



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126384** (13) **C2**
(51) МПК (2022.01)**A61K 39/395** (2006.01)**C07K 16/46** (2006.01)**C12N 15/13** (2006.01)

A61P 35/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

(21) Номер заявки:	а 2019 03677	(72) Винахідник(и):	Трінклайн Натан (US), ван Схотен Вім (US), Альдред Шелі Форс (US), Харіс Кетрін (US), Фем Дуй (US)
(22) Дата подання заявки:	20.06.2017	(73) Володілець (володільці):	ТЕНЕОБІО, ІНК., 1490 O' Brien Drive, Suite D, Menlo Park, California 94025, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	29.09.2022	(74) Представник:	Слободянюк Оксана Олександрівна, реєстр. №216
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	62/394,360, 62/491,908	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2015/095412 A1, 25.06.2015 WO 2014/022540 A1, 06.02.2014 WO 2016/079081 A1, 26.05.2016 WO 2016/079177 A1, 26.05.2016 US 2013/0273055 A1, 17.10.2013
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	14.09.2016, 28.04.2017		
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	US, US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	10.06.2019, Бюл.№ 11		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	28.09.2022, Бюл.№ 39		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/US2017/038377, 20.06.2017		

(54) АНТИТІЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄ CD3**(57) Реферат:**

Винахід стосується мультиспецифічного антитіла, яке зв'язує CD3 ϵ -антиген людини, його отримання і застосування з метою лікування та/або діагностики різних захворювань.

UA 126384 C2

[illegible]

Fig. 3

Перехресне посилання

Ця заявка заявляє пріоритет за попередньою заявкою на патент США № 62/394360, поданою 14 вересня 2016 року і попередньою заявкою на патент США № 62/491908, поданою 28 квітня 2017 року, які включені в цей документ за допомогою посилання в повному обсязі.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Імунна система організму служить захистом від інфекцій, травм і раку. Дві окремі, але взаємопов'язані системи, гуморальна та клітинна імунні системи, працюють разом, щоб захистити організм. Дія гуморальної системи опосередковується розчинними факторами, які називаються антитілами, які нейтралізують продукти, що визнаються організмом чужорідними. Тоді як, клітинна система включає клітини, такі як Т-клітини і макрофаги, які видаляють і нейтралізують чужорідні вторгнення.

Активация Т-клітин має вирішальне значення для стимуляції імунних реакцій. Т-клітини демонструють імунологічну специфічність і спрямовують більшість клітинних імунних відповідей. Хоча Т-клітини не секретують антитіла, вони необхідні для секреції антитіл В-лімфоцитами. Активация Т-клітин вимагає участі ряду молекул клітинної поверхні, таких як рецепторний комплекс Т-клітин, і молекули CD4 або CD8. Антиген-специфічний Т-клітинний рецептор (ТКР) складається з дисульфід-зв'язаного гетеродимера, мембранного глікопротеїну з ланцюгами, альфа і бета (α і β) або гамма і дельта (γ і δ). ТКР нековалентно зв'язаний з комплексом інваріантних білків, позначених CD3.

Відомо, що Т-клітини демонструють сильну протипухлинну дію в численних експериментальних умовах. Антитіла, здатні ефективно залучати Т-клітини проти пухлинних клітин, були доступні у вигляді біспецифічних антитіл, наприклад, спрямованих на антигени, асоційовані з пухлиною (TAA - tumor-associated antigen) і агоністичні мембранні білки Т-клітин, такі як комплекс ТКР/CD3 і CD28. Ці біспецифічні антитіла здатні активувати Т-клітини незалежно від специфічності ТКР, що призводить до специфічного лізису клітин, які мають відповідні TAA.

Однак, хоча біспецифічні антитіла проти CD3 можуть перенаправляти лізис, опосередкований Т-клітинами, на злоякісні клітини, клінічні випробування із застосуванням бсАт (біспецифічних антитіл) на основі CD3 показали високу токсичність у пацієнтів. Неспецифічна активация Т-клітин від бсАт може відбуватися антиген-незалежним чином через взаємодію Fc/Fc-рецептора (FcR) або антиген-залежним чином, вразі якщо антиген експресується як на нормальних, так і на пухлинних клітинах. Обидва механізми можуть бути відповідальні за токсичність, що спостерігається в попередніх клінічних дослідженнях. (Див., наприклад, Link і співавт. (1998 рік) Int. J. Cancer 77 (2): 251-6; Durben і співавт. Molecular Therapy (2015 рік); 234, 648-655). Через виникнення в результаті цього синдрому вивільнення цитокінів мали місце значні обмеження в розробці цих антитіл для терапевтичних цілей.

Взаємодія Т-клітинного рецептора (ТКР) з його пептид-МНС-лігандом визначає активність Т-клітини. Характеристика зв'язування цієї взаємодії була детально вивчена і було показано, що воно контролює функцію Т-клітин. Сила і природа взаємодії ТКР-пептид/МНС визначає, чи виконують Т-клітини ефекторні функції або інактивуються і видаляються. Антитіла проти CD3 активують Т-клітини шляхом зміни конформації CD3ε-ланцюга і в залежності від епітопу можуть мати агоністичну або антагоністичну дію на Т-клітини (Yoon et al., 1994 Immunity 1: 563-569). У світлі значних побічних ефектів багатьох агоністів Т-клітин може виявитися кращим підтримувати сильні протипухлинні ефекти з одночасним зменшенням вивільнення прозапальних цитокінів. Однак, частково агоністичні анти-CD3-антитіла можуть субоптимально змінювати ланцюг CD3ε, що призводить до неефективної передачі сигналу, і більшість анти-CD3-антитіл є повними агоністами для обох шляхів. Незрозуміло, чи можуть ці ефекторні функції бути розділені. Багато існуючих анти-CD3-антитіл (наприклад, SP-34, UCST1, OKT3) мають спорідненість в діапазоні 1-50 нМ КД, однак це може бути не оптимальним для терапевтичного застосування.

CD3-специфічні антитіла і біспецифічні антитіла, отримані з них, забезпечуються цим винаходом.

Публікації

Антитіла проти CD3 описані, наприклад, в патентах США № 5585097; 5929212; 5968509; 6706265; 6750325; 7381803; 7728114. Біспецифічні антитіла зі специфічністю зв'язування CD3 описані, наприклад, в патентах США № 7262276; 7635472; 7862813; і 8236308, кожний з яких явно включений в цей документ за допомогою посилання.

СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

Композиції та способи їх застосування надані для сімейства споріднених антитіл, які зв'язуються і активують передачу сигналів за допомогою CD3, наприклад, активацією CD3⁺Т-

клітин. Це сімейство антитіл містить набір послідовностей CDR, як визначено в цьому документі. Це сімейство антитіл забезпечує ряд переваг, які сприяють його корисності як клінічного лікарського засобу (ів). Антитіла в цьому сімействі включають членів з рядом афінностей зв'язування, що дозволяють вибирати конкретну послідовність з бажаною афінністю. Здатність точно налаштовувати афінність має особливе значення для керування рівнем активації CD3 у індивіда, якого лікують, і, таким чином, для зниження токсичності.

