-FcεR1α x анти-CD3).

Термин "FcεR1α", используемый в данном документе, относится к белку FcεR1α человека, если не указано, что он происходит от не относящихся к человеку видов (например, "мышинный FcεR1α", "обезьяний FcεR1α" и т.д.). Белок FcεR1α человека имеет аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 63.

Вышеупомянутые биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые специфически связывают CD3 и FcεR1α, могут содержать антигенсвязывающую молекулу против CD3, которая связывается с CD3 со слабой аффинностью связывания, такой как  $K_D$  более около 40 нМ, как измерено с помощью анализа аффинного связывания *in vitro*.

В данном контексте выражение "антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий или состоящий по меньшей мере из одной определяющей комплементарности области (CDR), которая отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными CDR и/или каркасными областями (FR), специфически связываются с конкретным антигеном. В некоторых вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающая молекула представляет собой антитело или фрагмент антитела, как эти термин определены в другом месте в настоящем документе.

Используемое в данном документе выражение "биспецифическая антигенсвязывающая молекула" означает белок, полипептид или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен. Каждый антигенсвязывающий домен в биспецифической антигенсвязывающей молекуле содержит по меньшей мере одну CDR, которая одна или в комбинации с одной или более дополнительными CDR и/или FR специфически связывается с конкретным антигеном. В контексте настоящего изобретения первый антигенсвязывающий домен специфически связывает первый антиген (например, CD3), а второй антигенсвязывающий домен специфически связывает второй, отдельный антиген (например, FcεR1α).

В некоторых примерных вариантах воплощения настоящего изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифическое антитело. Каждый антигенсвязывающий домен биспецифического антитела включает варибельный домен тяжелой цепи (HCVR) и варибельный домен легкой цепи (LCVR). В контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, держащей первый и второй антигенсвязывающий домен (например, биспецифическое антитело), CDR первого антигенсвязывающего домена могут быть обозначены префиксом "A1", а CDR второго антиген-

связывающего домена могут быть обозначены префиксом "A2". Таким образом, CDR первого антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе A1-HCDR1, A1-HCDR2 и A1-HCDR3; и CDR второго антигенсвязывающего домена могут называться в данном документе A2-HCDR1, A2-HCDR2 и A2-HCDR3.

Первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен могут быть прямо или косвенно связаны друг с другом с образованием биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. Альтернативно, первый антигенсвязывающий домен и второй антигенсвязывающий домен, каждый, могут быть связаны с отдельным мультимеризующим доменом. Ассоциация одного мультимеризующего домена с другим мультимеризующим доменом облегчает ассоциацию между двумя антигенсвязывающими доменами, тем самым образуя биспецифическую антигенсвязывающую молекулу. Используемый здесь термин "мультимеризующий домен" означает любую макромолекулу, белок, полипептид, пептид или аминокислоту, которая имеет способность связываться со вторым мультимеризующимся доменом такой же или подобной структуры или состава. Например, мультимеризующий домен может представлять собой полипептид, содержащий домен C<sub>H</sub>3 иммуноглобулина. Неограничивающим примером мультимеризующего компонента является Fc-часть иммуноглобулина (содержащая домен C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3), например, Fc-домен IgG, выбранный из изоформ IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, а также любых аллотипов в каждой группе изоформы.

Биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению обычно содержат два мультимеризующих домена, например, два домена Fc, каждый из которых индивидуально является частью отдельной тяжелой цепи антитела. Первый и второй мультимеризующие домены могут иметь один и тот же изоформ IgG, такой как, например, IgG1/IgG1, IgG2/IgG2 и IgG4/IgG4. В качестве альтернативы, первый и второй мультимеризующие домены могут иметь разные изоформы IgG, такие как, например, IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 и т.д.

В определенных вариантах воплощения изобретения мультимеризующий домен представляет собой Fc-фрагмент или аминокислотную последовательность длиной от 1 до около 200 аминокислот, содержащую по меньшей мере один остаток цистеина. В других вариантах воплощения изобретения мультимеризующий домен представляет собой остаток цистеина или короткий цистеинсодержащий пептид. Другие мультимеризующие домены включают пептиды или полипептиды, содержащие или состоящие из лейциновой молнии, мотива спираль-петля или мотива суперспирали.

Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению можно использовать любой формат или технологию биспецифических антител. Например, антитело или его фрагмент, обладающий первой специфичностью связывания антигена, может быть функционально связан (например, посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или более других молекулярных объектов, таких как другое антитело или фрагмент антитела, имеющее вторую антигенсвязывающую специфичность, для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы. Конкретные иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают, без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слияния IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, Quadroma, выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общая легкая цепь с выступами-во-впадины и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую застежку-молнию, Duobody, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и биспецифические форматы Mab<sup>2</sup> (для обзора вышеупомянутых форматов см., например, Klein et al. 2012, mAbs 4: 6, 1-11 и цитируемые ссылки).

В контексте биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению мультимеризующие домены, например, домены Fc, могут содержать одно или более аминокислотных изменений (например, вставки, делеции или замены) по сравнению с доменами дикого типа встречающейся в природе версии домена Fc. Например, изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие одну или более модификаций в домене Fc, что приводит к модифицированному домену Fc, имеющему модифицированное связывающее взаимодействие (например, усиленное или уменьшенное) между Fc и Fc<sub>Rn</sub>. В одном варианте воплощения изобретения биспецифическая антигенсвязывающая молекула включает модификацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3, при этом модификация увеличивает сродство домена Fc к Fc<sub>Rn</sub> в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от около 5,5 до около 6,0). Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в положении 250 и/или 428; или модификацию в положении 307 или 308 (например, F или P) и 434. В одном варианте воплощения изобретения модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содер-

жащие первый домен  $C_{H3}$  и второй домен  $C_{H3}$  Ig, где первый и второй домены Ig  $C_{H3}$  отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где по меньшей мере одно аминокислотное различие снижает связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, не имеющим аминокислотного различия. В одном варианте воплощения изобретения первый домен Ig  $C_{H3}$  связывает белок А, а второй домен Ig  $C_{H3}$  содержит мутацию, которая снижает или отменяет связывание белка А, такую как модификация H95R (по нумерации экзонов IMGT; H435R по нумерации EU). Второй  $C_{H3}$  может дополнительно содержать модификацию Y96F (от IMGT; Y436F от EU). См., например, Патент США № 8586713. Дополнительные модификации, которые можно найти во втором  $C_{H3}$ , включают: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (по IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I по EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I по EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (по IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I по EU) в случае антител IgG4.

В определенных вариантах воплощения изобретения домен Fc может быть химерным, объединяя последовательности Fc, полученные из более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, химерный домен Fc может включать часть или всю последовательность  $C_{H2}$ , полученную из области  $C_{H2}$  человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, и часть или всю последовательность  $C_{H3}$ , полученную из человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Химерный домен Fc может также содержать химерный шарнирный участок. Например, химерный шарнир может содержать последовательность "верхнего шарнира", полученную из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в сочетании с последовательностью "нижнего шарнира", полученной из шарнирного участка человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. Конкретный пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, включает от N- до C-конца: [IgG4  $C_{H1}$ ]-[верхний шарнир IgG4]-[нижний шарнир IgG2]-[IgG4  $C_{H2}$ ]-[IgG4  $C_{H3}$ ]. Другой пример химерного домена Fc, который может быть включен в любую из антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, включает от N- до C-конца: [IgG1  $C_{H1}$ ]-[верхний шарнир IgG1]-[нижний шарнир IgG2]-[IgG4  $C_{H2}$ ]-[IgG1  $C_{H3}$ ]. Эти и другие примеры химерных Fc-доменов, которые могут быть включены в любую из антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, описаны в Публикации США 2014/0243504, опубликованной 28 августа 2014 г., которая полностью включена в настоящий документ. Химерные домены Fc, имеющие эти общие структурные устройства, и их варианты могут иметь измененное связывание рецептора Fc, что, в свою очередь, влияет на эффекторную функцию Fc.

В определенных вариантах воплощения изобретения предлагается тяжелая цепь антитела, в которой участок константной области тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% идентичную любой из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 56. В определенных вариантах воплощения изобретения область константной области тяжелой цепи (CH) содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 56.

Варианты последовательностей.

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасных областях и/или CDR областях переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых произошли отдельные антигенсвязывающие домены. Такие мутации можно легко установить путем сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, имеющимися, например, в общедоступных базах данных последовательностей антител. Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению могут содержать антигенсвязывающие домены, которые происходят из любой из примерных аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем документе, где одна или более аминокислот в одной или более каркасных областях и/или CDR областях мутированы в соответствующие остаток(и) последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или в соответствующий остаток(и) другой последовательности зародышевой линии человека, или в консервативную аминокислотную замену соответствующего остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности упоминаются здесь все вместе как "мутации зародышевой линии"). Обычный специалист в данной области техники, начиная с последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в данном документе, может легко получить многочисленные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В некоторых вариантах воплощения изобретения все остатки каркасной области и/или CDR в доменах  $V_H$  и/или  $V_L$  мутированы обратно до остатков, обнаруженных в исходной последовательности зародышевой линии, из которой первоначально был получен антигенсвязывающий домен. В других вариантах воплощения изобретения только определенные остатки мутируют обратно в исходную последовательность зародышевой линии, например, только мутированные остатки, обнаруженные в первых 8 аминокислотах FR1 или в последних 8 аминокислотах FR4, или только мутированные остатки, обнару-

женные в CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах воплощения изобретения один или более остатков каркасной области и/или CDR остаток мутированы до соответствующего остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой был первоначально получен антигенсвязывающий домен). Кроме того, антигенсвязывающие домены могут содержать любую комбинацию двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасной области и/или областей CDR, например, где определенные отдельные остатки мутированы до соответствующего остатка конкретной последовательности зародышевой линии, в то время как некоторые другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии сохраняются или видоизменяются до соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антигенсвязывающие домены, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, могут быть легко протестированы на одно или более желаемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в зависимости от обстоятельств), пониженная иммуногенность и т.д. Настоящим изобретением охватываются биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие один или более антигенсвязывающих доменов, полученных таким общим способом.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, в которых один или оба антигенсвязывающих домена содержат варианты любой из раскрытых здесь аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, имеющих одну или более консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен, имеющий аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативных аминокислотных замен относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе. "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группу) с аналогичными химическими свойствами (например, зарядом или гидрофобностью). В целом, консервативная аминокислотная замена существенно не изменяет функциональные свойства белка. Примеры групп аминокислот, которые имеют боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают (1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; (2) алифатические гидроксильные боковые цепи: серин и треонин; (3) боковые цепи, содержащие амид: аспарагин и глутамин; (4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; (5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; (6) кислотные боковые цепи: аспартат и глутамат и (7) серосодержащие боковые цепи - цистеин и метионин. Предпочтительными консервативными группами замены аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. Альтернативно, консервативной заменой является любое изменение, имеющее положительное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet et al. (1992) Science 256: 1443-1445, включенный в данный документ в качестве ссылки. "Умеренно консервативная" замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающий домен с аминокислотной последовательностью HCVR, LCVR и/или CDR, которая по существу идентична любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе. Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", когда относится к аминокислотной последовательности, означает, что две аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием весов пробелов по умолчанию, имеют по меньшей мере 95% идентичность последовательности, даже более предпочтительно по меньшей мере 98 или 99% идентичность последовательности. Предпочтительно, чтобы неидентичные положения остатков различались консервативными аминокислотными заменами. В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательностей или степень сходства может быть увеличена для корректировки консервативного характера замены. Средства для выполнения этой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331, включенный в данный документ в качестве ссылки.

Сходство последовательностей полипептидов, которое также называется идентичностью последовательностей, обычно измеряется с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет аналогичные последовательности с использованием показателей сходства, присвоенных различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные аминокислотные замены. Например, программное обеспечение GCG содержит такие программы, как Gap и Bestfit, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей между близкородственными полипептидами, такими как гомологичные полипептиды из разных видов организмов или между белком дикого типа и его мутантом. См, например, GCG Version 6.1. Последова-

тельности полипептидов также можно сравнивать с помощью FASTA, программы в GCG версии 6.1., используя параметры по умолчанию или рекомендуемые параметры. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между запросной и поисковой последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности изобретения с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, особенно BLASTP или TBLASTN, с использованием параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402, каждый включен в данный документ посредством ссылки.

рН-зависимое связывание.

Настоящее изобретение включает антитела против FcεR1α и биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α с рН-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело против FcεR1α по настоящему изобретению может проявлять пониженное связывание с FcεR1α при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Альтернативно, антитела против FcεR1α по изобретению могут проявлять повышенное связывание с FcεR1α при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение "кислый рН" включает значения рН менее около 6,2, например, около 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или менее. Используемое здесь выражение "нейтральный рН" означает рН от около 7,0 до около 7,4. Выражение "нейтральный рН" включает значения рН около 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

В некоторых случаях "пониженное связывание ... при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" выражается в терминах отношения значения  $K_D$  связывания антитела, с его антигеном при кислом рН, к значению  $K_D$  связывания антитела со своим антигеном при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как проявляющее "пониженное связывание с FcεR1α при кислом рН по сравнению с нейтральным рН" для целей настоящего изобретения, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент проявляет кислый/нейтральный коэффициент  $K_D$  около 3,0 или больше. В определенных примерных вариантах воплощения изобретения кислотное/нейтральное отношение  $K_D$  для антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению может составлять около 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или выше.

Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител на сниженное (или усиленное) связывание с конкретным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на аминокислотном уровне могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) остатком гистидина можно получить антитело с пониженным связыванием антигена при кислом рН по сравнению с нейтральным рН.

Антитела, содержащие варианты Fc.

В соответствии с некоторыми вариантами воплощения настоящего изобретения предусмотрены антитела против FcεR1α и биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3 /анти-FcεR1α, включающие домен Fc, содержащий одну или более мутаций, которые усиливают или уменьшают связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Например, настоящее изобретение включает антитела, содержащие мутацию в области C<sub>H</sub>2 или C<sub>H</sub>3 домена Fc, причем мутация(и) увеличивает сродство домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где рН колеблется от около 5,5 до около 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или модификацию в позиции 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K) и/или 434 (например, H/F или Y); или модификацию в позиции 250 и/или 428; или модификацию в позиции 307 и/или 308 (например, F или P) и 434. В одном варианте воплощения изобретения модификация включает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); модификацию 307 и/или модификацию 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение включает антитела против FcεR1α и биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, содержащие домен Fc, включающий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из: 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); и 433K и 434F (например, H433K и N434F). В рамках настоящего изобретения рассматриваются все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций домена Fc и других мутаций в переменных доменах антител, раскрытых в настоящем документе.

Биологические характеристики антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Согласно некоторым вариантам воплощения, настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые связывают FcεR1α человека (например, при 25°C) с  $K_D$  менее около 303 нМ или связывают FcεR1α яванского макака (например, при 25°C) с  $K_D$  менее около 467 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения изобретения антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению связывают FcεR1α человека или яванского макака с  $K_D$  менее около 400 нМ, менее около 500 нМ, менее около 450 нМ, менее около 400 нМ, менее около 350 нМ, менее около 300 нМ, менее около 250 нМ, менее около 200 нМ, менее около 150 нМ или менее около 100 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе (например, формат захвата mAb или захвата антигена) или по существу аналогичного анализа. Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела, которые связывают FcεR1α человека или яванского макака с  $K_D$  менее около 467 нМ, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе (например, формат захвата mAb или захвата антигена) или, по существу, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают человеческий FcεR1α с диссоциативным периодом полураспада ( $t^{1/2}$ ) более чем около 0,2 мин или более чем около 0,5 мин, или связывают FcεR1α яванского макака с диссоциативным периодом полужизни ( $t^{1/2}$ ) больше чем около 0,3 мин, или больше около 0,6 мин, как измерено поверхностным плазмонным резонансом при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или по существу аналогичного анализа. Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые связывают FcεR1α человека или яванского макака с  $K_D$  более около 0,54 мин или более около 1,1 мин, как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с использованием формата анализа, как определено в примере 3 в настоящем документе, или, по существу, аналогичного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с линиями клеток человека, которые экспрессируют FcεR1α человека или яванского макака (например, клетки НЕК293, сконструированные для экспрессии FcεR1α человека или яванского макака), как определено анализом обнаружения с помощью проточной цитометрии, как указано в примере 4, или, по существу, аналогичным анализом.

Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, которые проявляют одну или более характеристик, выбранных из группы, состоящей из: (а) связывания с FcεR1α, экспрессируемым на поверхности клетки, в отсутствие или в присутствии IgE (см., например, пример 4); (б) активации передачи сигналов CD3 человека в присутствии клеток, экспрессирующих FcεR1α (см., например, пример 5); (в) индукции опосредованного Т-клетками апоптоза клеток, экспрессирующих FcεR1α, *in vitro* (см., например, пример 6); (г) индукции опосредованного Т-клетками уничтожения базофилов в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) *in vitro* (см., например, пример 6); (д) блокирования индуцированной аллергеном дегрануляции тучных клеток (например, анафилаксии) у мышей, экспрессирующих человеческий FcεR1α (см., например, пример 7); и (е) истощения базофилов селезенки у мышей, экспрессирующих человеческий FcεR1α (см., например, пример 7).

Настоящее изобретение включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека с высокой аффинностью. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека со средней или низкой аффинностью, в зависимости от терапевтического контекста и конкретных желаемых свойств нацеливания. Настоящее изобретение также включает антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают CD3 человека без поддающейся измерению аффинности. Например, в контексте биспецифической антигенсвязывающей молекулы, где одно плечо связывает CD3, а другое плечо связывает антиген-мишень (например, FcεR1α), может быть желательным, чтобы антиген-связывающее плечо-мишень связывало антиген-мишень с высоким сродством, в то время как анти-CD3-плечо связывало CD3 только с умеренным или низким сродством или без сродства. Таким образом, может быть достигнуто предпочтительное нацеливание антигенсвязывающей молекулы на клетки, экспрессирующие целевой антиген, при одновременном предотвращении общего/нецелевого связывания CD3 и последующих связанных с ним побочных эффектов.

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы (например, биспецифические антитела), которые способны одновременно связываться с человеческим CD3 и человеческим FcεR1α. Плечо связывания, которое взаимодействует с клетками, экспрессирующими CD3, может иметь слабое или не определяемое связывание, как измерено в подходящем анализе связывания *in*

vitro. Степень, в которой биспецифическая антигенсвязывающая молекула связывает клетки, экспрессирующие CD3 и/или FcεR1α, может быть, оценена с помощью сортировки активируемых флуоресценцией клеток (FACS), как проиллюстрировано в примере 4 настоящего документа.

Например, настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые специфически связывают линии Т-клеток человека, которые экспрессируют CD3, но не экспрессируют FcεR1α, Т-клетки приматов (например, мононуклеарные клетки периферической крови яванского макака) [МКПК]) и/или клетки, экспрессирующие FcεR1α.

Настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека со слабой (то есть низкой) аффинностью или даже без детектируемой аффинности.

Настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые связывают CD3 обезьяны (яванского макака) со слабой (т.е. низкой) аффинностью или даже без детектируемой аффинности.

Настоящее изобретение включает антитела, антигенсвязывающие фрагменты и их биспецифические антитела, которые связывают CD3 человека и индуцируют активацию Т-клеток.

Настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, которые способны ингибировать аллергический ответ и/или истощать клетки, экспрессирующие FcεR1α, у субъекта (см., например, пример 7, при пассивной кожной анафилаксии (ПКА) или анализе на основе проточной цитометрии или аналогичных анализах). Например, в соответствии с некоторыми вариантами воплощения предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, при этом однократное введение 25 мг/кг биспецифической антигенсвязывающей молекулы субъекту вызывает уменьшение количества FcεR1α-экспрессирующих клеток у субъекта (например, количество базофилов селезенки значительно снижено).

Картирование эпитопа и связанные технологии.

Эпитоп на CD3 и/или FcεR1α, с которым связываются антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или более (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка CD3 или FcεR1α. Альтернативно, эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) CD3 или FcεR1α. Антитела по изобретению могут взаимодействовать с аминокислотами, содержащимися в одной цепи CD3 (например, CD3-эпсилон, CD3-дельта или CD3-гамма), или могут взаимодействовать с аминокислотами на двух или более разных цепях CD3. Термин "эпитоп" в контексте настоящего описания относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфическим сайтом связывания антигена в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Один антиген может иметь более одного эпитопа. Таким образом, разные антитела могут связываться с разными участками антигена и иметь разные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп продуцируется пространственно расположенными аминокислотами из разных сегментов линейной полипептидной цепи. Линейный эпитоп - это эпитоп, продуцируемый соседними аминокислотными остатками в полипептидной цепи. В определенных обстоятельствах эпитоп может включать части сахаридов, фосфорильные группы или сульфонильные группы на антигене.

Для определения того, "взаимодействует ли антигенсвязывающий домен антитела с одной или более аминокислот" в полипептиде или белке, можно использовать различные способы, известные обычным специалистам в данной области техники. Примеры способов включают, например, рутинный анализ перекрестного блокирования, такой как описанный в *Antibodies*, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY), мутационный анализ с аланиновым сканированием, анализ пептидных блоттингов (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248: 443-463) и анализ пептидного расщепления. Кроме того, можно использовать такие способы, как удаление эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9: 487-496). Другой способ, который может быть использован для идентификации аминокислот в полипептиде, с которым взаимодействует антигенсвязывающий домен антитела, - это обмен водорода/дейтерия, обнаруживаемый масс-спектрометрией. В общем, способ водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием интересующего белка с последующим связыванием антитела с меченным дейтерием белком. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы позволить обмену водород-дейтерий происходить на всех остатках, за исключением остатков, защищенных антителом (которые остаются меченными дейтерием). После диссоциации антитела целевой белок подвергается расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, тем самым выявляя меченные дейтерием остатки, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A. Для картирования эпитопа также может использоваться рентгеновская кристаллография комплекса антиген/антитело.

Настоящее изобретение также включает антитела против FcεR1α, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из конкретных примерных антител, описанных в данном документе (например,

антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 1 в данном документе). Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает антитела против FcεR1α, которые конкурируют за связывание с FcεR1α с любым из конкретных примерных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в табл. 1 в данном документе).

Настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает CD3 человека и/или CD3 яванского макака с низкой или определяемой аффинностью связывания, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает FcεR1α человека или яванского макака, где первый антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на CD3, что и любой из конкретных примерных CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или где второй антигенсвязывающий домен связывается с тем же эпитопом на FcεR1α, что и любой описанных здесь специфических примерных антигенсвязывающих доменов FcεR1α.

Аналогичным образом, настоящее изобретение также включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий CD3, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий FcεR1α, причем первый антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с CD3 с любым из конкретных примеров CD3-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе, и/или где второй антигенсвязывающий домен конкурирует за связывание с FcεR1α с любым из конкретных примеров FcεR1α-специфических антигенсвязывающих доменов, описанных в данном документе.

Используя стандартные способы, известные в данной области техники, можно легко определить, связывается ли конкретная антигенсвязывающая молекула (например, антитело) или ее антигенсвязывающий домен с тем же эпитопом, что и эталонная антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, или конкурирует с ней за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом на FcεR1α (или CD3), что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, эталонной биспецифической молекуле сначала позволяют связываться с белком FcεR1α (или белком CD3). Затем оценивается способность тестируемого антитела связываться с молекулой FcεR1α (или CD3). Если тестируемое антитело способно связываться с FcεR1α (или CD3) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с эпитопом FcεR1α (или CD3), отличным от эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулы. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой FcεR1α (или CD3) после насыщающего связывания с эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой, то тестируемое антитело может связываться с тем же эпитопом FcεR1α (или CD3) в качестве эпитопа, связанного эталонной биспецифической антигенсвязывающей молекулой по изобретению. Затем можно провести дополнительные рутинные эксперименты (например, анализ пептидных мутаций и связывания), чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела связано со связыванием с тем же эпитопом, что и эталонная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, или причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стеричное блокирование (или другое явление). Эксперименты такого рода можно проводить с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммуноанализа (РИА), *Viacore*, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антител, доступного в данной области техники. В соответствии с некоторыми вариантами воплощения настоящего изобретения два антигенсвязывающих белка связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антигенсвязывающего белка ингибирует связывание другого по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, как измерено в анализе конкурентного связывания (см., например, Jung-hans et al., *Cancer Res.* 1990:50: 1495-1502). Альтернативно, два антигенсвязывающих белка считаются связывающимися с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого. Считается, что два антигенсвязывающих белка имеют "перекрывающиеся эпитопы", если только подмножество аминокислотных мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антигенсвязывающего белка, уменьшают или устраняют связывание другого антигенсвязывающего белка.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело или его антигенсвязывающий домен за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, описанная выше методология связывания выполняется в двух ориентациях: в первой ориентации эталонной антигенсвязывающей молекуле разрешается связываться с белком FcεR1α (или белком CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой FcεR1α (или CD3). Во второй ориентации тестируемому антителу позволяют связываться с молекулой FcεR1α (или CD3) в условиях насыщения с последующей оценкой

связывания эталонной антигенсвязывающей молекулы с молекулой FcεR1α (или CD3). Если в обеих ориентациях только первая (насыщающая) антигенсвязывающая молекула способна связываться с молекулой FcεR1α (или CD3), то делается вывод, что тестируемое антитело и эталонная антигенсвязывающая молекула конкурируют за связывание с FcεR1α (или CD3). Обычному специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонной антигенсвязывающей молекулой, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела посредством связывания перекрывающегося или соседнего эпитопа.

Получение антигенсвязывающих доменов и конструирование биспецифических молекул.

Антигенсвязывающие домены, специфичные для конкретных антигенов, можно получить с помощью любой технологии получения антител, известной в данной области техники. После получения два разных антигенсвязывающих домена, специфичных для двух разных антигенов (например, CD3 и FcεR1α), можно соответствующим образом расположить относительно друг друга для получения биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению с использованием обычных способов. (Обсуждение примерных форматов биспецифических антител, которые можно использовать для конструирования биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению, приведено в другом месте в настоящем документе). В определенных вариантах воплощения изобретения один или более отдельных компонентов (например, тяжелая и легкая цепи) мультиспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению получены из химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Способы получения таких антител хорошо известны в данной области техники. Например, одна или более тяжелых и/или легких цепей биспецифических антигенсвязывающих молекул по настоящему изобретению могут быть получены с использованием технологии VELOCIMMUNE™. С помощью технологии VELOCIMMUNE™ (или любой другой технологии получения человеческих антител) первоначально выделяют химерные антитела с высоким сродством к конкретному антигену (например, CD3 или FcεR1α), имеющим переменную область человека и константную область мыши. Антитела характеризуются и выбираются по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность, эпитоп и т.д. Константные области мыши заменяются желаемой константной областью человека для создания полностью человеческих тяжелых и/или легких цепей, которые могут быть включены в биспецифические антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению.

Для получения биспецифических антигенсвязывающих молекул человека могут использоваться генно-инженерные животные. Например, можно использовать генетически модифицированную мышь, которая неспособна перестраивать и экспрессировать эндогенную переменную последовательность легкой цепи иммуноглобулина мыши, при этом мышь экспрессирует только один или два переменных домена легкой цепи человека, кодируемые последовательностями иммуноглобулина человека, функционально связанными с константным геном каппа мыши в эндогенном локусе каппа мыши. Таких генетически модифицированных мышей можно использовать для получения полностью человеческих биспецифических антигенсвязывающих молекул, содержащих две разные тяжелые цепи, которые связаны с идентичной легкой цепью, которая включает переменный домен, полученный из одного из двух различных сегментов гена переменной области легкой цепи человека. (См., например, Патент США 2011/0195454). Полностью человеческий относится к антителу, или его антигенсвязывающему фрагменту, или его иммуноглобулиновому домену, содержащему аминокислотную последовательность, кодируемую ДНК, полученной из человеческой последовательности, по всей длине каждого полипептида антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или его иммуноглобулинового домена. В некоторых случаях полностью человеческая последовательность происходит из белка, эндогенного для человека. В других случаях полностью человеческий белок или белковая последовательность включает химерную последовательность, в которой каждая составляющая последовательность происходит от человеческой последовательности. Не будучи связанными какой-либо одной теорией, химерные белки или химерные последовательности обычно конструируют так, чтобы минимизировать создание иммуногенных эпитопов в соединениях последовательностей компонентов, например по сравнению с любыми областями или доменами человеческих иммуноглобулинов дикого типа.

Биоэквиваленты.

Настоящее изобретение охватывает антигенсвязывающие молекулы, имеющие аминокислотные последовательности, которые отличаются от таковых примерных молекул, раскрытых в данном документе, но которые сохраняют способность связывать CD3 и/или FcεR1α. Такие варианты молекул могут включать одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но проявлять биологическую активность, которая по существу эквивалентна активности описанных биспецифических антигенсвязывающих молекул.

Настоящее изобретение включает антигенсвязывающие молекулы, которые биоэквивалентны любой из примерных антигенсвязывающих молекул, изложенных в данном документе. Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень абсорбции которых

не демонстрируют значительного различия при введении в одинаковой молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, будь то единичная доза или многократная доза. Некоторые антигенсвязывающие белки будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени абсорбции, но не по скорости абсорбции, и все же могут считаться биоэквивалентными, поскольку такие различия в скорости абсорбции являются преднамеренными и отражаются в маркировке и не важны для достижения эффективных концентраций лекарственного средства в организме, например, при хроническом употреблении, и считаются незначительными с медицинской точки зрения для конкретного исследуемого лекарственного препарата.

В одном варианте воплощения изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если нет клинически значимых различий в их безопасности, чистоте и активности.

В одном варианте воплощения изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно один или более раз переключить между эталонным продуктом и биологическим продуктом без ожидаемого увеличения риска побочных эффектов, включая клинически значимое изменение иммуногенности или снижение эффективности по сравнению с продолжением терапии без такого переключения.

В одном варианте воплощения изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если они оба действуют по общему механизму или механизмам действия для состояния или условий использования, в той степени, в которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована способами *in vivo* и *in vitro*. Меры биоэквивалентности включают, например, (а) тест *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости как функция времени; (б) в тесте *in vitro*, который коррелировал с данными биодоступности человека *in vivo* и позволял их обоснованно прогнозировать; (в) в тесте *in vivo* на людях или других млекопитающих, в котором соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется как функция времени; и (г) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое устанавливает безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность антигенсвязывающего белка.

Биоэквивалентные варианты примерных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, могут быть сконструированы, например, путем выполнения различных замен остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, не необходимых для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами для предотвращения образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антигенсвязывающие белки могут включать варианты примерных биспецифических антигенсвязывающих молекул, изложенных в настоящем документе, содержащие изменения аминокислот, которые изменяют характеристики гликозилирования молекул, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Видовая селективность и межвидовая перекрестная реактивность.

Согласно определенным вариантам воплощения изобретения предоставлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека. Также предусмотрены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим FcεR1α. Настоящее изобретение также включает антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека с CD3 одного или более видов, не относящихся к человеку; и/или антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с человеческим FcεR1α и/или с FcεR1α из одного или более видов, не относящихся к человеку, например, яванского макака.