У деяких варіантах здійснення анти-CD3 антитіла володіють афінністю (KD) проти CD3 в діапазоні від близько 10^{-6} до близько 10^{-11} . Антитіла проти CD3, які мають афінність (KD) 50 нМ або більше, 100 нМ або більше, 500 нМ або більше або 1 мкМ, або більше, можуть бути бажаними для більш точної імітації взаємодії ТКР/ГКГС (головний комплекс гістосумісності) і мінімізації вивільнення токсичних цитокінів при підтримці ефективного лізису пухлинних клітин. У деяких варіантах реалізації винаходу антитіла проти CD3 характеризуються або відбираються на зниження схильності індукувати вивільнення цитокінів при зв'язуванні з компетентною Т-клітиною, наприклад, для вивільнення ІЛ-2 і ІФН. Антитіла можуть бути відібрані для терапевтичного застосування, яке оптимізує знищення пухлинних клітин і знижене вивільнення цитокінів, наприклад антитіло, в сімействі послідовностей антитіл, описаних в цьому документі, індукує вивільнення цитокінів, яке становить менш ніж близько половини від максимуму, що спостерігається для члена сімейства в порівняльному аналізі, і може бути менше, наприклад, менше і близько 25 % від максимуму, що спостерігається для члена сімейства в порівняльному аналізі. У деяких варіантах реалізації винаходу пропонуються біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, які містять щонайменше варіабельну ділянку важкого ланцюга з вказаного сімейства антитіл і можуть містити варіабельну ділянку важкого і легкого ланцюга, представлену в цьому документі. Біспецифічні антитіла містять щонайменше варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, специфічного до білка, відмінного від CD3, і можуть містити варіабельну ділянку важкого і легкого ланцюга. У деяких таких варіантах реалізації винаходу друге антитіло специфічно зв'язується з антигеном, асоційованим з пухлиною, націлюючим антигеном, наприклад, інтегринами і тому подібним, патогенним антигеном, білком контрольної точки і тому подібним. Різні формати біспецифічних антитіл знаходяться в межах обсягу цього винаходу, включаючи, без обмеження, одноланцюгові поліпептиди, дволанцюгові поліпептиди, триланцюгові поліпептиди, чотириланцюгові поліпептиди і кратні їм.

Кожне з CD3-специфічних антитіл містить домен VH, що містить послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 в каркасі VH людини. Послідовності CDR сімейства 2 можуть бути розташовані, наприклад, в ділянці близько амінокислотних залишків 26-33; 51-58; і 97-112 для CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, наданих типових послідовностей варіабельної ділянки, викладених в SEQ ID NO: 1-18. Фахівцю в цій галузі техніки повинно бути зрозуміло, що послідовності CDR можуть перебувати в іншому положенні, в разі якщо обрана інша каркасна послідовність, хоча зазвичай порядок послідовностей буде залишатися тим же.

Послідовності CDR для антитіла сімейства 2 за цим винаходом можуть мати такі формули послідовності. X позначає варіабельну амінокислоту, яка може являти собою специфічні амінокислоти, як зазначено нижче.

CDR1

G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

при цьому:

X₅ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₅ являє собою D, A або H, в деяких варіантах реалізації винаходу X₅ являє собою D.

X₆ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₆ являє собою D або N; в деяких варіантах реалізації D₆ являє собою D.

У деяких варіантах реалізації послідовність CDR1 анти-CD3 антитіла сімейства 2 містить послідовність, приведenu в будь-який SEQ ID NO: 1-18, залишки 26-33

CDR2

I₁' S₂' W₃' N₄' S₅' G₆' S₇' I₈'

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR2 антитіла проти CD3 сімейства 2 містить послідовність, визначену в будь-який з SEQ ID NO: 1-18, залишки 51-58.

CDR3

A₁' K₂' D₃' S₄' R₅' G₆' Y₇' G₈' X₉' Y₁₀' X₁₁' X₁₂' G₁₃' G₁₂' A₁₅' Y₁₆'

при цьому:

X₉ може бути будь-якою амінокислотою, в деяких варіантах реалізації винаходу X₉ являє собою D або S; в деяких варіантах реалізації винаходу X₉ являє собою D;

X₁₁ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₁₁ являє собою R або S;

5 X₁₂ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₁₂ являє собою L або R;

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CD3 анти-CD3 антитіла сімейства 2 має формулу A K D S R G Y G D Y X₁₁ X₁₂ G G A Y, де X₁₁ і X₁₂ є такими, як визначено вище. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR3 анти-CD3 антитіла сімейства 2 містить послідовність представлену у будь-якій з SEQ ID NO 1-18, залишки 97-112. У деяких варіантах реалізації винаходу CD3-зв'язуючий домен VH антитіла сімейства 2 пов'язаний з доменом варіабельної ділянки легкого ланцюга. У деяких таких варіантах реалізації винаходу легкий ланцюг являє собою фіксований легкий ланцюг.

У деяких варіантах реалізації винаходу легкий ланцюг містить домен VL з послідовностями CDR1, CDR2 і CDR3 в каркасі VL людини. Послідовності CDR можуть бути тими, які наведені в SEQ ID NO 19. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR1 містить амінокислотні залишки 27-32; 50-52; 89-97 для CDR1, CDR2, CDR3 відповідно.

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовності CDR антитіла за цим винаходом являють собою послідовність з щонайменше 85 % ідентичністю, щонайменше 90 % ідентичністю, щонайменше 95 % ідентичністю, щонайменше 99 % ідентичністю відносно послідовності CDR або набору послідовностей CDR в SEQ ID NO: 1-18. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR за цим винаходом містить одну, дві, три або більше амінокислотних замін по відношенню до послідовності CDR або набору послідовностей CDR в будь-якій з SEQ ID NO: 1-18. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначена амінокислотна заміна(ни) являє собою одну або більше в положенні 5 або 10 у CDR1, положенні 2, 6 або 7 у CDR2, положенні 1, 8, 9 або 10 у CDR3 відносно формул сімейства 2, наведених вище.

У деяких варіантах реалізації винаходу біспецифічне антитіло за цим винаходом містить CD3-зв'язуючу варіабельну ділянку, описану в цьому документі, спарену з легким ланцюгом. У деяких варіантах реалізації винаходу легкий ланцюг містить послідовність варіабельної ділянки, викладену в SEQ ID NO: 19, або варіабельну ділянку, яка містить набір послідовностей CDR в SEQ ID NO 19, і каркасні послідовності. Різні послідовності Fc знаходять застосування, включаючи, але не обмежуючись, людські IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 і тому подібні. У деяких варіантах реалізації винаходу друге плече біспецифічного антитіла містить варіабельну ділянку, яка специфічно зв'язується з антигеном, асоційованим з пухлиною. У деяких варіантах реалізації винаходу друге плече біспецифічного антитіла містить варіабельну ділянку, яка специфічно зв'язується з BCMA. У деяких варіантах реалізації винаходу плече проти BCMA є одноланцюговою варіабельною ділянкою, наприклад, як зображено на Фіг 2B. У деяких варіантах реалізації винаходу плече до BCMA містить послідовність варіабельної ділянки, викладену в SEQ ID NO: 20; або тандемну послідовність варіабельної ділянки, викладену в SEQ ID NO 21. Послідовність Fc плеча до BCMA може являти собою, без обмеження, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4 людини тощо. Послідовності CDR можуть бути тими, які містяться в SEQ ID NO: 20. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR містить амінокислотні залишки 26-33; 51-58; 97-108 для CDR1, CDR2, CDR3 відповідно.

В інших варіантах реалізації винаходу пропонуються фармацевтичні композиції, що містять щонайменше CD3-зв'язуючий домен VH за цим винаходом, наприклад, моноспецифічне, біспецифічне тощо антитіло або антитілоподібний білок, що містить щонайменше CD3-зв'язуючий домен VH за цим винаходом; і фармацевтично прийнятний наповнювач. Композиція може бути ліофілізована, суспендована в розчині тощо. І може бути представлена у вигляді стандартної дози.

У деяких варіантах реалізації винаходу пропонується спосіб лікування раку, що включає введення індивіду, що має для цього показання, ефективної дози моноспецифічного, біспецифічного тощо антитіла за цим винаходом. Коли антитіло є біспецифічним, друга антигензв'язуюча ділянка може специфічно зв'язувати пухлинний антиген, білок контрольної точки тощо. У різних варіантах реалізації винаходу рак вибраний з групи, що складається з раку яєчників, раку молочної залози, шлунково-кишкового тракту, раку головного мозку, раку голови і шиї, раку передміхурової залози, раку товстої кишки, раку легень, лейкемії, лімфоми, саркоми, карциноми, пухлин нервових клітин, плоскоклітинного раку, ембріонально-клітинних пухлин, метастазів, недиференційованих пухлин, семіном, меланом, мієлом, нейробластом, пухлин змішаних клітин і неоплазій, викликаних інфекційними агентами.

60 У деяких варіантах реалізації винаходу пропонується спосіб лікування інфекційного

захворювання, що включає введення індивідууму, що має для цього показання, ефективної дози моноспецифічного, біспецифічного і тому подібного антитіла за цим винаходом. Коли антитіло є біспецифічним, друга антигензв'язуюча ділянка може специфічно зв'язувати патогенний антиген, наприклад, бактерії, віруси або паразити.

В інших варіантах реалізації винаходу спосіб отримання біспецифічного антитіла за цим винаходом, що включає експресію послідовностей антитіла, наприклад, однієї або більше кодуючих послідовностей легкого ланцюга, однієї або більше кодуючих послідовностей важкого ланцюга в одній клітині-господарі. У різних варіантах реалізації винаходу клітина-господар може являти собою прокариотичну або еукаріотичну клітину, таку як клітина ссавця.

Короткий опис графічних матеріалів

Цей винахід найкраще буде зрозумілим з подальшого докладного опису при читанні разом з доданими графічними матеріалами. Файл патенту або заявкимістить щонайменше одне графічне зображення, виконане в кольорі. Копії цього патенту або патентної заявки з кольоровим графічним матеріалом(ми) будуть надані патентним відомством за запитом і після сплати необхідного внеску. Слід підкреслити, що відповідно до встановленої практики відповідно до загальноприйнятої практики, різні об'єкти графічних матеріалів проілюстровані без дотримання масштабу. Навпаки, розміри різних об'єктів довільно збільшені або зменшені для чіткості. В графічні матеріали включені наступні фігури.

Фіг. 1А-1С. На Фіг. 1А проілюстровано вирівнювання ділянок CDR1, 2 і 3 членів сімейства 2 антитіл з SEQ ID NO: 1-18, які специфічно зв'язуються з CD3 людини і відповідають залишкам 26-33; 51-58; і 97-112. На Фіг. 1В проілюстровані ділянки CDR1, 2 і 3 фіксованого легкого ланцюга (SEQ ID NO: 19); і типова послідовність проти BCMA (SEQ ID NO: 20 і SEQ ID NO: 21). Фіг. 1С демонструє послідовності CDR еталонного анти-CD3 антитіла (SEQ ID NO: 22), ID 304704.

На Фіг. 2А-2Е проілюстровані схематичні моделі біспецифічних антитіл людини. На Фіг. 2А проілюстровано біспецифічне антитіло проти CD3: пухлинного антигену з спільним легким ланцюгом (всього 3 унікальні ланцюги). На Фіг. 2В проілюстровано біспецифічне антитіло проти CD3: пухлинного антигену з 2 унікальними легкими ланцюгами (всього 4 унікальні ланцюги). На Фіг. 2С проілюстровано біспецифічне антитіло проти CD3: пухлинного антигену з важким ланцюгом тільки пухлинного антигензв'язуючого домену (3 унікальні ланцюги). На Фіг. 2Д проілюстровано біспецифічне антитіло проти CD3: пухлинного антигену з пухлинним антигензв'язуючим доменом scFv (всього 3 унікальні ланцюги). На Фіг. 2Е проілюстровано біспецифічне антитіло проти CD3: пухлинного антигену з зв'язуючим доменом scFv проти CD3 (всього 3 унікальні ланцюги).

Фіг. 3. Таблиця даних по анти-CD3 сімейства 2, узагальнює поведінку антитіл проти CD3 в моноспецифічному і біспецифічному форматі. У колонці 1 показаний ідентифікатор послідовності для послідовності VH проти CD3. У колонці 2 показано значення СІФ для зв'язування клітинами Jurkat вихідного моноспецифічного (антитіла) проти CD3. У колонці 3 показано значення СІФ для зв'язування Т-клітинами ванського макака вихідного моноспецифічного (антитіла) проти CD3. У колонці 4 показано назву біспецифічного антитіла aCD3:aBCMA. У колонці 5 показані пікограми ІЛ-2, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 6 показані пікограми ІЛ-6, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 7 показані пікограми ІЛ-10, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 8 показані пікограми ІФН-γ, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 9 показані пікограми ФНП α , що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 10 показана ЕК50 лізису пухлинних клітин U266, опосередкованого біспецифічними антитілами, в присутності всіх Т-клітин людини. У колонці 11 показаний відсоток лізису пухлинних клітин U266, в присутності біспецифічного антитіла і всіх Т-клітин людини при дозі 333 нг/мл біспецифічного антитіла. У колонці 12 показана афінність білкового зв'язування плеча проти CD3 біспецифічного антитіла, виміряна за допомогою Octet. У колонці 13 показано значення СІФ для зв'язування клітинами Jurkat біспецифічного антитіла.