Согласно некоторым примерным вариантам воплощения изобретения предоставлены антигенсвязывающие молекулы, которые связываются с CD3 человека и/или FcεR1α человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от обстоятельств, с одной или более CD3 и/или FcεR1α мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, резуса, яванского макака или шимпанзе. Например, в конкретном примерном варианте воплощения настоящего изобретения представлены биспецифические антигенсвязывающие молекулы, содержащие первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека, и второй антигенсвязывающий домен, который связывает FcεR1α человека или яванского макака.

Терапевтический состав и введение.

Настоящее изобретение предоставляет фармацевтические композиции, содержащие антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции по изобретению составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими агентами, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и тому подобное. Множество подходящих составов можно найти в рецептурах, известных всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липиды (катионные или анионные), содержащие везикулы (такие как LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты,

эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238-311.

Доза антигенсвязывающей молекулы, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, целевого заболевания, состояний, пути введения и т.п. Предпочтительная доза обычно рассчитывается в соответствии с массой тела или площадью поверхности тела. Когда биспецифическая антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению используется для терапевтических целей у взрослого пациента, может быть полезно внутривенное введение биспецифической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, как правило, в разовой дозе от около 0,01 до около 50 мг/кг веса тела, более предпочтительно от около 0,1 до около 25, от около 1 до около 25 или от около 5 до около 25 мг/кг веса тела. В зависимости от тяжести состояния можно регулировать частоту и продолжительность лечения. Эффективные дозировки и режимы введения биспецифической антигенсвязывающей молекулы могут быть определены эмпирически; например, прогресс пациента можно контролировать путем периодической оценки, и дозу можно корректировать соответствующим образом. Более того, межвидовое масштабирование дозировок может быть выполнено с использованием хорошо известных в данной области техники способов, (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res. 8:1351).

Известны различные системы доставки, которые могут быть использованы для введения фармацевтической композиции по изобретению, например, помещение в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Способы введения включают внутрикожный, внутримышечный, внутривентриальный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути, но не ограничиваются ими. Композицию можно вводить любым удобным путем, например инфузией или болюсной инъекцией, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой и кишки и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными веществами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, легко может найти применение при доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению устройство для доставки в виде шприца-ручки. Такое устройство доставки шприц-ручка может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом устройстве доставки шприц-ручке обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того, как вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж опустеет, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, содержащим фармацевтическую композицию. После этого устройство доставки шприц-ручку можно использовать повторно. В одноразовом устройстве для доставки шприц-ручке сменный картридж отсутствует. Чаще одноразовое устройство для доставки шприц-ручка поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. Как только резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство утилизируется.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции по настоящему изобретению используются многочисленные многоразовые ручки и автоинжекторы. Примеры включают, но не ограничиваются этим, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), шприц-ручку DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), шприц-ручку HUMALOG MIX 75/25™, шприц-ручку HUMALOG™, шприц-ручку HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), шприц-ручки NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), шприц-ручку BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), шприц-ручки OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ и OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Germany). Примеры одноразовых устройств для доставки шприца-ручки, имеющих применение при подкожной доставке фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются этим, шприц-ручку SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN (Dey, L.P.) и шприц-ручку HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park IL).

В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе с контролируемым высвобождением. В одном варианте воплощения изобретения можно использовать насос (см. Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201). В другом варианте воплощения изобретения можно использовать полимерные материалы; см. Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida. В еще одном варианте воплощения изобретения система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от мишени композиции, что требует лишь части системной дозы (см., например, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, выше, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science 249: 1527-1533.

Препараты для инъекций могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти препараты для инъекций могут быть приготовлены общеизвестными способами. Например, препараты для инъекций могут быть получены, путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используются, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные агенты и т.д., которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и т.д. В качестве масляной среды используются, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые можно использовать в сочетании с солюбилизующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленной таким образом инъекцией предпочтительно заполняют соответствующую ампулу.

Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде дозированных форм в стандартной дозе, подходящей для соответствия дозе активных ингредиентов. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и т.д. Количество содержащегося вышеупомянутого антитела обычно составляет от около 5 до около 500 мг на лекарственную форму в стандартной дозе; особенно в форме инъекции, предпочтительно, чтобы указанного выше антитела сохранилось от около 5 до около 100 мг и от около 10 до около 250 мг для других лекарственных форм.

Терапевтические применения антигенсвязывающих молекул.

Настоящее изобретение включает способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антитело против FcεR1α или его антигенсвязывающий фрагмент, или биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, которая специфически связывает CD3 и FcεR1α. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител или биспецифических антигенсвязывающих молекул, как раскрыто в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В данном контексте выражение "нуждающийся в этом субъект" означает человека или животное, не являющееся человеком, которое проявляет один или более симптомов или признаков заболевания или нарушения, связанного с FcεR1α, такого как нарушение активации тучных клеток, мастоцитоз или аллергия (например, субъект, страдающий любым типом аллергии или проявляющий какую-либо аллергическую реакцию), или которому иным образом будет полезно ингибирование или снижение активности FcεR1α или истощение клеток FcεR1α+ (например, анафилаксия).

Антитела и биспецифические антигенсвязывающие молекулы по изобретению (и терапевтические композиции, содержащие их) полезны, среди прочего, для лечения любого заболевания или расстройства, при котором стимуляция, активация и/или нацеливание на иммунный ответ могут быть полезными. В частности, антитела против FcεR1α или биспецифические антигенсвязывающие молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α по настоящему изобретению могут использоваться для лечения, профилактики и/или облегчения любого заболевания или расстройства, связанного с экспрессией FcεR1α или опосредованно ею, или активностью или пролиферацией клеток FcεR1α+. Механизм действия, с помощью которого достигаются терапевтические способы по изобретению, включает уничтожение клеток, экспрессирующих FcεR1α, в присутствии эффекторных клеток, например, с помощью КЗЦ, апоптоза, АЗКЦ, фагоцитоза или комбинации двух или более из этих механизмов. Клетки, экспрессирующие FcεR1α, которые могут быть ингибированы или уничтожены с использованием биспецифических антигенсвязывающих молекул по изобретению, включают, например, тучные клетки и/или базофилы.

Антигенсвязывающие молекулы по настоящему изобретению можно использовать для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией IgE или FcεR1α, включая, например, нарушение активации тучных клеток (такое как синдром активации тучных клеток), мастоцитоз или аллергии, включая аллергическую астму, сенную лихорадку, анафилаксию, atopический дерматит, хроническую крапивницу, пищевую аллергию и аллергию на пыльцу. Аллергии могут быть вызваны воздействием одного или более аллергенов, перечисленных в другом месте в данном документе. Согласно некоторым вариантам воплощения настоящего изобретения, антитела против FcεR1α или биспецифические антитела анти-FcεR1α/анти-CD3 применимы для лечения пациента, страдающего тяжелой аллергией, включая анафилаксию. В соответствии с другими родственными вариантами воплощения изобретения предложены способы, включающие введение антитела против FcεR1α или биспецифической антигенсвязывающей молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α, как описано в настоящем документе, пациенту, страдающему анафилаксией. Для того, чтобы установить, страдает ли пациент анафилаксией, могут использоваться аналитические/диагностические способы, известные в данной области техники, такие как тест на аллергическую реакцию и т.д.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения, после того, как у субъекта будет установлена аллергия, предоставляет способы лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрес-

сией FcεR1α (например, анафилаксии), включающие введение субъекту одной или более анти-FcεR1α или биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в другом месте в настоящем документе. Например, настоящее изобретение включает способы лечения аллергии, включающие введение пациенту антитела против FcεR1α или биспецифической антигенсвязывающей молекулы анти-CD3/анти-FcεR1α в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6 дней, 1, 2, 3 или 4 недель, 2, 4, 6, 8 месяцев, 1 года или более после того, как субъект получил другую терапию (например, антигистаминную терапию).

Комбинированные способы лечения и составы.

Настоящее изобретение относится к способам, которые включают введение фармацевтической композиции, содержащей любые из примерных антител и биспецифических антигенсвязывающих молекул, описанных в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами. Примеры дополнительных терапевтических агентов, которые можно комбинировать или вводить в комбинации с антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению, включают, например, антагонист IgE (например, антитело против IgE, такое как омализумаб) или низкомолекулярный ингибитор IgE (например, дарпины, такие как дарпин E2\_76), ингибитор IL-25, ингибитор IL-4, ингибитор рецептора IL-4 (например, антитело против IL-4R, такое как дупилумаб), ингибитор IL-33 (например, антитело против IL-33), агент, удаляющий плазматические клетки (например, биспецифическое антитело BCMAхCD3) и ингибитор тимусного стомального лимфопоэтина (TSLP). В некоторых вариантах воплощения изобретения агент для удаления плазматических клеток выбран из группы, состоящей из агента, нацеливающегося на антиген созревания В-клеток (BCMA), ингибитора протеасом, ингибитора гистондеацетилазы, ингибитора фактора активации В-клеток (BAFF) и ингибитора лиганда, индуцирующего пролиферацию A(APRIL; CD256). В одном варианте воплощения изобретения нацеливающийся агент BCMA выбран из группы, состоящей из биспецифического антитела анти-BCMA/анти-CD3, рецептора химерного антигена против BCMA и антитела против BCMA, конъюгированного с цитотоксическим лекарственным средством.

Другие агенты, которые можно с пользой вводить в комбинации с антигенсвязывающими молекулами по изобретению, включают лекарственные препараты для лечения аллергии, включая антигистаминные, противовоспалительные агенты, кортикостероиды, адреналин, бронходилататор, противоотечное средство, антагонисты лейкотриена или ингибитор тучных клеток (например, кромолин натрия).

Настоящее изобретение также включает терапевтические комбинации, содержащие любую из антигенсвязывающих молекул, упомянутых в данном документе, и ингибитор IgE или FcεR1α, где ингибитор представляет собой аптамер, бессмысловую молекулу, рибозим, миРНК, пептид, нанотело или фрагмент антитела (например, Fab-фрагмент; F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент; Fd-фрагмент; Fv-фрагмент; scFv; dAb-фрагмент; или другие сконструированные молекулы, такие как диатела, триатела, тетратела, мини-тела и минимальные единицы распознавания). Антигенсвязывающие молекулы по изобретению также можно вводить и/или совместно составлять в комбинации с противовирусными препаратами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами и/или НПВП.

Дополнительный терапевтически активный компонент(ы) можно вводить непосредственно перед, одновременно или вскоре после введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению; (для целей настоящего раскрытия изобретения такие схемы введения рассматриваются как введение антигенсвязывающей молекулы "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом).

Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению составлена совместно с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, как описано в другом месте в настоящем документе.

Схемы введения.

Согласно определенным вариантам воплощения настоящего изобретения, несколько доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против FcεR1α или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает FcεR1α и CD3) можно вводить субъекту в течение определенного периода действия. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение субъекту, нуждающемуся в этом, множественных доз антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Используемый здесь термин "последовательное введение" означает, что каждая доза антигенсвязывающей молекулы вводится субъекту в разный момент времени, например, в разные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение включает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антигенсвязывающей молекулы с последующим введением одной или более вторичных доз антигенсвязывающей молекулы и, необязательно, с последующим введением одной или более третичных доз антигенсвязывающей молекулы.

Термин "начальная доза", "вторичные дозы" и "третичные дозы" относятся к временной последовательности введения антигенсвязывающей молекулы по изобретению. Таким образом, "начальная доза" - это доза, которую вводят в начале схемы лечения (также называемая "исходная дозой"); "вторичные дозы" - это дозы, которые вводят после начальной дозы; и "третичные дозы" представляют собой дозы, ко-

торые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичная и третичная дозы могут все содержать одинаковое количество антигенсвязывающей молекулы, но обычно могут отличаться друг от друга с точки зрения частоты введения. Однако в некоторых вариантах воплощения изобретения количество антигенсвязывающей молекулы, содержащейся в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличается друг от друга (например, увеличивается или уменьшается в зависимости от ситуации) на протяжении курса лечения. В некоторых вариантах воплощения изобретения две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения как "ударные дозы" с последующими дозами, которые вводятся реже (например, "поддерживающие дозы").

В одном примерном варианте воплощения настоящего изобретения каждая вторичная и/или третичная доза вводится от 1 до 26 (например, 1, 1<sup>1/2</sup>, 2, 2<sup>1/2</sup>, 3, 3<sup>1/2</sup>, 4, 4<sup>1/2</sup>, 5, 5<sup>1/2</sup>, 6, 6<sup>1/2</sup>, 7, 7<sup>1/2</sup>, 8, 8<sup>1/2</sup>, 9, 9<sup>1/2</sup>, 10, 10<sup>1/2</sup>, 11, 11<sup>1/2</sup>, 12, 12<sup>1/2</sup>, 13, 13<sup>1/2</sup>, 14, 14<sup>1/2</sup>, 15, 15<sup>1/2</sup>, 16, 16<sup>1/2</sup>, 17, 17<sup>1/2</sup>, 18, 18<sup>1/2</sup>, 19, 19<sup>1/2</sup>, 20, 20<sup>1/2</sup>, 21, 21<sup>1/2</sup>, 22, 22<sup>1/2</sup>, 23, 23<sup>1/2</sup>, 24, 24<sup>1/2</sup>, 25, 25<sup>1/2</sup>, 26, 26<sup>1/2</sup> или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза "непосредственно предшествующая доза", как используется в данном документе, означает в последовательности многократных введений дозу антигенсвязывающей молекулы, которая вводится пациенту перед введением следующей дозы в последовательности без вмешивающихся доз.

Способы согласно этому аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз антигенсвязывающей молекулы (например, антитела против FcεR1α или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая специфически связывает FcεR1α и CD3). Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения пациенту вводят только однократную вторичную дозу. В других вариантах воплощения изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичных доз. Аналогичным образом, в некоторых вариантах воплощения изобретения пациенту вводят только одну третичную дозу. В других вариантах воплощения изобретения пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичных доз.

В вариантах воплощения изобретения, включающих несколько вторичных доз, каждая вторичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогичным образом, в вариантах воплощения изобретения, включающих несколько третичных доз, каждая третичная доза может вводиться с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может варьироваться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом во время курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

В одном варианте воплощения изобретения антигенсвязывающая молекула (например, анти-FcεR1α-антитело или биспецифическая антигенсвязывающая молекула, которая специфически связывает FcεR1α и CD3) вводится субъекту в дозе, зависящей от веса. "Доза на основе веса" (например, доза в мг/кг) представляет собой дозу антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифической антигенсвязывающей молекулы, которая будет изменяться в зависимости от веса субъекта.

В другом варианте воплощения изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифическая антигенсвязывающая молекула вводится субъекту в виде фиксированной дозы. "Фиксированная доза" (например, доза в мг) означает, что одна доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифической антигенсвязывающей молекулы используется для всех субъектов независимо от каких-либо конкретных факторов, связанных с субъектом, таких как масса. В одном конкретном варианте воплощения изобретения фиксированная доза антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или биспецифической антигенсвязывающей молекулы по изобретению основана на заранее определенной массе или возрасте.

В целом, подходящая доза антигенсвязывающей молекулы по изобретению может находиться в диапазоне от около 0,001 до около 200,0 мг на кг веса тела реципиента, обычно в диапазоне от около 1 до 50 мг на кг веса тела. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или биспецифическая антигенсвязывающая молекула может быть введено в дозах около 0,1, около 0,5, около 1, около 1,5, около 2, около 3, около 5, около 10, около 15, около 20, около 25, около 30, около 40 и около 50 мг/кг на разовую дозу. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также предназначены для включения в данное изобретение.