На Фіг. 4 проілюстрований опосередкований біспецифічними антитілами лізис пухлинних клітин. Сім біспецифічних антитіл α CD3_fam2:aBCMA, кожне з унікальним плечем проти CD3 і загальним плечем проти BCMA, були протестовані на здатність вбивати пухлинні клітини U266 BCMA+ за допомогою перенаправлення активованих первинних Т-клітин. В цьому експерименті

клітини U266, які експресують BCMA, змішували за активованими всіма Т-клітинами в співвідношенні Е:Т 10:1 разом з додаванням біспецифічного антитіла. Вісь у демонструє концентрацію антитіла, що застосовується, а вісь х демонструє % лізису пухлинних клітин через 6 годин після додавання антитіла.

На Фіг. 5 проілюстрована біспецифічна активність знищення U266, що корелює з вивільненням ІЛ-2. Порівняння активності лізису пухлинних клітин, опосередкованої біспецифічними антитілами, з вивільненням цитокінів ІЛ-2 зображено на діаграмі розсіювання. Кореляція між продукуванням ІЛ-2 і лізисом пухлинних клітин U266 становить $R^2=0,37$.

На Фіг. 6 проілюстрована біспецифічна активність знищення U266, що корелює з вивільненням ІФН- γ . Порівняння активності лізису пухлинних клітин, опосередкованої біспецифічними антитілами, з вивільненням цитокінів ІФН- γ зображено на діаграмі розсіювання. Кореляція між продукуванням ІФН- γ і лізисом пухлинних клітин U266 становить $R^2=0,53$.

На Фіг. 7 проілюстрована біспецифічна активність знищення U266, що корелює з афінністю зв'язування з CD3. Порівняння активності лізису пухлинних клітин U266, опосередкованої біспецифічними антитілами за афінністю зв'язування з CD3, зображено на діаграмі розсіювання. Кореляція між ЕК50 знищення U266 і афінністю зв'язування білка становить $R^2=0,93$.

На Фіг. 8A-8D проілюстрований опосередкований біспецифічними антитілами лізис пухлинних клітин. Біспецифічні антитіла α CD3_F1F: aBCMA аналізували на здатність знищувати три різних лінії пухлинних клітин BCMA+ і одну лінію BCMA-негативних клітин шляхом перенаправлення активованих вихідних Т-клітин. В цьому експерименті пухлинні клітини змішували за активованими всіма Т-клітинами в співвідношенні Е:Т 10:1 разом з додаванням біспецифічного антитіла. На Фіг. 8A проілюстровано знищення клітин RPMI-8226, на Фіг. 8B проілюстровано знищення клітин NCI-H929, на Фіг. 8C проілюстровано знищення клітин U-266 і на Фіг. 8D проілюстровано знищення клітин K562, негативний контроль. Вісь х демонструє концентрацію антитіла, що застосовується, а вісь у демонструє % лізису пухлинних клітин через 6 годин після додавання антитіла.

На Фіг. 9A-9D проілюстровано опосередковане біспецифічними антитілами вивільнення ІЛ-2. Рівень вивільнення цитокінів ІЛ-2 вимірювали після культивування Т-клітин людини в спокої з різними лініями пухлинних клітин і дозами біспецифічного антитіла α CD3_F1F: aBCMA, які збільшувались. На Фіг. 9A проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами RPMI-8226, на Фіг. 9B проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами NCI-H929, на Фіг. 9C проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами U-266 і на Фіг. 9D проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами K562, негативний контроль.

На Фіг. 10A-10D проілюстровано опосередковане біспецифічними антитілами вивільнення ІФН- γ . Рівень вивільнення цитокіну ІФН- γ вимірювали після культивування Т-клітин людини в спокої з різними лініями пухлинних клітин і збільшуваними дозами біспецифічного антитіла α CD3_F1F: aBCMA. На Фіг. 10A проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами RPMI-8226, на Фіг. 10B проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами NCI-H929, на Фіг. 10C проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами U-266 і на Фіг. 10D проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами K562, негативний контроль.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

Щоб полегшити розуміння цього винаходу, ряд термінів визначено нижче.

Перед описом даних активних агентів і способів, слід розуміти, що цей винахід не обмежується конкретно описаною методологією, продуктами, пристроями і факторами, оскільки такі способи, пристрої і склади, звичайно, можуть видозмінюватися. Слід також розуміти, що застосовується в цьому документі термінологія призначена тільки для опису конкретних варіантів реалізації винаходу і не призначена для обмеження обсягу цього винаходу, який буде обмежено лише запасною формулою винаходу.

Необхідно відзначити, що в цьому документі і в поданій формулі винаходу форми однини включають позначені об'єкти у множині, якщо інше безпосередньо не впливає з контексту. Таким чином, наприклад, посилання на "потенційний лікарський препарат" відноситься до одного або більше таких потенційних кандидатів, а посилання на "спосіб" включає посилання на еквівалентні етапи і способи, відомі фахівцям в цій галузі техніки, і так далі.

Якщо не вказано інше, всі вжиті в цьому документі технічні та наукові терміни мають значення, які зазвичай припускаються фахівцем в цій галузі техніки, до якої належить винахід. Всі публікації, згадані в цьому документі, включені в цей документ за допомогою посилання з метою опису і розкриття пристроїв, складів і методів, які описані в публікації і які можуть застосовуватися в зв'язку з описаним вище винаходом.

У разі, коли передбачений діапазон значень, слід розуміти, що кожне проміжне значення, до десятої одиниці нижньої межі, якщо з контексту явно не впливає інше, між верхньою і нижньою

межею цього діапазону і будь-яке інше вказане або проміжне значення в цьому зазначеному діапазоні охоплюються в межах винаходу. Верхня і нижня межа цих менших діапазонів можуть бути незалежно включені в менші діапазони, а також включені в цей винахід, з урахуванням будь-якої конкретно виключеної межі в зазначеному діапазоні. У тих випадках, коли зазначений

5 діапазон включає одне або обидва з цих меж, в винахід також включені діапазони, що виключають будь-який або обидва з цих включених меж.

В подальшому описі викладені численні конкретні подробиці з метою забезпечення більш повного розуміння цього винаходу. Однак для фахівця в цій галузі техніки буде очевидно, що цей винахід може застосовуватися на практиці і без однієї або більше зазначених конкретних

10 подробиць. В інших випадках загальновідомі особливості та процедури, добре відомі фахівцям в цій галузі техніки, що не описуються з метою уникнення труднощі розуміння винаходу.

Зазвичай в цьому винаході застосовуються загальноприйняті способи синтезу білка, культури рекомбінантних клітин і виділення білка і методи рекомбінантних ДНК, відомі фахівцям в цій галузі техніки. Такі методи детально описані в літературі, див., наприклад, Maniatis, Fritsch & Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982 рік); Sambrook, Russell and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001 рік); Harlow, Lane and Harlow, Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. 1, Cold Spring Harbor Laboratory (1998 рік); і Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988 рік).

15

Визначення термінів

Під терміном "що містить" мається на увазі, що перераховані елементи потрібні для композиції/способу/набору, однак для формування композиції/способу/набору і тому подібного в рамках формули винаходу можуть бути включені і інші елементи.

20

Під терміном "складається по суті з" мається на увазі обмеження рамок описаної композиції або способу зазначеними матеріалами або поетапними діями, що не мають істотного впливу на основну і нову характеристику (характеристики) об'єкта винаходу.

25

Під терміном "що складається з" мається на увазі виключення будь-якого елемента, поетапної дії або інгредієнта, не вказаного в формулі винаходу, з композиції, способу або набору.

Терміни "лікарський засіб", "лікування" і тому подібне використовуються в цьому документі для загального позначення бажаного фармакологічного та/або фізіологічного ефекту. Ефект може бути профілактичним в сенсі повного або часткового запобігання захворювання або його симптому, та/або терапевтичним в сенсі часткового або повного лікування захворювання та/або небажаного ефекту, що відноситься до вказаного захворювання. Термін "лікування" в цьому документі охоплює будь-яке лікування захворювання у ссавця, і включає: (а) профілактику виникнення захворювання у суб'єкта, який, можливо, схильний до цього захворювання, проте якому не поставлений діагноз цього захворювання; (б) інгібування захворювання, тобто, зупинку його розвитку; або (с) полегшення захворювання, тобто, регресію захворювання. Терапевтичний агент можна вводити до, під час або після початку захворювання або травми. Лікування поточного захворювання, при якому лікування стабілізує або послаблює небажані клінічні симптоми у пацієнта, становить особливий інтерес. Таке лікування бажано виконувати до повної втрати функції уражених тканин. Лікарський засіб, що розглядається, можна вводити під час симптоматичної стадії захворювання, і, в деяких випадках, після симптоматичної стадії захворювання.

30

"Терапевтично ефективна кількість" означає кількість активного агента, необхідну для отримання терапевтичного сприятливого ефекту у суб'єкта. Наприклад, "терапевтично ефективна кількість" являє собою кількість, яка індукує, полегшує або іншим чином викликає поліпшення патологічних симптомів, прогресування захворювання або фізіологічних станів, асоційованих із захворюванням або, або поліпшує стійкість до розладу.

45

Терміни "суб'єкт", "індивід" і "пацієнт" в цьому документі використовуються на рівних підставах і відносяться до ссавця, що проходить оцінку на предмет лікування та/або проходить лікування. В одному варіанті реалізації ссавець є людиною. Терміни "суб'єкт", "індивід" і "пацієнт" без обмежень охоплюють індивідів з раком, аутоімунними захворюваннями, патогенними інфекціями і тому подібним. Суб'єкти можуть бути людьми, але включають і інших ссавців, особливо придатних для застосування в якості лабораторних моделей захворювань людини, наприклад, миша, щур тощо.

50

Терміни "рак", "новоутворення" і "пухлина" застосовуються в цьому документі як взаємозамінні для позначення клітин, які демонструють автономний нерегульований ріст таким чином, що вони демонструють аберантний фенотип зростання, що характеризується значною втратою контролю над проліферацією клітин. Клітини, що становлять інтерес для виявлення, аналізу або лікування в цій заявці, включають передракові (наприклад, доброякісні), злоякісні,

60

передметастатичні, метастатичні і неметастатичні клітини. Відомий рак практично кожної тканини. Фраза "ракове навантаження" відноситься до кількості ракових клітин або об'єму раку у суб'єкта. Відповідно, зниження ракового навантаження означає зменшення кількості ракових клітин або об'єму раку у суб'єкта. В цьому контексті термін "ракова клітина" відноситься до будь-якої клітини, яка являє собою ракову клітину або отримана з ракової клітини, наприклад, клону ракової клітини. Фахівцям в цій галузі техніки відомі багато типів ракових захворювань, включаючи солідні пухлини, такі як карциноми, саркоми, гліобластоми, меланоми, лімфоми, мієломи тощо, і циркулюючі злоякісні новоутворення, такі як лейкої, включаючи, зокрема, В-клітинні лейкої, Т-клітинні лейкої тощо. Приклади раку включають, але без обмежень, рак яєчників, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак легенів, рак простати, гепатоцелюлярний рак, рак шлунка, рак підшлункової залози, рак шийки матки, рак яєчників, рак печінки, рак сечового міхура, рак сечовивідних шляхів, рак щитовидної залози, рак нирки, карциному, меланому, рак голови та шиї і рак головного мозку.

Терміни "антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність" і "АЗКЦ" відносяться до реакції, опосередкованої клітинами, в якій неспецифічні цитотоксичні клітини, які експресують рецептори Fc, такі як природніклітини-кілери, нейтрофіли і макрофаги, розпізнають зв'язане антитіло на цільовій клітині і викликають лізис цільової клітини. Активність АЗКЦ може бути оцінена застосуванням способів, таких як описані в патенті США №5821337. АЗКЦ відноситься до антитілозалежного клітинноопосередкованого фагоцитозу.

"Ефекторні клітини" являють собою лейкоцити, які експресують один або більше рецепторів константної ділянки і виконують ефекторні функції.

"Цитокін" являє собою білок, що вивільняється однією клітиною для впливу на іншу клітину у якості міжклітинного медіатора. Цитокіни, що становлять інтерес, включають, без обмеження, цитокіни, які вивільняються з активованих Т клітин, наприклад ІЛ-2, ІФН-γ та ін.

Термін "неімунногенний" відноситься до матеріалу, який не ініціює, не провокує і не посилює імунну відповідь, при цьому імунна відповідь включає в себе адаптивну та/або вроджену імунну відповідь.

Термін "виділений" означає, що матеріал видобутий зі свого вихідного оточення (наприклад, природного середовища, якщо він зустрічається в природних умовах). Наприклад, природний полінуклеотид або поліпептид, присутній в живій тварині, не є виділеним, але той же полінуклеотид або поліпептид, відокремлений від матеріалів, спільно з ним присутніх в природній системі, є виділеним. Такі нуклеотиди можуть входити до складу вектора, та/або такі полінуклеотиди або поліпептиди можуть входити до складу композиції, і як і раніше бути виділеними в тому сенсі, що такий вектор або композиція не є частиною їх природного оточення.