В некоторых вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающую молекулу по изобретению вводят в виде фиксированной дозы от около 1 мг до около 2500 мг. В некоторых вариантах воплощения изобретения антигенсвязывающая молекула по изобретению вводится в виде фиксированной дозы около 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 25, около 30, около 50, около 75, около 100, около 125, около 150, около 175, 200, около 225, около 250, около 275, около 300, около 325, около 350, около 375, около 400, около 425, около 450, около 475, около 500, около 525, около 550, около 575, около 600, около 625, около 650, около 675, около 700, около 725, около 750, около 775, около 800, около 825, около 850, около 875, около 900, около 925, около 950, около 975, около 1000, около 1500, около 2000 или около 2500 мг. Значения и диапазоны, промежуточные по отношению к указанным значениям, также предназначены для включения в данное

изобретение.

Диагностическое применение антител.

Антитела против FcεR1α по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения FcεR1α или клеток, экспрессирующих FcεR1α, в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело против FcεR1α или его фрагмент можно использовать для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, чрезмерной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) FcεR1α. Примерные диагностические анализы на FcεR1α могут включать, например, контактирование образца, полученного от пациента, с антителом против FcεR1α по изобретению, где антитело против FcεR1α помечено детектируемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы немеченое антитело против FcεR1α можно использовать в диагностических приложениях в комбинации с вторичным антителом, которое само по себе является детектируемой меткой. Обнаруживаемая метка или репортерная молекула может быть радиоизотопом, таким как <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, <sup>35</sup>S или <sup>125</sup>I; флуоресцентным или хемилюминесцентным фрагментом, таким как флуоресцеинизотиоцианат или родамин; или ферментом, таким как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Другой пример диагностического использования антител против FcεR1α по настоящему изобретению включает антитело, меченное <sup>89</sup>Zr, такое как <sup>89</sup>Zr-десферриоксамин, с целью неинвазивной идентификации и отслеживания тучных клеток, базофилов или других клеток, экспрессирующих FcεR1α, у субъекта (например, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)). (См., например, Tavare, R. et al. *Cancer Res.* 2016 Jan 1;76(1):73-82; и Azad, BB. et al. *Oncotarget.* 2016 Mar 15;7(11):12344-58). Конкретные примерные анализы, которые можно использовать для обнаружения или измерения FcεR1α в образце, включают: твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (РИА) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Образцы, которые можно использовать в диагностических анализах FcεR1α согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, полученный от пациента, который содержит детектируемые количества белка FcεR1α или его фрагментов в нормальных или патологических условиях. Обычно уровни FcεR1α в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не страдающего заболеванием или состоянием, связанным с аномальными уровнями или активностью FcεR1α), будут измеряться для первоначального установления исходного или стандартного уровня FcεR1α. Затем этот исходный уровень FcεR1α можно сравнить с уровнями FcεR1α, измеренными в образцах, полученных от лиц с подозрением на наличие заболевания, связанного с FcεR1α (например, субъекта с аллергией) или состояния.

### Примеры

Нижеследующие ниже примеры представлены для того, чтобы предоставить обычным специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать способы и композиции по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура дана в градусах Цельсия, а давление равно или близко к атмосферному.

Пример 1: получение антител.

Получение антител против FcεR1α.

Антитела против FcεR1α получали путем иммунизации генетически модифицированной мыши антигеном FcεR1α человека (например, hFcεR1α, SEQ ID NO: 63) или путем иммунизации генно-инженерной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариabельные области тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина человека, с человеческим антигеном FcεR1α.

После иммунизации спленциты собирали у каждой мыши и либо (1) сливали с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и образования гибридомных клеток и проверяли на специфичность FcεR1α, либо (2) отсортировывали В-клетки (как описано в Патенте США 2007/0280945A1) с использованием в качестве сортирующего реагента фрагмента человеческого FcεR1α, который связывает и идентифицирует реактивные антитела (антиген-положительные В-клетки).

Первоначально были выделены химерные антитела к FcεR1α, имеющие вариabельную область человека и константную область мыши. Антитела были охарактеризованы и отобраны по желательным характеристикам, включая аффинность, селективность и т.д. При необходимости константные области мыши были заменены желаемой константной областью человека, например константной областью дикого типа или модифицированной IgG1 или IgG4, для создания полностью человеческого антитела против FcεR1α. Хотя выбранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного использования, характеристики связывания с антигеном с высоким сродством и специфичности мишени находятся в вариabельной области.

Некоторые биологические свойства примерных антител против FcεR1α, полученных в соответствии

со способами этого примера, подробно описаны в примерах, изложенных ниже.

Получение антител против CD3.

Антитела против CD3 были получены, как описано в WO 2017/053856, которая включена в настоящее описание в качестве ссылки. Для продукции биспецифических антител против CD3/анти-FcεR1α в соответствии с настоящим изобретением было выбрано примерное антитело против CD3. Другие антитела против CD3 для использования при получении биспецифических антител в соответствии с настоящим изобретением можно найти, например, в WO 2014/047231.

Некоторые биологические свойства примерных антител к CD3, полученных в соответствии со способами этого примера, подробно описаны в примерах в данном документе.

Получение биспецифических антител, связывающих FcεR1α и CD3.

Настоящее изобретение предоставляет биспецифические антигенсвязывающие молекулы, которые связывают CD3 и FcεR1α; такие биспецифические антигенсвязывающие молекулы также упоминаются в данном документе как "биспецифические молекулы анти-FcεR1α/анти-CD3 или анти-FcεR1αхCD3". Анти-FcεR1α часть биспецифической молекулы анти-FcεR1α/анти-CD3 полезна для нацеливания на клетки, которые экспрессируют FcεR1α, а анти-CD3 часть биспецифической молекулы полезна для активации Т-клеток. Одновременное связывание FcεR1α на клетке и CD3 на Т-клетке способствует направленному уничтожению (клеточному лизису) клетки-мишени, экспрессирующей FcεR1α, активированной Т-клеткой.

Биспецифические антитела, содержащие специфический анти-FcεR1α-связывающий домен и специфический анти-CD3-связывающий домен, были сконструированы с использованием стандартных методологий, в которых антигенсвязывающий домен анти-FcεR1α и антигенсвязывающий домен анти-CD3, каждый, содержат разные, отдельные HCVR в паре с общим LCVR. В приведенных в качестве примеров биспецифических антитела молекулы были сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела против CD3, тяжелой цепи из антитела против FcεR1α и общей легкой цепи из антитела против CD3 (WO 2017/053856). В других случаях биспецифические антитела могут быть сконструированы с использованием тяжелой цепи из антитела против CD3, тяжелой цепи из антитела против FcεR1α и легкой цепи из антитела против CD3 или легкой цепи из антитела против FcεR1α, или любой другой легкой цепи, о которой известно, что она неизбирательна или эффективно соединяется с множеством плеч тяжелой цепи. Антитела против FcεR1α и антитела против CD3, из которых происходят любые компоненты биспецифических антител, иногда называют родительскими антителами.

Биспецифические антитела, описанные в следующих примерах, содержат анти-CD3-связывающие плечи; и связывающее плечо анти-FcεR1α. Примеры биспецифических антител были получены с доменом Fc IgG4 (bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D).

Сводная информация о составных частях антигенсвязывающих доменов различных сконструированных биспецифических антител против FcεR1αхCD3 представлена в табл. 5.

Пример 2: последовательности аминокислот и нуклеиновых кислот вариабельной области тяжелой и легкой цепей.

В табл. 1 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей (HCVR и LCVR), CDR и тяжелых цепей, и легких цепей (HC и LC) выбранных антител против FcεR1α по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антител	SEQ ID NO:									
	HCVR	HCVR	HCVR	HCVR	LCVR	LCVR	LCVR	LCVR	HC	LC
	R	R1	R2	R3	R	R1	R2	R3	C	C
mAb17110	2	4	6	8	26	28	30	32	34	40
mAb17111	10	12	14	16	26	28	30	32	36	40
mAb17112	18	20	22	24	26	28	30	32	38	40

Таблица 2  
Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антител	SEQ ID NO:									
	HCV R	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3	H C	L C
mAb17110	1	3	5	7	25	27	29	31	33	39
mAb17111	9	11	13	15	25	27	29	31	35	39
mAb17112	17	19	21	23	25	27	29	31	37	39

В табл. 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой и легкой цепи (HCVR и LCVR), CDR и тяжелой цепи, и легкой цепи (HC и LC) примерного антитела против CD3 по изобретению. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот представлены в табл. 4.

Таблица 3  
Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антител	SEQ ID NO:									
	HCV R	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3	H C	L C
mAb7221G20	42	44	46	48	26	28	30	32	56	40

Таблица 4  
Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот

Обозначение антител	SEQ ID NO:									
	HCV R	HCD R1	HCD R2	HCD R3	LCV R	LCD R1	LCD R2	LCD R3	H C	L C
mAb7221G20	41	43	45	47	25	27	29	31	55	39

Сводная информация о составных частях различных сконструированных биспецифических антител против FcεR1αхCD3 представлена в табл. 5. В табл. 6, 7 и 8 перечислены HCVR, LCVR, CDR и идентификаторы последовательности тяжелой и легкой цепи биспецифических антител.

Таблица 5  
Сводная информация о составных частях биспецифических антител анти-FcεR1α16хCD3

Идентификатор биспецифических антител	Анти-FcεR1α	Анти-CD3	Общая переменная область легкой цепи
	Антиген-связывающий домен	Антиген-связывающий домен	
bsAb24919D	mAb17110	mAb7221G20	mAb7221G20
bsAb24920D	mAb17111	mAb7221G20	mAb7221G20
bsAb24921D	mAb17112	mAb7221G20	mAb7221G20

Таблица 6

Аминокислотные последовательности переменных областей и CDR биспецифических антител

Идентификатор биспецифических антител	Анти-FcεR1α антигенсвязывающий домен SEQ ID NO.				Анти-CD3 антигенсвязывающий домен SEQ ID NO.				Общая переменная область легкой цепи SEQ ID NO			
	HC VR	HC DR1	HC DR2	HC DR3	HC VR	HC DR1	HC DR2	HC DR3	LC VR	LC DR1	LC DR2	LC DR3
bsAb24919D	2	4	6	8	42	44	46	48	26	28	30	32
bsAb24920D	10	12	14	16	42	44	46	48	26	28	30	32
bsAb24921D	18	20	22	24	42	44	46	48	26	28	30	32

Таблица 7

Идентификаторы аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей биспецифических антител

Идентификатор биспецифических антител	Тяжелая цепь Анти-FcεR1α	Тяжелая цепь Анти-CD3	Общая легкая цепь
bsAb24919D	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 40
bsAb24920D	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 40
bsAb24921D	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 40

Таблица 8

Идентификаторы последовательностей нуклеиновых кислот тяжелой и легкой цепей биспецифических антител

Идентификатор биспецифических антител	Тяжелая цепь анти-FcεR1α	Тяжелая цепь анти-CD3	Общая легкая цепь
bsAb24919D	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 39
bsAb24920D	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 39
bsAb24921D	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 39

Пример 3: средство связывания, выведенное из поверхностного плазмонного резонанса, и кинетические константы человеческих моноклональных моноспецифических антител анти-FcεR1α и биспецифических антител анти-FcεR1α16xCD3.

Равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) связывания эктодомена FcεR1α человека или яванского макака с очищенными моноклональными антителами (mAb) против FcεR1α и биспецифическими антителами CD3 x FcεR1α (bsAbs) определяли с использованием биосенсора поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени (SPR-Biacore), Biacore 8k. Все исследования связывания выполняли в рабочем буфере с 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% об/об поверхностно-активного вещества Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) при 25 и 37°C.

Поверхность сенсора Biacore CM4 сначала была дериватизирована путем связывания амина с моноклональным мышинным антителом против Fc человека для захвата приблизительно 500-900 RU моноклональных антител против FcεR1α или биспецифических моноклональных антител против CD3xFcεR1α. 1 RU (единица ответа) представляет 1 пг белка на мм<sup>2</sup>, как определено производителем. Эктодомен реагентов FcεR1α человека и яванского макака экспрессировали с помощью C-концевой метки тус-тус-6xhffishFcεR1α.MMH (SEQ ID NO: 57) и mfFcεR1α.MMH (SEQ ID NO: 58). Различные концентрации реагентов FcεR1α готовили в рабочем буфере HBS-ET (600нМ-7,4нМ; серийно разводили в 3 раза) и вводили поверх моноклональных антител анти-FcεR1α против захваченного Fc человека или поверхностей биспецифических моноклональных антител против CD3 x FcεR1α для 1 мин при скорости потока 30 мкл/мин. Диссоциацию связанных реагентов FcεR1α контролировали в течение 4 мин в подвижном буфере HBS-ET. Константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли путем подгонки сенсограмм свя-

звания в реальном времени к модели связывания 1:1 с ограничением массопереноса с использованием оценочного программного обеспечения Biacore 8k. Равновесные константы диссоциации связывания ( $K_D$ ) и период полураспада диссоциации ( $t_{1/2}$ ) были рассчитаны на основе кинетических констант скорости следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

Параметры кинетики связывания для связывания hFcεR1α.ММН и mFcεR1α.ММН с различными примерными моноклональными антителами против FcεR1α или биспецифическими моноклональными антителами против CD3xFcεR1α по изобретению при 25 и 37°C показаны в табл. с 9 по 12.

Таблица 9

Параметры кинетики связывания hFcεR1α.ММН, связывающихся с моноклональными антителами против FcεR1α или биспецифическими моноклональными антителами против CD3 X FcεR1α при 25°C

Захваченным Ab	Уровень захвата mAb (RU)	Связывание hFcεR1α. ММН (RU) при 600нМ	$k_a$ (1/мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb17110	609 ± 1,2	130	7,19E+04	9,13E-03	1,27E-07	1,3
mAb17111	567 ± 0,8	91	7,84E+04	1,65E-02	2,11E-07	0,7
mAb17112	630 ± 0,9	123	8,80E+04	1,84E-02	2,09E-07	0,63
bsAb24919D	610 ± 0,7	72	6,82E+04	1,04E-02	1,52E-07	1,1
bsAb24920D	573 ± 1	46	6,59E+04	2,00E-02	3,03E-07	0,6
bsAb24921D	607 ± 0,6	69	7,74E+04	2,12E-02	2,74E-07	0,54
mAb изотипического контроля	545 ± 1,7	-5	НС*	НС*	НС*	НС*

НС\* указывает на отсутствие связывания при данных экспериментальных условиях.

Таблица 10

Параметры кинетики связывания hFcεR1α.ММН, связывающихся с моноклональными антителами против FcεR1α или биспецифическими моноклональными антителами против CD3xFcεR1α при 37°C

Захваченным Ab	Уровень захвата mAb (RU)	Связывание hFcεR1α. ММН (RU) при 600нМ	$k_a$ (1/мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb17110	745 ± 1,5	93	8,88E+04	3,94E-02	4,44E-07	0,29
mAb17111	745 ± 2,2	52	8,21E+04	4,83E-02	5,88E-07	0,24
mAb17112	681 ± 0,6	87	1,13E+05	5,85E-02	5,17E-07	0,20
bsAb24919D	764 ± 1,5	43	7,35E+04	5,88E-02	8,01E-07	0,20
bsAb24920D	743 ± 3,5	19	6,39E+04	9,91E-02	1,55E-06	0,12
bsAb24921D	670 ± 0,6	40	9,56E+04	9,34E-02	9,77E-07	0,12
mAb изотипического контроля	688 ± 3,5	-2	НС*	НС*	НС*	НС*

НС\* указывает на отсутствие связывания при данных экспериментальных условиях.

Таблица 11

Параметры кинетики связывания mfFcεR1α.ММН, связывающихся с моноклональными антителами против FcεR1α или биспецифическими моноклональными антителами против CD3хFcεR1α при 25°C

Захваченным Ab	Уровень захвата mAb (RU)	Связывание mfFcεR1α. ММН (RU) при 600нМ	k <sub>a</sub> (1/мс)	k <sub>d</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (М)	t <sub>1/2</sub> (мин)
mAb17110	596 ± 0,8	79	6,13E+04	1,36E-02	2,21E-07	0,8
mAb17111	620 ± 0,5	60	5,55E+04	1,37E-02	2,47E-07	0,8
mAb17112	594 ± 1,3	110	7,13E+04	1,39E-02	1,95E-07	0,8
bsAb24919D	597 ± 0,8	40	3,96E+04	1,44E-02	3,63E-07	0,8
bsAb24920D	625 ± 0,8	26	4,17E+04	1,95E-02	4,67E-07	0,6
bsAb24921D	563 ± 0,8	60	6,29E+04	1,61E-02	2,56E-07	0,7
mAb изотипического контроля	610 ± 1,6	-9	НС*	НС*	НС*	НС*

НС\* указывает на отсутствие связывания при данных экспериментальных условиях.

Таблица 12

Параметры кинетики связывания mfFcεR1α.ММН, связывающихся с моноклональными антителами против FcεR1α или биспецифическими моноклональными антителами против CD3хFcεR1α при 37°C

Захваченным Ab	Уровень захвата mAb (RU)	Связывание mfFcεR1α. ММН (RU) при 600нМ	k <sub>a</sub> (1/мс)	k <sub>d</sub> (1/с)	K <sub>D</sub> (М)	t <sub>1/2</sub> (мин)
mAb17110	719 ± 3,5	53	5,94E+04	2,54E-02	4,28E-07	0,45
mAb17111	720 ± 3,4	38	5,17E+04	2,64E-02	5,10E-07	0,44
mAb17112	769 ± 0,7	81	9,94E+04	3,28E-02	3,30E-07	0,35
bsAb24919D	685 ± 1,7	20	3,86E+04	3,99E-02	1,03E-06	0,29
bsAb24920D	660 ± 2,7	10	1,33E+04	4,45E-02	3,35E-06	0,26
bsAb24921D	749 ± 1,2	37	8,56E+04	4,45E-02	5,20E-07	0,26
mAb изотипического контроля	775 ± 2,8	-9	НС*	НС*	НС*	НС*

НС\* указывает на отсутствие связывания при данных экспериментальных условиях.

При 25°C примерные моноклональные антитела против FcεR1α или биспецифические моноклональные антитела против CD3хFcεR1α по изобретению связывались с hFcεR1α.ММН со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 127нМ до 303 нМ, как показано в табл. 9. При 37°C примерные моноклональные антитела против FcεR1α или биспецифические моноклональные антитела против CD3 х FcεR1α по изобретению связывались с hFcεR1α.ММН со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 444 нМ до 1,55 мкм, как показано в табл. 10.

При 25°C примерные моноклональные антитела против FcεR1α или биспецифические моноклональные антитела против CD3хFcεR1α по изобретению связывались с mfFcεR1α.ММН со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 195нМ до 467 нМ, как показано в табл. 11. При 37°C примерные моноклональные антитела против FcεR1α или биспецифические моноклональные антитела против CD3хFcεR1α по изобретению связывались с mfFcεR1α.ММН со значениями K<sub>D</sub> в диапазоне от 330 нМ до 3,35 мкм, как показано в табл. 12.

Пример 4: биспецифические антитела против FcεR1αхCD3 специфически связываются с FcεR1α, экспрессируемым на клетках Jurkat и НЕК293.

Для оценки связывания с антигенами, экспрессируемыми на клетках моноклональными антителами против FcεR1α и биспецифическими антителами против FcεR1αхCD3, проводили эксперимент проточ-

ной цитометрии с клетками Jurkat/NFAT-Luc и HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ. Клетки Jurkat/NFAT-Luc представляют собой клетки Jurkat, сконструированные для стабильной экспрессии репортера люциферазы под контролем транскрипции элемента ответа ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT). Клетки HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ представляют собой клетки HEK293, сконструированные для стабильной экспрессии человеческого FcεR1α, FcεR1β и FcεR1γ. Для проверки связывания с FcεR1α обезьяны (яванского макака, mf) (аминокислоты 4-260 номера доступа XP\_005541370.1 с аланином в позиции 81 замененным на триптофан), mfFcεR1α стабильно экспрессировался в HEK293 вместе с человеческим FcεR1β и FcεR1γ. Полученная линия клеток, именуемая в дальнейшем как HEK293/mf FcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ была выделена и поддерживалась в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 1X NEAA, 1X пенициллина/стрептомицина/L-глутамин, 1 мкг/мл пурамицина, 100 мкг/мл гигромицина В и 500 мкг/мл сульфата G418. Информация о реагентах следующая: среда DMEM, Irvine Scientific, Кат. № CRL-1573; эмбриональная бычья сыворотка (FBS), Seradigm, Кат. №1500-500; 100 х пенициллин/стрептомицин/L-глутамин (Pen/Strep/Glut), Invitrogen, Кат. № 10378-016; 100X заменимые аминокислоты (NEAA), Irvine Scientific, Кат. № 9034; селективный антибиотик Geneticin™ (G418 сульфат), Invitrogen, Кат. № 11811-098; гигромицин В, Calbiochem, Кат. № 400049; пурамицин, Sigma, Кат. № P-8833.

Для анализа в проточной цитометрии клетки HEK293, HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ и HEK293/mf FcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ собирали после диссоциации с использованием буфера для диссоциации без ферментов (Millipore Кат. № S-004), и клетки предварительно инкубировали с или без 70 нМ человеческого IgE в течение 30 мин на льду в буфере FACS (PBS, без Ca<sup>++</sup> и Mg<sup>++</sup>, (Irvine Scientific, Кат. № 9240), содержащий 2% FBS). Также собирали клетки Jurkat/NFAT-luc. Затем антитела в концентрации 70 нМ добавляли к 1×10<sup>6</sup> клеток/лунку каждого типа клеток при 4°C в течение 30 мин. После инкубации с первичными антителами клетки окрашивали 1,3 мкг/мл конъюгированного с аллофикоцианином (APC) вторичного антитела против человеческого IgG (Jackson ImmunoResearch, Кат. № 109-136-170) в течение 30 мин на льду. Клетки фиксировали с помощью BD CytoFix™ (Becton Dickinson, Кат. № 554655) и анализировали на цитометре Accuri™ C6 (BD) или CytoFLEX Flow (Beckman Coulter). Для всех клеточных линий были также протестированы неокрашенные контроли и только вторичные антитела, и образец был оценен на жизнеспособность с использованием красителя для определения жизнеспособности Far Red Fluo (Thermo Fisher, Кат. № L10120) в соответствии с протоколом производителя. Результаты были проанализированы с использованием программного обеспечения FlowJo (версия 10.0.8, FlowJo) для определения геометрических средних значений флуоресценции для жизнеспособных клеток, и соотношение связывания было рассчитано с использованием средней интенсивности флуоресценции (MFI) экспериментальных условий, нормализованных по MFI неокрашенных соответствующих клеток. Результаты представлены в табл. 13 и 14.

Таблица 13

Связывание 70 нМ антител анти-FcεR1α и антител анти-FcεR1α x CD3 с клетками HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ и Jurkat/NFAT-luc

		Коэффициент связывания (MFI обработанных/MFI неокрашенных клеток)			
		HEK293	HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ	Jurkat/NFAT-luc	
ID антител	Специфичность	Без IgE	Без IgE	70 нМ IgE	Без IgE
bsAb24919 D	FcεR1α x hCD3	2	269	277	48
bsAb24920 D	FcεR1α x hCD3	4	248	201	48
bsAb24921 D	FcεR1α x hCD3	11	253	295	94
mAb17110	FcεR1α	2	171	396	1
mAb17111	FcεR1α	1	136	369	1
mAb17112	FcεR1α	8	158	367	1

"Стелс" контроль IgG4 человека	Нерелевантный белок	1	1	1	2
Контроль IgG4 человека	Нерелевантный белок	1	1	1	1

Таблица 14

Связывание 70 нМ антител анти-FcεR1α и антител анти-FcεR1α x CD3ε с клетками HEK293/mfFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ

		Коэффициент связывания (MFI обработанных/MFI неокрашенных клеток)		
		Родительские клетки HEK293	HEK293/mfFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ	
ID антител	Специфичность	Без IgE	Без IgE	70 нМ IgE
bsAb24919D	FcεR1α x hCD3	1	166	236
bsAb24920D	FcεR1α x hCD3	2	142	169
bsAb24921D	FcεR1α x hCD3	2	169	284
mAb17110	FcεR1α	1	101	256
mAb17111	FcεR1α	1	102	190
mAb17112	FcεR1α	1	134	279
"Стелс" контроль IgG4 человека	Нерелевантный белок	1	1	1
Контроль IgG4 человека	Нерелевантный белок	1	1	1

Как показано в табл. 13, примерные биспецифические антитела анти-FcεR1αxCD3-bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D, продемонстрировали связывание с человеческим FcεR1α, экспрессированным на клетках HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ с добавлением и без добавления 70 нМ IgE человека с коэффициентами связывания 201-295 и с CD3 человека, экспрессированном на клетках Jurkat, с коэффициентами связывания 48-94. Примерные биспецифические антитела изобретения продемонстрировали минимальное связывание с клетками HEK293 без рецепторов FcεR1 с коэффициентами связывания 2-11. Антитела анти-FcεR1α продемонстрировали связывание с клетками HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ с добавлением и без добавления 70 нМ IgE человека с коэффициентами связывания 136-396, и с клетками HEK293 или Jurkat с коэффициентами связывания 1-8. Антитела изотипического контроля не демонстрировали связывания ни с одними клетками, и только вторичные контроли продемонстрировали коэффициенты связывания, составляющие 1.

Как показано в табл. 14, примерные биспецифические антитела анти-FcεR1αxCD3ε-bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D, продемонстрировали связывание с обезьяньим (яванский макак) FcεR1α, экспрессированным на клетках HEK293/mfFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ, с добавлением и без добавления 70 нМ IgE человека с коэффициентами связывания 142-284. Примерные биспецифические антитела изобретения продемонстрировали минимальное связывание с клетками HEK293 без рецепторов FcεR1 с коэффициентами связывания 1-2. Примерные антитела изобретения анти-FcεR1α продемонстрировали связывание с клетками HEK293/mfFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ с добавлением и без добавления 70 нМ IgE человека с коэффициентами связывания 101-279, но не с клетками HEK293. Антитела изотипического контроля не демонстрировали связывания ни с одними клетками, и только вторичные контроли продемонстрировали коэффициенты связывания, составляющие 1.

Пример 5: активация передачи сигналов CD3 человека биспецифическими антителами анти-FcεR1α x CD3.

Для оценки активации передачи сигналов CD3 человека биспецифическими антителами анти-FcεR1αxCD3ε в присутствии клеток, экспрессирующих FcεR1α, был проведен биоанализ с клетками Jurkat/NFAT-luc и HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ. Были разработаны стабильные клеточные линии. Клеточная линия Jurkat, линия Т-лимфоцитарных клеток человека, была использована для демонстрации передачи сигналов рецептора Т-лимфоцитов, опосредованной CD3 (Abraham and Weiss, Jurkat T cells and

development of the T-cell receptor signaling paradigm. Nat Rev Immunol. 2004 Apr;4(4):301-8). Клетки Jurkat были сконструированы для стабильной экспрессии репортера люциферазы под контролем транскрипции элемента ответа ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT). Полученную клеточную линию, называемую далее Jurkat/NFAT-Luc, выделяли и поддерживали в среде RPMI1640 (Irvine Scientific, Кат. №9160) с добавлением 10% FBS, 1X пенициллина/стрептомицина/L-глутамина и 1 мкг/мл пуромицина. Кроме того, клетки HEK293 трансфицировали для стабильной экспрессии человеческого FcεR1α (аминокислоты 1-257 из Uniprot № P12319-1), FcεR1β (аминокислоты 1-244 из Uniprot № Q01362-1) и FcεR1γ (аминокислоты 1-86 из Uniprot № P30273-1). Полученная линия клеток, называемая далее HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ, была выделена и поддерживалась в среде DMEM (Irvine Science, Кат. №9033) с добавлением 10% FBS, 1X NEAA, 1X пенициллина/стрептомицина/L-глутамина, 1 мкг/мл пуромицина, 100 мкг/мл гигромицина В и 500 мкг/мл сульфата G418.

Был проведен биоанализ для измерения передачи сигнала CD3 с помощью примерных биспецифических антител анти-FcεR1αхCD3ε по настоящему изобретению. Для биоанализа клетки HEK293 или HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ высевали из расчета 10000 клеток на лунку в 96-луночный планшет в буфере для анализа с 10 нМ человеческого IgE в буфере для анализа или без него (10% FBS в RPMI1640 (Irvine Scientific, Кат. №9160) с пенициллином/стрептомицином/L-глутамином) в течение 30 мин при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После инкубации клетки Jurkat/NFAT-luc высевали при 50000 вместе с серийно разведенными примерными биспецифическими антителами анти-FcεR1α х CD3 по изобретению, примерными анти-FcεR1α по изобретению или контрольными изотипическими антителами в диапазоне концентраций от 100 нМ до 2 пМ плюс образец, содержащий только буфер (без антител). Через 5,5 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> активность люциферазы измеряли с помощью реагента OneGlo™ (Promega, № E6031) и многоканального ридера для планшетов Victor™ x (Perkin Elmer). Результаты были проанализированы с использованием нелинейной регрессии (4-параметрическая логистика) с программным обеспечением Prism™ 6 (GraphPad) для получения значений EC<sub>50</sub>. Кратность активации рассчитывали с использованием средних RLU (относительных световых единиц) при наивысшей концентрации антитела, нормализованной по средней RLU без антител. Результаты сведены в табл. 15.

Таблица 15

## Активация человеческого CD3 при помощи антител анти-FcεR1αхCD3

		Jurkat/NFAT-luc		Jurkat/NFAT-luc			
		Клетки HEK293		Клетки HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ			
		Без IgE	10 нМ IgE	Без IgE		10 нМ IgE	
ID антител	Специфичность	EC <sub>50</sub> [M]	EC <sub>50</sub> [M]	EC <sub>50</sub> [M]	Кратность активации	EC <sub>50</sub> [M]	Кратность активации
bsAb24919D	FcεR1α х hCD3	Без активации	Без активации	3,4E-10	32	1,5E-09	32
bsAb24920D	FcεR1α х hCD3	Без активации	Без активации	6,8E-10	23	4,9E-09	25
bsAb24921D	FcεR1α х hCD3	Без активации	Без активации	2,3E-10	24	1,1E-09	27
mAb17110	FcεR1α	Без активации	Без активации	Без активации	1	Без активации	1

		ии	ии	ии		ии	
mAb1711 1	FcεR1α	Без активац ии	Без активац ии	Без активац ии	1	Без активац ии	1
mAb1711 2	FcεR1α	Без активац ии	Без активац ии	Без активац ии	1	Без активац ии	1
"Стелс" контроль IgG4 человека	Нерелевантн ый белок	Без активац ии	Без активац ии	Без активац ии	1	Без активац ии	1
Контроль IgG4 человека	Нерелевантн ый белок	Без активац ии	Без активац ии	Без активац ии	1	Без активац ии	1

Как показано в табл. 15, примерные биспецифические антитела анти-FcεR1αхCD3 по изобретению, bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D, показали активацию передачи сигнала CD3 в клетках Jurkat/NFAT-luc со значениями EC<sub>50</sub> в диапазоне от 230 до 680 пМ в присутствии клеток НЕК293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ без человеческого IgE и от 1,1 нМ до 4,9 нМ с 10 нМ человеческого IgE. Наибольшая активация была достигнута с помощью bsAb24919D с 32-кратной активацией с добавлением и без добавления 10 нМ IgE. Примерные биспецифические антитела по изобретению показали минимальную активацию в присутствии НЕК293 без рецепторов FcεR1 с кратностью активации в диапазоне 1-3. Антитела анти-FcεR1α и контрольные изотипические антитела не продемонстрировали активации с кратностью активации 1 ни в одном из испытанных условий.