Під терміном "фармацевтично прийнятна речовина" мають на увазі допоміжну речовину, яку можна застосовувати при отриманні фармацевтичної композиції, і яка є в цілому безпечною, нетоксичною і бажаною; цей термін включає допоміжні речовини, прийнятні як для ветеринарного використання, так і для фармацевтичного використання для лікування людей. Такі допоміжні речовини можуть бути твердими, рідкими, напіврідкими або, в разі аерозольної композиції, газоподібними.

Під терміном "фармацевтично прийнятні солі і складні ефіри" мають на увазі солі і складні ефіри, які є фармацевтично прийнятними і володіють бажаними фармакологічними властивостями. Такі солі включають солі, які можуть утворюватися при реакції кислих протонів, присутніх в сполуках, з неорганічними або органічними основами. Відповідні неорганічні солі включають солі, утворені лужними металами, наприклад, натрієм і калієм, магнієм, кальцієм і алюмінієм. Відповідні органічні солі включають солі, утворені органічними основами, наприклад, амініними основами, наприклад, етаноламіном, діетаноламіном, триетаноламіном, трометаміном, N-метилглюкаміном і тому подібним. Такі солі також включаютькислотно-адитивні солі, утворені неорганічними кислотами (наприклад, соляною і бромистоводневою кислотою) і органічними кислотами (наприклад, оцтовою кислотою, лимонною кислотою, малеїновою кислотою і алкан-і аренсульфоновими кислотами, наприклад, метансульфоновую кислотою і бензолсульфоновую кислотою). Фармацевтично прийнятні складні ефіри включають ефіри, утворені з карбокси-, сульфоніокси- і фосфонових груп, присутніх в сполуках, наприклад, C₁₋₆ алкілові ефіри. При наявності двох кислотних груп фармацевтично прийнятна сіль або складний ефір може являти собою монокислоту-моносіль або складний ефір або подвійну сіль, або складний ефір, і, аналогічним чином, при наявності більш ніж двох кислотних груп, деякі або всі з таких груп можуть перебувати в вигляді солі або етерифікованому вигляді. Сполуки, назви яких вказані в цьому винаході, можуть бути присутніми за межами у формі солі або складного ефіру, або у формі солі та/або складного ефіру, і мається на увазі, що

найменування таких сполук включають як вихідну сполуку (не сіль і не складний ефір), так і її фармацевтично прийнятні солі і складні ефіри. Крім того, деякі сполуки, назви яких вказані в цьому винаході, можуть бути присутніми в більш ніж одній стереоізомерній формі, і мається на увазі, що найменування таких сполук включають всі поодинокі стереоізмери і всі суміші (рацемічні або інші) таких стереоізомерів.

Терміни "фармацевтично прийнятний", "такий, що фізіологічно переноситься" і їх граматичні форми по відношенню до композицій, носіїв, розріджувачів і реагентів застосовуються на рівних підставах і означають, що зазначені матеріали можна вводити або наносити на організм людини без небажаних фізіологічних ефектів, які могли б стати на заваді введенню композиції.

"Гомологію" між двома послідовностями визначають за ідентичністю послідовностей. Якщо дві послідовності, які повинні порівнюватися одна з одною, відрізняються по довжині, ідентичність послідовності переважно відноситься до відсотку нуклеотидних залишків коротшої послідовності, які ідентичні нуклеотидним залишкам довшої послідовності. Зазвичай ідентичність послідовностей можна визначати за допомогою комп'ютерних програм, таких як програма Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711). Програма Bestfit застосовує локальний алгоритм гомології Сміта-Вотермана (Smith і Waterman), Advances in Applied Mathematics 2 (1981 рік), 482-489, для пошуку сегмента з найвищою ідентичністю послідовності між двома послідовностями. У разі застосування Bestfit або іншої програми вирівнювання послідовностей з метою визначення того, чи є ідентичною конкретна послідовність, наприклад, на 95 % еталонній послідовності, яка пропонується в цьому винаході, параметри переважно регулюють таким чином, щоб відсоток ідентичності розраховувався для всієї довжини еталонної послідовності, і при цьому, щоб допускалися проміжки в гомології аж до 5 % від загальної кількості нуклеотидів в еталонній послідовності. У разі застосування Bestfit так звані необов'язкові параметри переважно залишають в своїх попередньо встановлених ("за замовчуванням") значеннях. Відхилення, що з'являються при порівнянні цієї послідовності і описаних вище послідовностей, які пропонуються в цьому винаході, можуть бути викликані, наприклад, додаванням, делецією, заміною, вставкою або рекомбінацією. Таке порівняння послідовностей можна переважно виконувати за допомогою програми "fasta20u66" (версія 2.0u66, вересень 1998 року, розроблена William R. Pearson і University of Virginia; дивись також публікацію WR Pearson (1990 рік), Methods in Enzymology 183, 63-98, приклади, що додаються, і <http://workbench.sdsc.edu/>). Для цієї мети можуть застосовуватись налаштування параметрів "за замовчуванням".

Термін "варіант" відноситься до поліпептидів, які мають амінокислотні послідовності, які в деякій мірі відрізняються від поліпептиду з нативною послідовністю. Зазвичай варіанти амінокислотних послідовностей будуть мати, щонайменше, близько 80 % ідентичність послідовності, більш прийнятно, щонайменше, близько 90 % гомологічні за послідовністю. Варіанти амінокислотної послідовності можуть мати заміни, делеції та/або вставки в певних положеннях в еталонній амінокислотній послідовності.

Термін "вектор" в контексті цього документу позначає молекулу нуклеїнової кислоти, здатну переносити іншу нуклеїнову кислоту, з'єднану з нею. Один тип вектора являє собою "плазмід", яка відноситься до циклічної дволанцюгової петлі ДНК, в яку можуть бути ліговані додаткові сегменти ДНК. Інший тип вектора являє собою вірусний вектор, в якому додаткові сегменти ДНК можуть бути ліговані в вірусний геном. Певні вектори здатні до автономної реплікації в клітині-господарі, в яку вони введені (наприклад, бактеріальні вектори, що мають бактеріальну точку початку реплікації, і епісомальні вектори ссавців). Інші вектори (наприклад, не-епісомальні вектори ссавців) можуть бути інтегровані в геном клітини-господаря при введенні в клітину господаря і, таким чином, реплікуватись разом з геномом господаря. Більш того, деякі вектори здатні направляти експресію генів, з якими вони функціонально зв'язані. Такі вектори згадуються в цьому документі як "рекомбінантніекспресійнівектори" (або просто, "рекомбінантні вектори"). Загалом, вектори експресії, що використовуються в технологіях рекомбінантної ДНК, часто мають форму плазмід. В цьому описі винаходу "плазмід" і "вектор" можуть бути взаємозамінні, оскільки плазмід є формою вектору, яка використовується найбільш часто.