Пример 6: эффект биспецифических антител анти-FcεR1α х анти-CD3 в анализах киллинга *in vitro*.

Для определения эффективности примерных биспецифических антител по изобретению анти-FcεR1αх-анти-CD3 (bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D) при индукции опосредованного Т-клетками киллинга клеток, экспрессирующих FcεR1α *in vitro*, были использованы два независимых эксперимента. В одном эксперименте в качестве мишени использовались сконструированные клетки НЕК293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ, в то время как в другом эксперименте в качестве мишени использовались первичные базофилы человека в общей популяции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). В обоих случаях для активации Т-клеток перед анализом киллинга использовались аналогичные протоколы: CD8+ Т-клетки сначала были выделены из лейкопаков человека (Центр крови Нью-Йорка) с использованием набора для обогащения человеческих Т-клеток CD8+ RossetteSep™ (STEM-CELL Technologies, Кат. №15063) и помещены в культуру с Dynabeads®, покрытыми CD3/CD28 (Invitrogen, Кат. №11132D) с тем, чтобы вызвать активацию Т-клеток. На 2-3 день культивирования гранулы удаляли с помощью магнитной сепарации и Т-клетки помещали в культуру. В одном примере (для использования с клетками-мишенями НЕК293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ) Т-клетки поддерживали в культуре в течение 5 дней, в это время добавляли IL-2 в концентрации 300 Ед/мл для обеспечения жизнеспособности и роста, и Т-клетки использовали через 2 дня после добавления IL-2. Во втором примере (для использования с клетками-мишенями МКПК) клетки поддерживали в культуре в течение одного дня после удаления гранул, а затем использовали для анализа киллинга. В обоих случаях активированные Т-клетки перед началом анализа киллинга были помечены сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE, Thermo Fischer Scientific, Кат. № C34554) с тем, чтобы исключить клетки во время анализа результатов.

Чтобы определить эффективность примерных биспецифических антител по изобретению анти-FcεR1αх-анти-CD3 в индукции опосредованного Т-клетками киллинга клеток-мишеней НЕК293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ, был использован анализ киллинга, в котором для считывания используется определение двух медиаторов апоптотического каскада (расщепленная каспаза 3 и расщепленный PARP). Для постановки анализа киллинга активированные Т-клетки смешивали с клетками-мишенями в соотношении 10 клеток-мишеней на Т-клетку, а затем помещали в 96-луночный планшет. В лунки добавляли последовательные пятикратные разведения антител с конечной концентрацией от 100 нМ до 10,24 фМ, и клетки инкубировали в течение ночи при 37°C с тем, чтобы произошёл опосредованный Т-клетками киллинг. Антитела включали примерные биспецифические антитела по изобретению анти-FcεR1α/CD3 и антитело изотипического контроля. После инкубации клетки собирали и ресуспендировали в предварительно нагретом цитофиксе BD (Кат. №554655) в течение 10 мин при 37°C. Затем клетки дважды промывали буфером MACS (Miltenyi, Кат. № 130-091-221) и пермеабилizировали путем ресуспендирования в ледяном метаноле и инкубирования при -20°C в течение по меньшей мере 30 мин или в течение ночи. После пермеабилizации к клеткам добавляли буфер MACS на 10 мин, чтобы обеспе-

чить регидратацию клеток, с последующими двумя промываниями буфером MACS. Затем клетки инкубировали с Fc-блокирующим антителом (Ebioscience, Кат. № 14-9161-73) с последующим окрашиванием коктейлем антител, содержащим антитела к расщепленной каспазе 3, конъюгированные с Alexa-647 (Cell Signaling Technology, Кат. №9602S) и PE-конъюгированные антитела против расщепленного PARP (BD Biosciences, Кат. №552933). Расщепление каспазы 3 и PARP является обязательным этапом активации апоптотического каскада, который запускается после доставки цитотоксических литических гранул от CD8+ Т-клеток к мишеням. Таким образом, специфическое обнаружение этих расщепленных белков служит показателем киллинга. После окрашивания клетки промывали, ресуспендировали в буфере MACS и собирали с использованием прибора LSRFortessa (BD Biosciences). Убитые клетки были идентифицированы по CFSE-, а апоптотические клетки в этой популяции были идентифицированы по расщепленной каспазе 3+ и расщепленному PARP+. Анализ данных проводился с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Полученные точки данных были преобразованы с использованием уравнения  $X = \text{Log}(X)$ , и преобразованные данные были подвергнуты линейному регрессионному анализу и подогнаны к сигмоидальной кривой зависимости ответа от дозы. Из этого анализа была получена  $EC_{80}$  (восемьдесят процентов (80%) максимальной эффективной концентрации, которая включает концентрацию антитела, которая вызывает восьмидесятипроцентный (80%) ответ по сравнению с исходным уровнем и максимумом после указанного времени воздействия) и максимальные ответы.

Чтобы определить эффективность примерных биспецифических антител по изобретению анти-FcεR1α-анти-CD3 в индукции опосредованного Т-клетками киллинга первичных базофилов в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), был использован анализ, основанный на количественном определении этих клеток относительно остальной популяции МКПК. Свежие МКПК были получены из донорской крови путем очистки на Ficoll (GE Healthcare, Кат. № 17-1440-03) и были смешаны с активированными Т-клетками и разведениями антител в формате, аналогичном описанному выше для сконструированных клеток-мишеней НЕК293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ. После инкубации в течение ночи клетки собирали, инкубировали с маркером живых/мертвых клеток (Invitrogen Кат. № L34962), затем инкубировали с Fc-блокирующим антителом и окрашивали смесью антител, содержащей APC-конъюгированные антитела анти-HLA-DR (BD Biosciences, Кат. № 559866) и BUV 395-конъюгированные антитела анти-CD123 (BD Biosciences, Кат. № 564195). Затем клетки дважды промывали буфером MACS и фиксировали в растворе, содержащем BD Cytotfix, разведенный 1: 4 в PBS, в течение 15 мин. Клетки ресуспендировали в буфере MACS и переносили в прибор LSRFortessa. Мертвые клетки были исключены из анализа с использованием маркера живых/мертвых клеток, как и экзогенные активированные Т-клетки, которые ранее были помечены CFSE. Базофилы в оставшейся популяции живых МКПК были идентифицированы как CD123+ HLA-DR-.

Анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Полученные точки данных были преобразованы с использованием уравнения  $X = \text{Log}(X)$ , и преобразованные данные были подвергнуты линейному регрессионному анализу и подогнаны к сигмоидальной кривой зависимости ответа от дозы. Из этого анализа были получены показатели  $EC_{50}$ . Максимальный процент уменьшения количества базофилов рассчитывали по следующей формуле:  $100 - (100 \times \% \text{ базофилов в образце с наивысшей дозой антител}) / (\text{Средний процент базофилов во всех образцах изотипического контроля})$ .

В табл. 16 суммировано дозозависимое увеличение в дважды положительных по расщепленной каспазе 3 и расщепленному PARP клетках-мишенях НЕК293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ в присутствии каждого примерного биспецифического антитела по изобретению (bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D), с  $EC_{80}$ , соответственно,  $3,456 \times 10^{-11} \text{M}$ ,  $1,264 \times 10^{-10} \text{M}$  и  $6,128 \times 10^{-11} \text{M}$ . Поскольку этот анализ основан на выявлении ранних стадий апоптоза, анализ останавливается до того, как клетки будут полностью убиты, и максимальный процент клеток, положительных по окрашиванию на маркеры апоптоза, составил 56,04, 56,48 и 55,83 для клеток, инкубированных с, соответственно, bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D. Примечательно, что не наблюдалось увеличения процента клеток-мишеней, положительных по обоим маркерам апоптоза в тех случаях, когда Т-клетки инкубировали вместе с клетками-мишенями в отсутствие антитела по сравнению с клетками-мишенями, инкубированными отдельно. Другими словами, индукция апоптоза не наблюдается, когда Т-клетки инкубируют вместе с клетками-мишенями только в присутствии контрольного изотипического антитела.

Таблица 16

EC80 и максимальный процент апоптотических клеток из дозо-зависимых кривых киллинга клеток-мишеней HEK293/hFcεR1α/hFcεR1β/hFcεR1γ после инкубации с Т-клетками и биспецифическими антителами FcεR1αхCD3

	bsAb24919D	bsAb24920D	bsAb24921D
EC80	3,456e-11	1,264e-10	6,128e-11
Максимальный процент апоптотических клеток	56,04	56,48	55,83

Табл. 17 суммирует зависимое от дозы уменьшение базофилов в общей целевой популяции МКПК в присутствии примерных биспецифических антител по изобретению (bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D) с, соответственно, EC<sub>50</sub> 3,748×10<sup>-9</sup>М, 2,003×10<sup>-8</sup>М и 4,003×10<sup>-9</sup>М. Базофилы были снижены, соответственно, на 90,57, 80,1 и 90,92% с наивысшей дозой bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D относительно среднего процента базофилов в МКПК во всех обработанных изотипом образцах.

Таблица 17

EC50 и максимальный процент снижения базофилов из дозо-зависимых кривых киллинга базофилов в клетках-мишенях МКПК после инкубации с Т-клетками и биспецифическими антителами FcεR1αхCD3

	bsAb24919D	bsAb24920D	bsAb24921D
EC50	3,748e-9	2,003e-8	4,003e-9
Максимальный процент снижения базофилов	90,57%	80,1%	90,92%

Пример 7: эффективность *in vivo* биспецифических антител анти-FcεR1αхCD3.

Изучали воздействие биспецифических антител анти-FcεR1α х анти-CD3 на модели пассивной кожной анафилаксии (ПКА) *in vivo* и при истощении базофилов селезенки.

Для определения эффективности биспецифических антител по изобретению анти-FcεR1αхCD3 для блокирования индуцированной аллергеном дегрануляции тучных клеток использовали модель пассивной кожной анафилаксии (ПКА) *in vivo*. Модель ПКА оценивает гиперчувствительность 1 типа и измеряет местную проницаемость сосудов в тканях уха, вызванную активацией тучных клеток (Gilfillan, A. M. & Tkaczyk, C. Integrated signaling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 218-230 (2006)). Эта модель включает внутрикожную инъекцию аллерген-специфической сыворотки от пациентов с аллергией в локальный участок кожи мышей, которые экспрессируют человеческий высокоаффинный рецептор IgE, FcεR1α, с последующей внутривенной инъекцией аллергена вместе с красителем. Аллергическая реакция вызывает расширение капилляров и повышенную проницаемость сосудов в месте сенсбилизации, что приводит к преимущественному накоплению красителя в этом месте. Краситель может быть извлечен из ткани и количественно определен спектрофотометрически.

Для анализов PCA группам мышей, гуманизированных в отношении FcεR1α и CD3 (n≥5 на эксперимент), сначала вводили подкожно либо антитело изотипического контроля, либо одно из трех примерных биспецифических антител FcεR1α х CD3 по изобретению в дозе 25 мг/кг. Через пять дней после введения антител мышам вводили в ухо сыворотку от индивидуума с аллергией на кошку (титр IgE 585, разведенный 1:5 в PBS). На следующий день мышам вводили внутривенно (100 мкл на мышью) раствор 1 мкг/мл Fel D1 (Indoor biotech LTN-FD1-1), растворенного в 1X PBS, содержащем 0,5% (мас./об.) синего красителя Эвана (Sigma Aldrich, № E2129). Через час после введения антигена мышью умерщвляли, вырезали и собирали уши и селезенки.

Уши помещали в 1 мл формамида и затем инкубировали в течение 3 дней при 50°C для экстракции синего красителя Эвана. Затем ткань уха удаляли из формамида, промокали для удаления лишней жидкости и взвешивали. Аликвоты по двести микролитров каждого экстракта формамида переносили в 96-луночные планшеты в двух повторах. Поглощение полученных супернатантов измеряли при 620 нм. Измеренная оптическая плотность была преобразована в концентрацию синего красителя Эвана с использованием стандартной кривой и представлена как нанограммы синего красителя Эвана на мг ткани уха. Табл. 18 показывает средние значения ± стандартное отклонение для каждой группы.

Для оценки частоты базофилов использовали анализ на основе проточной цитометрии. Суспензии отдельных клеток готовили из собранных селезенок после лизиса эритроцитов (Sigma, № по каталогу R7757). Затем клетки окрашивали маркером живых/мертвых клеток с последующим окрашиванием антител смесью антител, содержащих конъюгированное с BUV 395 анти-B220 (BD, кат. №563793), конъюгированное с FITC анти-CD4 (BD, кат. №553031), FITC-конъюгированное анти-CD8 (BD, Кат. №557667) и PE Cy7-конъюгированное CD49b (EBIOSCIENCE, Кат. №25-5971-82). После окрашивания клетки дважды промывали буфером MACS (Miltenyi Biotech Кат. № 130-091-221), фиксировали BD Cytofix (Кат. № 554655) в разведении 1:4 в PBS в течение 15 мин, затем ресуспендировали в буфере MACS и хранили

при 4°C. В день сбора клетки дважды промывали в буфере BD Perm/wash (Кат. № 554723) и окрашивали на внутриклеточный FcεR1α с помощью конъюгированного с eFluor450 анти-FcεR1α (EBIOSCIENCE, Кат. №48-5899-42). Затем клетки собирали в приборе LSRFortessa и анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo. Базофилы были идентифицированы как B220- CD4- CD8- CD49+ FcεR1α+. Процент снижения базофилов у отдельных мышей, которым вводили антитела, рассчитывали по следующей формуле: 100-(процент базофилов селезенки/средний процент базофилов селезенки в изотипической группе), где процент базофилов селезенки рассчитывается относительно общего количества живых клеток в селезенке. Результаты представлены в табл. 19.

Экстравазация синего красителя Эвана наблюдалась в ушах мышей, которым не вводили антитело, или у мышей, которым вводили контрольное изотипические антитело, со средним количественным определением красителя, составляющим, соответственно, 84,06 и 82,05 нг/мг (нг/мг относится к наногамму синего красителя Эвана на миллиграмм ткани). Табл. 18 демонстрирует эффективность примерных биспецифических антител анти-FcεR1αхCD3 по изобретению (bsAb24919D и bsAb24921D) на модели ПКА, на что указывает значительное снижение экстравазации красителя в группах, получавших эти антитела, по сравнению с изотипическим контролем. Статистически незначимая тенденция к уменьшению экстравазации красителя наблюдалась в группе, обработанной bsAb24920D, по сравнению с изотипическим контролем. Как показано, bsAb24919D и bsAb24921D блокируют дегрануляцию тучных клеток в пассивной кожной модели *in vivo* против сенсibilизации и последующего введения Fel D1 по сравнению с изотипическим контролем, демонстрируя значительное снижение экстравазации красителя на, соответственно, 74,64 нг/мг и 75,26 нг/мг, в то время как более умеренное снижение на 48,56 нг/мг наблюдалось с bsAb24920D. Статистическая значимость была определена следующим образом. Нормальность всех групп сначала проверялась с помощью теста нормальности Шапиро-Уилка. Поскольку данные во всех группах были нормально распределены, был применен односторонний анализ ANOVA с тестом Брауна-Форсайта для определения различий в стандартных отклонениях между группами. Наблюдались существенно разные стандартные отклонения; таким образом, вместо этого был проведен непараметрический тест Краскела-Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна для определения статистической значимости среди групп.