Термін "клітина-господар", що застосовується в цьому документі (або "рекомбінантна клітина-господар") призначений для позначення клітини, яка була генетично змінена або здатна генетично змінюватися шляхом введення екзогенного полінуклеотиду, такого як рекомбінантна плазмід або вектор. Слід розуміти, що такі терміни призначені для позначення не тільки конкретної клітини, що досліджується, але і клітин, що походять з неї. Оскільки деякі модифікації можуть відбутися в наступних поколіннях завдяки мутаціям або впливу навколишнього середовища, таке потомство не може, по суті, бути ідентичним батьківській

клітині, але все ще включено в термін "клітина-господар", як застосовується в цьому документі.

"Афінність зв'язування" зазвичай відноситься до сили сумарної кількості нековалентних взаємодій між одним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитілом або іншою зв'язуючою молекулою) та її партнером по зв'язуванню (наприклад, антигеном або рецептором). Афінність молекули X до її партнера Y, як правило, можна представити у вигляді константи дисоціації (Kd). Афінність можна виміряти за допомогою загальноприйнятих способів, відомих в цій галузі техніки, в тому числі тих, які описані в цьому документі. Нізкоафінні антитіла слабо зв'язують антиген (або рецептор) і схильні легко дисоціювати, тоді як високоафінні антитіла зв'язують антиген (або рецептор) більш щільно і мають тенденцію залишатися зв'язаними довше.

Якщо спеціально не вказано інше, термін "кон'югат", як описано і заявлено в цьому документі, визначається як гетерогенна молекула, утворена нековалентним приєднанням одного або більше фрагментів антитіла до однієї або більше молекули(ул) полімеру, при цьому гетерогенна молекула розчиняється у воді, тобто розчинна в фізіологічних рідинах, таких як кров, і при цьому гетерогенна молекула вільна від будь-якого структурованого агрегату. Кон'югат, що становить інтерес являє собою ПЕГ. В контексті вищенаведеного визначення термін "структурований агрегат" відноситься до (1) будь-якого агрегату молекул у водному розчині, що має структуру сфероїда або сфероїдної оболонки, таку, що гетерогенна молекула не перебуває у міцелі або іншій емульсійній структурі, і не фіксована в ліпідному бішарі, везикулі або ліпосомі; і (2) будь-якого агрегату молекул у твердій або нерозчинній формі, такий як матриця хроматографічних кульок, який не вивільняє гетерогенну молекулу в розчин при контакті з водною фазою. Відповідно, термін "кон'югат", як він визначений в цьому документі, охоплює вищезгадану гетерогенну молекулу у якості преципітату, осаду, матриці, яка піддається біоруйнації або іншій твердій речовини, здатних вивільняти гетерогенну молекулу у водний розчин при гідратації твердій речовини.

Слово "мітка" при використанні в цьому документі стосується до сполуки або композиції, які можливо детектувати, які прямо або непрямо кон'юговані з антитілом. Сама мітка може бути з можливістю виявлення сама собою (наприклад, мітки-радіоізотопи або флуоресцентні мітки) або, у разі ферментної мітки, може каталізувати такі хімічні зміни субстратної сполуки або композиції, які можна виявити.

Під "твердою фазою" мається на увазі безводна матриця, до якої може прикріплюватись антитіло за цим винаходом. Приклади твердих фаз, які охоплюються цим документом, включають ті, які сформовані частково або повністю зі скла (наприклад, скла з контрольованим розміром отворів), полісахаридів (наприклад, агарози), поліакриламід, полістиролу, полівінілового спирту та силіконів. В окремих випадках реалізації винаходу, в залежності від контексту, тверда фаза може містити лунку аналітичного планшета; в інших це колонка очищення (наприклад, колонка для афінної хроматографії). Цей термін також включає в себе переривчасту тверду фазу з дискретних частинок, таку як описана в патенті США № 4275149.

Антитіла, також звані імуноглобулінами, зазвичай містять щонайменше один важкий ланцюг і один легкий ланцюг, причому амінокінцевий домен важкого і легкого ланцюгів є варіабільним за послідовністю, і тому зазвичай називається доменом варіабельної ділянки, або варіабельним доменом важкого ланцюга (VH) і варіабельним доменом легкого ланцюга (VL). Ці два домени зазвичай зв'язуються один з одним, утворюючи специфічну ділянку зв'язування, хоча в цьому документі також обговорюється, що специфічне зв'язування також можна отримати із застосуванням тільки варіабельних послідовностей важкого ланцюга, і в цій галузі техніки відомо і застосовується велика кількість неприродних конфігурацій антитіл.

"Функціональне" або "біологічно активне" антитіло або антигензв'язуюча молекула (включаючи антитіла, що містять тільки важкі ланцюги, і біспецифічні триланцюгові антитілоподібні молекули (TCA - three-chain antibody-like molecules) в цьому документі) являють собою антитіло або молекулу, здатну виявляти одну або більше з його природних активностей при структурних, регуляторних, біохімічних або біофізичних явищах. Наприклад, функціональне антитіло або інша зв'язуюча молекула, наприклад, TCA, може мати здатність специфічно зв'язувати антиген, і це зв'язування, в свою чергу, може викликати або змінювати клітинні, або молекулярні явища, наприклад, передачу сигналу або ферментативну активність. Функціональне антитіло або інша зв'язуюча молекула, наприклад, TCA, також може блокувати активацію ліганду або рецептора або діяти як агоніст або антагоніст. Здатність антитіла або іншої зв'язуючої молекули, наприклад, TCA, проявляти одну або більше своїх природних активностей, залежить від кількох факторів, включаючи правильне згортання і складання поліпептидних ланцюгів.

Термін "антитіло" в цьому документі застосовують в його найбільш широкому сенсі; він специфічно охоплює моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, мономери, димери,

мультимери, поліспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), антитіла, що містять тільки важкий ланцюг, триланцюгові антитіла, одностанцюгові Fv-фрагменти, нанотіла тощо, а також включає фрагменти антитіл, за умови, що вони мають бажану біологічну активність (Miller і співавт. (2003) *Jour. of Immunology* 170: 4854-4861). Антитіла можуть бути антитілами миші, людини, гуманізованими, химерними антитілами або можуть походити від інших видів тварин.

Термін антитіло може стосуватись повнорозмірного важкого ланцюга, повнорозмірного легкого ланцюга, інтактної молекули імуноглобуліну; або імунологічно активного фрагменту будь-якого з цих поліпептидів, тобто, поліпептиду, який містить антигензв'язуючий сайт, імуноспецифічно зв'язує антиген або мішень, що становить інтерес, або їх фрагмент, причому такі мішені включають ракову клітину або клітини, що продукують аутоімунні антитіла, асоційовані з аутоімунним захворюванням, але не обмежуються ними. Описаний в цьому документі імуноглобулін може бути будь-якого типу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA), класу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2) або підкласу молекул імуноглобулінів, включаючи сконструйовані підкласи зі зміненими Fc -фрагменти, що забезпечують ослаблення або посилення активностіефекторних клітин. Імуноглобуліни можуть походити від будь-якого виду тварин. В одному аспекті імуноглобулін має в основному людське походження.