Было обнаружено, что селезенки мышей, которым не вводили антитело, содержат в среднем 0,91% базофилов относительно общего количества живых клеток, тогда как селезенки мышей, которым вводили контрольное изотипическое антитело, содержали в среднем 0,71% базофилов. Табл. 19 демонстрирует эффективность примерных биспецифических антител FcεR1αхCD3 по изобретению (bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D) в истощении базофилов селезенки у тех же мышей из эксперимента ПКА, описанного выше. Как было показано, мыши, обработанные любым из трех антител, демонстрировали снижение базофилов селезенки. Хотя это снижение было значительным для всех трех антител по сравнению с мышами, которым не вводили антитело, снижение было статистически значимым только для мышей, получавших bsAb24919D, по сравнению с группой, которой вводили контрольное изотипическое антитело. Мыши, получавшие bsAb24919D, bsAb24920D и bsAb24921D, показали, соответственно, 96, 93 и 92 процента снижения базофилов по сравнению с изотипической группой. Статистическая значимость была определена следующим образом: сначала был проведен тест нормальности Шапиро-Уилка, и все группы данных, которые мы обнаружили, были нормально распределены; таким образом, был применен односторонний анализ ANOVA, и для проверки различий в стандартных отклонениях между группами был использован тест Брауна-Форсайта. В этом тесте наблюдались значимо различные стандартные отклонения, поэтому вместо этого был проведен непараметрический тест Краскела-Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна, чтобы определить статистическую значимость среди групп.

Таблица 18

Воздействие биспецифических антител анти-FcεR1αхCD3 на пассивную кожную анафилаксию (ПКА) на модели *in vivo*

Обработка	нг синего красителя Эвана/мг ткани ±СО	Средняя разница по сравнению с изотипическим контролем
bsAb24919D (n=7)	7,41 ± 1,1	-74,64 (**)
bsAb24920D (n=7)	33,49 ± 16,54	-48,56 (нз)
bsAb24921D (n=7)	6,79 ± 2,77	-75,26(**)

Для всех групп, получавших антитела, применялась общая концентрация антител 25мг/кг \*P≤,05, \*\*\*P≤,001, \*\*\*\*P≤,0001.

n = количество мышей в группе.

Таблица 19

Воздействие биспецифических антител анти-FcεR1αCD3 на истощение базофилов селезенки

Обработка	Базофилы селезенки (процент живых клеток)	Среднее процентное снижение относительно среднего уровня базофилов в группе изотипического контроля
bsAb24919D (n=7)	0,003 ± 0,0017	95,89 (**)
bsAb24920D (n=7)	0,005 ± 0,0018	92,96 (нз)
bsAb24921D (n=7)	0,003 ± 0,0026	92,43 (нз)

Для всех групп, получавших антитела, применялась общая концентрация антител 25мг/кг \*P≤,05, \*\*\*P≤,001, \*\*\*P≤,0001.

n=количество мышей в группе.

Как для анализа ПКА, так и для анализа истощения базофилов, уничтожение клеток, экспрессирующих FcεR1α, достигалось с использованием примерных биспецифических антител против FcεR1αCD3 по настоящему изобретению в более низкой дозировке. bsAb24919D и bsAb24921D показали статистически значимое ингибирование ответа ПКА и значительную потерю базофилов в экспериментах, повторенных при более низких дозах 1, 5 и 10 мг/кг (данные не приводятся). Эффективность была одинаковой при дозах от 5 до 25 мг/кг как для bsAb24919D, так и для bsAb24921D как в анализах ПКА, так и в анализах истощения базофилов (данные не приводятся).

Настоящее изобретение не ограничивается в объеме конкретными вариантами воплощения, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации изобретения в дополнение к описанным здесь станут очевидными для специалистов в данной области техники из предшествующего описания. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

#### Перечень последовательностей

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

<120> АНТИТЕЛА АНТИ-FC ЭПСИЛОН-R1 АЛЬФА (FCER1A), БИСПЕЦИФИЧЕСКИЕ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ FCER1A И CD3, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> 118003-45320/10480W001

<140>

<141>

<150> 62/721, 921

<151> 2018-08-23

<160> 63

<170> FastSEQ Для версии Windows 4.0

<210> 1

<211> 360

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 1

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtga ctccatcagt gattactatt ggatctggat ccggcagccc 120
ccaggaagtg gactggagtg gattggatat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagccacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagttgaggt ctgtgaccgc cgcagacacg gccatgtatt actgtgagcag acgaaataac 300

```

tggaaccacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggg caatgggtcac cgtctcttca 360

<210> 2  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 2  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Arg Asn Asn Trp Asn His Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 3  
 ggtgactcca tcaagtgatta ctat

24

<210> 4  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 4  
 Gly Asp Ser Ile Ser Asp Tyr Tyr  
 1 5

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 5

atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 6  
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 7  
 <211> 42  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 7  
 gсgаgасgаа аtаасtggаа ссасgtccgt gcttttgata tc

42

<210> 8  
 <211> 14  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 8  
 Ala Arg Arg Asn Asn Trp Asn His Val Arg Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 360  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 9  
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctgggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
 acctgcaactg tctctgggtga ctccatcaat gattactact ggagctggct ccggcagccc 120  
 ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180  
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240  
 aagctgagct ctgtgaccgc cgctgacacg gccgtgtatt actgtacgag acgaaataac 300  
 tggaactacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggа caatggtcac cgtctcttca 360

<210> 10  
 <211> 120  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 10  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Asp Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 85 90 95  
 Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 11  
 ggtgactcca tcaatgatta ctac 24

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 12  
 Gly Asp Ser Ile Asn Asp Tyr Tyr  
 1 5

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 13  
 atctattaca gtgggagcac c 21

<210> 14  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 14  
Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr  
1 5

<210> 15  
<211> 42  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 15  
acgagacgaa ataactggaa ctacgtccgt gcttttgata tc 42

<210> 16  
<211> 14  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 16  
Thr Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile  
1 5 10

<210> 17  
<211> 360  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 17  
caggtgcagg tgcaggagtc gggcccaaga ctgggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60  
acctgactg tctctggtgg ctccatgagt agttactatt ggatttggat ccggcagccc 120  
ccagggaagg aattggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180  
ccctccctca agagtcgagc caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttctccctg 240  
aacctgaact ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgagag acgaaataac 300  
tggaactacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaaggga caatggtcac cgtctcttca 360

<210> 18  
<211> 120  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетический

<400> 18  
Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser Glu  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Tyr  
20 25 30  
Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Ile  
35 40 45  
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 19  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 19  
 ggtggctcca tgagtagtta ctat

24

<210> 20  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 20  
 Gly Gly Ser Met Ser Ser Tyr Tyr  
 1 5

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 21  
 atctattaca gtgggagcac c

21

<210> 22  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 22  
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 42  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 23

gсgаgасgаа атаастggаа ctасgtccgt gcttttgata tc

42

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 24

Ala Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile

1

5

10

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 25

gacatccaga tgaccсagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
 aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat тааа 324

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 26

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys  
 100 105

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; ДНК

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 27  
 cagagcatta gcagctat 18  
 <210> 28  
 <211> 6  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 28  
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 1 5  
 <210> 29  
 <211> 9  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 29  
 gctgcatcc 9  
 <210> 30  
 <211> 3  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 30  
 Ala Ala Ser  
 1  
 <210> 31  
 <211> 30  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический  
 <400> 31  
 caacagagtt acagtacccc tccgatcacc 30  
 <210> 32  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> синтетический

&lt;400&gt; 32

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro Ile Thr  
 1 5 10

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 1344

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 33

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtga ctccatcagt gattactatt ggatctggat ccggcagccc 120
ccaggaaagg gactggagtg gattggatat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagccacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagttgaggt ctgtgaccgc cgcagacacg gccatgtatt actgtgagag acgaaataac 300
tggaaccacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggg caatggtcac cgtctcttca 360
gcctccacca agggcccate ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 660
aaatatggtc ccccatgccc accctgcccc gcacctgagt tccctgggggg accatcagtc 720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctgggcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctctca cagcaggctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagtc 1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

```

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 34

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
  1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Asp Tyr
  20 25 30
Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
  35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
  50 55 60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
  65 70 75 80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
  85 90 95
Arg Arg Asn Asn Trp Asn His Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
  100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

```



```

aaatatggtc ccccatgccc accctgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcggggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctcta cagcaggctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagtcc 1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

```

<210> 36

<211> 447

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 36

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Asn Asp Tyr
 20          25          30
Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35          40          45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65          70          75          80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 85          90          95
Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100         105         110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115         120         125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130         135         140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145         150         155         160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165         170         175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180         185         190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195         200         205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210         215         220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225         230         235         240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245         250         255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260         265         270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275         280         285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290         295         300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305         310         315         320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile

```

## 048275

				325						330					335				
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro				
			340					345					350						
Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu				
		355					360					365							
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn				
	370					375					380								
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser				
	385				390					395					400				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg				
			405					410					415						
Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu				
			420					425					430						
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
	435						440						445						

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 1344

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 37

```

cagggtgcagg tgcaggagtc gggcccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctgggtg ctccatgagt agttactatt ggatttggat cggcagccc 120
ccaggaagag aattggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagc caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttctccctg 240
aacctgaact ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgagag acgaaataac 300
tggaactacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggg caatggtcac cgtctcttca 360
gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgctc acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
aaatattggtc ccccatgccc accctgcccg gcacctgagt tcctggggggg accatcagtc 720
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaaag cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgcctggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctcta cagcaggctc accgtggaca agagcagggtg gcagagggg 1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagtcc 1320
ctctccctgt ctctgggtaa atga 1344

```

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 447

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 38

Gln	Val	Gln	Val	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Arg	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu				
1				5					10					15					
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Met	Ser	Ser	Tyr				
			20					25					30						

Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95  
 Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 210 215 220  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 39

<211> 645

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 39

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccgtca 180  
 aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240  
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccgat caccttcggc 300  
 caagggacac gactggagat taaaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 360  
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420  
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 480  
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540  
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600  
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 645

<210> 40

<211> 214

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 40

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Pro  
 85 90 95  
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 41

<211> 372

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 41

gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgcsag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggttagcggg atatcatgga actcaggaag catcggatac 180

gccgacagcg tgaaggccg attacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 cttcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgctc aaaatacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta ttattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gc 372

<210> 42  
 <211> 124  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 42  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 43  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 43  
 gggtttacat tcgacgatta cagc 24

<210> 44  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 44  
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ser  
 1 5

<210> 45  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 45  
 atatcatgga actcaggaag catc 24

<210> 46  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 46  
 Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile  
 1 5

<210> 47  
 <211> 51  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 47  
 gcaaaatascg gcagtggtta tggcaagttt tattattatg gaatggacgt g 51

<210> 48  
 <211> 17  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 48  
 Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 1 5 10 15  
 Val

<210> 49  
 <211> 1341  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 49  
 caggtgсagс tgсaggaгtс gggcccсagga ctgggtgaagс cttcggagac cctgtccctc 60  
 acctgсactg tctctgggtga ctccatcagt gattactatt ggatctggat ccggcagccc 120  
 ccaggaaaгg gactggagtg gattggatat atctattaca gtggggagсac caactacaac 180  
 ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagccacgt ccaagaacca gttctccctg 240  
 aagttgaggt ctgtgaccgc cgcagacacg gccatgtatt actgtgсgag acgaaataac 300  
 tggaaccacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggg caatggtcac cgtctcttca 360  
 gcctccacca agggcccacг ggtcttcccc ctgggcсcct gctccaggag cacctccgag 420  
 agсacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggт gacgggtgтcг 480  
 tggaactcag gcgсcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540  
 ggactctact ccctcagсag cgtgggtgacc gtgcсctcca gcagcttggg cacgaagacc 600  
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagг tggacaagag agttgagтcc 660

```

aaatatggtc ccccatgccc accgtgccc gcaccacctg tggcaggacc atcagtcttc 720
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 780
gtgggtggg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 840
gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1260
gtcttctcat gtcctgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagtccttc 1320
tcctgtctc tgggtaaatg a                                     1341

```

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 50

```

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Ser Asp Tyr
20          25          30
Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35          40          45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50          55          60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Arg Arg Asn Asn Trp Asn His Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100         105         110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115         120         125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130         135         140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145         150         155         160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165         170         175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180         185         190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195         200         205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210         215         220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225         230         235         240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245         250         255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val
260         265         270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275         280         285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290         295         300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305         310         315         320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser

```

				325						330					335			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro			
			340						345				350					
Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val			
		355					360					365						
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly			
	370					375					380							
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp			
385					390					395					400			
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp			
			405						410						415			
Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His			
			420						425					430				
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys					
		435					440						445					

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 1341

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 51

```

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtga ctccatcaat gattactact ggagctggct ccggcagccc 120
ccagggaaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
aagctgagct ctgtgaccgc cgctgacacg gccgtgtatt actgtacgag acgaaataac 300
tggaactacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggg caatggtcac cgtctcttca 360
gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgctc acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 660
aaatatggtc ccccatgccc accgtgccc aaccacctg tggcaggacc atcagtcttc 720
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggacccctga ggtcacgtgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 840
gtggaggtgc ataatgcca gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaaggcct cccgtctctc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1020
cagccccgag agccacaggt gtacaccctg cccccatcc aggaggagat gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagtc tctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagtccttc 1320
tcctgtctc tgggtaaatg a

```

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 52

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu			
1				5					10					15				
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Ile	Asn	Asp	Tyr			
			20					25					30					

Tyr Trp Ser Trp Leu Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 85 90 95  
 Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 115 120 125  
 Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala  
 130 135 140  
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 145 150 155 160  
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 165 170 175  
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 180 185 190  
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys  
 195 200 205  
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro  
 210 215 220  
 Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 53

<211> 1341

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 53

```

caggtgcagg tgcaggagtc gggcccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtcctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatgagt agttactatt ggatttggat ccggcagccc 120
ccaggggaagg aattggagtg gattgggtat atctattaca gtggggagcac caactacaac 180
ccctccctca agagtcgagc caccatatca gtagacacgt ccaagaatca gttctccctg 240
aacctgaact ctgtgaccgc cgcagacacg gccgtgtatt actgtgagcag acgaaataac 300
tggaactacg tccgtgcttt tgatatctgg ggccaagggg caatgggtcac cgtctcttca 360
gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccctgggctg cctgggcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaactcag gcgcccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 540
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgcccctca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtc 660
aaatatggtc ccccatgccc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc atcagtcctc 720
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 840
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1020
cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgacctgct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tctctacag caggctcacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagtcctc 1320
tcctgtctc tgggtaaattg a 1341

```

<210> 54

<211> 446

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 54

```

Gln Val Gln Val Gln Glu Ser Gly Pro Arg Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Met Ser Ser Tyr
 20          25          30
Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Ile
 35          40          45
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50          55          60
Ser Arg Ala Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65          70          75          80
Asn Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85          90          95
Arg Arg Asn Asn Trp Asn Tyr Val Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100         105         110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115         120         125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
 130         135         140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145         150         155         160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165         170         175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180         185         190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
 195         200         205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
 210         215         220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
 225         230         235         240

```

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
 245 250 255  
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val  
 260 265 270  
 Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr  
 275 280 285  
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys  
 305 310 315 320  
 Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 340 345 350  
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 355 360 365  
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 370 375 380  
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 385 390 395 400  
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 405 410 415  
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 420 425 430  
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 435 440 445

<210> 55  
 <211> 1353  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетический

<400> 55  
 gaagtacagc ttgtagaatc cggcggagga ctggtacaac ctggaagaag tcttagactg 60  
 agttgcgag ctagtgggtt tacattcgac gattacagca tgcattgggt gaggcaagct 120  
 cctggtaaag gattggaatg ggtagcggg atatcatgga actcaggaag catcgggatac 180  
 gccgacagcg tgaaaggccg atttacaata tctagggaca acgcaaaaaa ctctctctac 240  
 cttcaaatga actctcttag ggcagaagac acagcattgt attattgcdc aaaatacggc 300  
 agtggttatg gcaagtttta ttattatgga atggacgtgt ggggacaagg gacaacagtg 360  
 acagtgagta gcgccagcac aaaaggtcct agcgtttttc cacttgcccc atgttcaagg 420  
 tcaacctccg aaagtaccgc cgctcttggc tgtctcgtaa aagattattt tcccgaacct 480  
 gtaactgtct cctggaactc cggcgcactc acttccggcg tacatacctt ccccgtgctc 540  
 ctccaatctt ccgggtctcta ctccctgtct tctggtgtca ctggtccatc atcctcactc 600  
 ggcacaaaaa catatacctg caacgttgat cacaagccaa gtaataccaa agttgataag 660  
 cgcgtcgaat ccaatacggg tccccctgac ccccatgctc ccgctccacc tgtggctggg 720  
 ccctctggtt tcttttttcc ccctaaacct aaagataccc tcatgatttc cagaaccccc 780  
 gaggtcacct gcgtcgtcgt tgatgtaagc caagaagatc ccgaagtcca gttcaattgg 840  
 tatgtagacg gtgttgaagt ccataatgca aaaacaaaac ccagagagga acagtttaat 900  
 tcaacctatc gtgtcgttag cgtactcacc gttcttcatc aagactggct caatggaaaa 960  
 gaatataaat gtaaagttag caacaaaggt ctgccaggtt caatcgaaaa aacaattagc 1020  
 aaagccaaaag gccaacctcg cgaaccccaa gtctatacct tgcccccttc tcaggaagaa 1080  
 atgaccaaaa accaagtttc actcacatgc ctcgtaaaaag gattctatcc atcagacatt 1140  
 gcagtagaat gggaatctaa cggccaacct gaaaataatt acaaaaccac tctcctgctc 1200  
 ctcgattctg acggctcttt tttcctttac tccagattga ctggtgataa atcccgtggt 1260  
 caggaaggta acgttttttc ttgttctgtg atgcacgaag ccctccataa cagattcact 1320  
 caaaaatctc tttctctctc cctggcaaaa taa 1353

<210> 56  
 <211> 450

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; синтетический

&lt;400&gt; 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Tyr Gly Ser Gly Tyr Gly Lys Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp  
 100 105 110  
 Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys  
 115 120 125  
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu  
 130 135 140  
 Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
 145 150 155 160  
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
 165 170 175  
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
 180 185 190  
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn  
 195 200 205  
 Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser  
 210 215 220  
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 245 250 255  
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu  
 260 265 270  
 Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 275 280 285  
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg  
 290 295 300  
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 305 310 315 320  
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu  
 325 330 335  
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 340 345 350  
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 435 440 445

Gly Lys  
450

<210> 57  
<211> 208  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> hFceR1a ecto-mmH  
aa 1-180: hFceR1a (аминокислота V26-Q205) из  
NP\_001992  
aa 181-208: Мус-Мус-гексагистидиновая метка

<400> 57  
Val Pro Gln Lys Pro Lys Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile  
1 5 10 15  
Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe  
20 25 30  
Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu  
35 40 45  
Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly  
50 55 60  
Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr  
65 70 75 80  
Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val  
85 90 95  
Val Met Glu Gly Gln Pro Leu Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn  
100 105 110  
Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile Tyr Tyr Lys Asp Gly Glu Ala Leu Lys  
115 120 125  
Tyr Trp Tyr Glu Asn His Asn Ile Ser Ile Thr Asn Ala Thr Val Glu  
130 135 140  
Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr Gly Lys Val Trp Gln Leu Asp Tyr  
145 150 155 160  
Glu Ser Glu Pro Leu Asn Ile Thr Val Ile Lys Ala Pro Arg Glu Lys  
165 170 175  
Tyr Trp Leu Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly  
180 185 190  
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His  
195 200 205

<210> 58  
<211> 208  
<212> Белок  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> mFFceR1a ecto-mmH  
aa 1-180: mf FceR1a (aa V29-Q208; L81W) из трансляции XM\_005541313.2  
aa 181-208: Мус-Мус-гексагистидиновая метка

<400> 58  
Val Pro Gln Lys Pro Thr Val Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile  
1 5 10 15  
Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr Leu Thr Cys Asn Gly Ser Asn Phe Phe  
20 25 30  
Glu Val Ser Ser Met Lys Trp Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Val  
35 40 45  
Ala Asn Ser Ser Trp Asn Ile Val Asn Ala Asp Phe Glu Asp Ser Gly

## 048275

50						55						60					
Glu	Tyr	Lys	Cys	Gln	His	Gln	Gln	Phe	Asp	Asp	Ser	Glu	Pro	Val	His		
65						70					75				80		
Leu	Glu	Val	Phe	Ser	Asp	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Ala	Glu	Val		
				85						90				95			
Val	Met	Glu	Gly	Gln	Pro	Leu	Phe	Leu	Arg	Cys	His	Ser	Trp	Arg	Asn		
			100					105					110				
Trp	Asp	Val	Tyr	Lys	Val	Ile	Tyr	Tyr	Lys	Asp	Gly	Glu	Ala	Leu	Lys		
		115					120						125				
Tyr	Trp	Tyr	Glu	Asn	His	Asn	Ile	Ser	Ile	Thr	Asn	Ala	Thr	Val	Glu		
		130				135						140					
Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Gly	Lys	Leu	Trp	Gln	Leu	Asp	Cys		
145					150						155				160		
Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Asn	Ile	Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Gln	His	Asp	Lys		
				165						170				175			
Tyr	Trp	Leu	Gln	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Gly		
			180					185					190				
Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His							
		195					200						205				

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 207

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hCD3 эпсилон

&lt;400&gt; 59

Met	Gln	Ser	Gly	Thr	His	Trp	Arg	Val	Leu	Gly	Leu	Cys	Leu	Leu	Ser		
1				5					10					15			
Val	Gly	Val	Trp	Gly	Gln	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Met	Gly	Gly	Ile	Thr		
			20					25					30				
Gln	Thr	Pro	Tyr	Lys	Val	Ser	Ile	Ser	Gly	Thr	Thr	Val	Ile	Leu	Thr		
		35					40					45					
Cys	Pro	Gln	Tyr	Pro	Gly	Ser	Glu	Ile	Leu	Trp	Gln	His	Asn	Asp	Lys		
		50				55					60						
Asn	Ile	Gly	Gly	Asp	Glu	Asp	Asp	Lys	Asn	Ile	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp		
65					70					75				80			
His	Leu	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Ser	Glu	Leu	Glu	Gln	Ser	Gly	Tyr	Tyr		
			85						90					95			
Val	Cys	Tyr	Pro	Arg	Gly	Ser	Lys	Pro	Glu	Asp	Ala	Asn	Phe	Tyr	Leu		
			100					105					110				
Tyr	Leu	Arg	Ala	Arg	Val	Cys	Glu	Asn	Cys	Met	Glu	Met	Asp	Val	Met		
		115					120					125					
Ser	Val	Ala	Thr	Ile	Val	Ile	Val	Asp	Ile	Cys	Ile	Thr	Gly	Gly	Leu		
		130				135						140					
Leu	Leu	Leu	Val	Tyr	Tyr	Trp	Ser	Lys	Asn	Arg	Lys	Ala	Lys	Ala	Lys		
145					150					155					160		
Pro	Val	Thr	Arg	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Arg	Gln	Arg	Gly	Gln	Asn		
			165					170					175				
Lys	Glu	Arg	Pro	Pro	Pro	Val	Pro	Asn	Pro	Asp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Arg		
		180						185					190				
Lys	Gly	Gln	Arg	Asp	Leu	Tyr	Ser	Gly	Leu	Asn	Gln	Arg	Arg	Ile			
		195					200						205				

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 171

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hCD3 дельта

&lt;400&gt; 60

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg  
 20 25 30  
 Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val  
 35 40 45  
 Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile  
 50 55 60  
 Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys  
 65 70 75 80  
 Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys  
 85 90 95  
 Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val  
 100 105 110  
 Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His  
 115 120 125  
 Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg  
 130 135 140  
 Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr  
 145 150 155 160  
 Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys  
 165 170

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 164

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; hCD3 дзета

&lt;400&gt; 61

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys  
 20 25 30  
 Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala  
 35 40 45  
 Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr  
 50 55 60  
 Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met  
 85 90 95  
 Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn  
 100 105 110  
 Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met  
 115 120 125  
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly  
 130 135 140  
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Pro Arg

<210> 62  
 <211> 182  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> hCD3 гамма

<400> 62  
 Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys  
 20 25 30  
 Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala  
 35 40 45  
 Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe  
 50 55 60  
 Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro  
 85 90 95  
 Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala  
 100 105 110  
 Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val  
 115 120 125  
 Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln  
 130 135 140  
 Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly  
 165 170 175  
 Asn Gln Leu Arg Arg Asn  
 180

<210> 63  
 <211> 257  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> hFceR1a

<400> 63  
 Met Ala Pro Ala Met Glu Ser Pro Thr Leu Leu Cys Val Ala Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Phe Phe Ala Pro Asp Gly Val Leu Ala Val Pro Gln Lys Pro Lys Val  
 20 25 30  
 Ser Leu Asn Pro Pro Trp Asn Arg Ile Phe Lys Gly Glu Asn Val Thr  
 35 40 45  
 Leu Thr Cys Asn Gly Asn Asn Phe Phe Glu Val Ser Ser Thr Lys Trp  
 50 55 60  
 Phe His Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu Thr Asn Ser Ser Leu Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Val Asn Ala Lys Phe Glu Asp Ser Gly Glu Tyr Lys Cys Gln His Gln  
 85 90 95  
 Gln Val Asn Glu Ser Glu Pro Val Tyr Leu Glu Val Phe Ser Asp Trp  
 100 105 110  
 Leu Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Val Val Met Glu Gly Gln Pro Leu  
 115 120 125  
 Phe Leu Arg Cys His Gly Trp Arg Asn Trp Asp Val Tyr Lys Val Ile

	130					135					140								
Tyr	Tyr	Lys	Asp	Gly	Glu	Ala	Leu	Lys	Tyr	Trp	Tyr	Glu	Asn	His	Asn				
145						150					155				160				
Ile	Ser	Ile	Thr	Asn	Ala	Thr	Val	Glu	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys				
				165					170					175					
Thr	Gly	Lys	Val	Trp	Gln	Leu	Asp	Tyr	Glu	Ser	Glu	Pro	Leu	Asn	Ile				
			180					185					190						
Thr	Val	Ile	Lys	Ala	Pro	Arg	Glu	Lys	Tyr	Trp	Leu	Gln	Phe	Phe	Ile				
		195					200					205							
Pro	Leu	Leu	Val	Val	Ile	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly	Leu	Phe	Ile				
	210					215					220								
Ser	Thr	Gln	Gln	Gln	Val	Thr	Phe	Leu	Leu	Lys	Ile	Lys	Arg	Thr	Arg				
225					230					235					240				
Lys	Gly	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Pro	His	Pro	Lys	Pro	Asn	Pro	Lys	Asn				
				245					250					255					
Asn																			

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с FcεR1α человека;

где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит определяющие комплементарность участки (CDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR)/варибельной области легкой цепи (LCVR) с парой аминокислотных последовательностей, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 2/26, 10/26 и 18/26.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит, соответственно, домены HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, выбранные из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4-6-8-28-30-32; 12-14-16-28-30-32 и 20-22-24-28-30-32.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) варибельную область тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2; и

варибельную область легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26; или

(b) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10; и

LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26; или

(c) HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18; и

LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

4. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая:

первый антигенсвязывающий домен, который связывает CD3 человека; и

второй антигенсвязывающий домен, который связывает FcεR1α человека;

где второй антигенсвязывающий домен происходит из антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-3.

5. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.4, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4;

HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6;

HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8;

LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;

LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и

LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32.

6. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.5, где второй антигенсвязывающий домен, содержит:

HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2; и

LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

7. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.4, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12;

HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14;

HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16;

LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;  
LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и  
LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32.

8. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.7, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10; и  
LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

9. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.4, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

HCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 20;  
HCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 22;  
HCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 24;  
LCDR1 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 28;  
LCDR2 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30; и  
LCDR3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 32.

10. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.9, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

HCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18; и  
LCVR с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 26.

11. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.4-10, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит:

определяющие комплементарность участки тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) из вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и

определяющие комплементарность участки легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) из вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

12. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.4-11, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит три определяющих комплементарность участка тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), и три определяющих комплементарность участка легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), где:

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44;  
HCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 46;  
HCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 48;  
LCDR1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;  
LCDR2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30; и  
LCDR3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

13. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.4-12, где первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывает CD3 человека, содержит:

HCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и  
LCVR, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

14. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности, SEQ ID NO: 44, 46 и 48; и

домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FcεR1α человека, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, 6 и 8; и

домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

15. Выделенная биспецифичная антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46 и 48; и

домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FcεR1α человека, где

второй антигенсвязывающий домен содержит:

домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 12, 14 и 16; и

домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

16. Выделенная биспецифическая антигенсвязывающая молекула, содержащая:

(а) первый антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с CD3 человека, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44, 46 и 48; и

домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32; и

(б) второй антигенсвязывающий домен, который специфично связывается с FcεR1α человека, где второй антигенсвязывающий домен содержит:

домены HCDR1, HCDR2 и HCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20, 22 и 24; и

домены LCDR1, LCDR2 и LCDR3, содержащие, соответственно, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28, 30 и 32.

17. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.4-16, где указанная биспецифичная антигенсвязывающая молекула представляет собой биспецифичное антитело.

18. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.17, где биспецифичное антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG.

19. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.18, где константная область тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой изотип IgG4.

20. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по п.18, где константная область тяжелой цепи человеческого IgG представляет собой изотип IgG1.

21. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.17-19, где биспецифичное антитело содержит:

первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50; и

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

22. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.17-19, где биспецифичное антитело содержит:

первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52; и

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

23. Биспецифичная антигенсвязывающая молекула по любому из пп.17-19, где биспецифичное антитело содержит:

первую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56;

вторую тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; и

легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

24. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3.

25. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.4-23.

26. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.24 или 25.

27. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п.25.

28. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3 или биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.4-23 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

29. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина, которая экспрессирует антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, в условиях, обеспечивающих продукцию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

30. Способ получения биспецифичной антигенсвязывающей молекулы, включающий культивирование клетки-хозяина, которая экспрессирует биспецифичную антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.4-23 в условиях, обеспечивающих продукцию биспецифичной антигенсвязывающей молекулы.

31. Способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или передачей сигнала FcεR1α, у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.28.

32. Способ по п.31, где заболевание или расстройство, связанное с экспрессией и/или передачей сигналов FcεR1α, представляет собой аллергию, нарушение активации тучных клеток или мастоцитоз.

33. Способ по п.32, где аллергия выбрана из группы, состоящей из аллергической астмы, сенной лихорадки, атопического дерматита, хронической крапивницы, пищевой аллергии и аллергии на пыльцу.

34. Способ по п.32 или 33, где аллергия представляет собой анафилактическую аллергию.

35. Способ по любому из пп.31-34, дополнительно включающий введение пациенту второго терапевтического агента.

36. Способ по п.35, где второй терапевтический агент выбран из группы, состоящей из антагониста IgE, антигистамина, противовоспалительного агента, кортикостероида, антагониста лейкотриена, ингибитора тучных клеток, бронхиального дилататора, противоотечного средства, адреналина, ингибитора IL-4, ингибитора рецептора IL-4, антагониста IL-33, антагониста IL-25, агента для удаления плазматических клеток и антагониста TSLP.

37. Применение фармацевтической композиции по п.28 для лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией и/или передачей сигналов FcεR1α.

38. Применение по п.37, где заболевание или расстройство представляет собой аллергию, нарушение активации тучных клеток или мастоцитоз.