Термін "варіабельний"стосується того факту, що послідовності деяких частин варіабельних доменів сильно розрізняються у різних антитіл і роблять внесок у зв'язування і специфічність кожного конкретного антитіла по відношенню до його конкретного антигену. У той же час мінливість не є рівномірно розподіленою по варіабельності доменів антитіл. Вона зосереджена в трьох сегментах варіабельних доменів як легкого, так і важкого ланцюга, які називаються гіперваріабельними ділянками. Більш консервативні фрагменти варіабельних доменів називаються каркасними ділянками (FR). Кожен з варіабельних доменів нативних важких і легких ланцюгів містить чотири FR, які переважно приймають конфігураціюбета-листа, з'єднаних трьома гіперваріабельними ділянками, якіутворюють петлі, що з'єднують структуру бета-листа, а в деяких випадках - утворюють частину структури бета-листа. Гіперваріабельні ділянки кожного ланцюга об'єднані один з одним в безпосередній близькості від FR і, разом з гіперваріабельними ділянками іншого ланцюга, беруть участь в утворенні антигензв'язуючого сайту антитіл (див. Kabat і співавт. (1991), *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е вид. Public Health Service, National Institutes of Health, Бетесда, штат Меріленд). Константні домени не беруть безпосередньої участі у зв'язуванні антитіла з антигеном, однак виявляють різні ефекторні функції, такі як участь антитіла в антитілозалежній клітинній токсичності (АЗКЦ).

Термін "Гіперваріабельна ділянка", у разі якщо застосовується в цьому документі, відноситься до амінокислотних залишків антитіла, які відповідають за зв'язування антигену. Гіперваріабельна ділянка може містити амінокислотні залишки з "ділянки, що визначає компліментарність" або "CDR" та/або ці залишки з "гіперваріабельної петлі". Залишки "каркасної ділянки" або "FR" являють собою залишки варіабельного домену, відмінні від залишків гіперваріабельної ділянки, як визначено в цьому документі.

Варіабельні ділянки, що становлять інтерес, включають, щонайменше, одну послідовність CDR з варіабельних ділянок сімейства 2, наведених в цьому документі, зазвичай, щонайменше, 2 послідовності CDR і, більш звичайно, 3 послідовності CDR. Типові позначення CDR показані в цьому документі, проте фахівець в цій галузі техніки зрозуміє, що зазвичай застосовується ряд визначень CDR, включаючи визначення за Кабатом (див. "Zhao і співавт., A germline knowledge based computational approach for determining antibody complementarity determining regions. " *Mol Immunol.* 2010 рік; 47: 694-700), яке засноване на мінливості послідовності і є найбільш часто вживаним. Визначення по Чотіа засноване на розташуванні ділянок структурної петлі (Chothia і співавт. "Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. " *Nature.* 1989 рік; 342: 877-883). Альтернативні визначення CDR, що становлять інтерес, включають, без обмеження, ті, які розкриті в роботах Honegger, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool. " *J Mol Biol.* 2001 рік; 309: 657-670; Ofra і співавт. "Automated identification of complementarity determining regions (CDRs) reveals peculiar characteristics of CDRs and B cell epitopes. " *J Immunol.* 2008 рік; 181: 6230-6235; Almagro "Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires. " *J Mol Recognit.* 2004 рік; 17: 132-143; і Padlan і співавт. "Identification of specificity-determining residues in antibodies. " *Faseb J.* 1995 рік; 9: 133-139., кожна з яких явно включена в цей документ за допомогою посилання.

Термін "моноклональне антитіло" в цьому документі стосується антитіла, отриманого з популяції в значній мірі однорідних антитіл, тобто, окремі антитіла в складі популяції є ідентичними, за винятком мутацій, що відбуваються з природних причин, які можуть бути

присутніми в невеликих кількостях. Моноклональні антитіла є високоспецифічними, оскільки вони спрямовані проти одиночного антигенного сайту. Крім того, в порівнянні з препаратами поліклональних антитіл, які містять різні антитіла проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональних антитіло направлено протиодиночноїдетермінанти антигену. Крім

5 специфічності, моноклональні антитіла мають перевагу, що полягає в тому, що їх можна синтезувати у без забруднень іншими антитілами. Модифікатор'моноклональне" вказує на те, що антитіло отримано з практично однорідної популяції антитіл; його не слід інтерпретувати як вимогудо продукції антитіла за допомогою будь-якого конкретного способу.

Антитіла в цьому документі включають "химерні" антитіла, в яких частина важкого та/або

10 легкого ланцюга ідентична або гомологічна відповідним послідовностям антитіл конкретного виду тварин або антитіл, що належать до конкретного класу або підкласу, в той час як інша частина ланцюга(ів) ідентична або гомологічна відповідним послідовностям антитіл іншого виду тварин або антитіл, що належать до іншого класу або підкласу, а також фрагментам таких антитіл, за умови, що вони демонструють бажану біологічну активність (патент США №

15 4816567; і Morrison і співавт. (1984 рік) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Химерні антитіла, що становлять інтерес, включають "приматизовані" антитіла, що містять антигензв'язуючі послідовності варіабельного домену, отримані від примата відмінного від людини (наприклад, мартишки Старого Світу, мавпи тощо), і людські послідовності константної ділянки.

"Інтактний ланцюг антитіла" в цьому документі являє собою ланцюг, що містить повнорозмірну варіабельну ділянку і повнорозмірну константну ділянку (Fc). Інтактне'стандартне" антитіло містить інтактний легкий ланцюг та інтактний важкий ланцюг, а також константний домен легкого ланцюга (CL) і константні домени важкого ланцюга - CH1, шарнір, CH2 і CH3 (дляIgG, яке секретується). Інші ізотипи, наприклад, IgM або IgA, можуть

25 містити інші CH-домени. Константні домени можуть являти собою константні домени з нативною послідовністю (наприклад, константні домени людини з нативної послідовністю) або варіанти їх амінокислотних послідовностей. Інтактне антитіло може володіти однією або більше "ефекторними функціями", які відносяться до його біологічної активності, яка поа'язана з Fc-константною ділянкою (нативною послідовністюFc-ділянки або амінокислотною послідовністю варіантної Fc-ділянки) антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіл включають зв'язування C1q; комплемент-залежну цитотоксичність; зв'язування з Fc рецептором; антитіло-залежнуклітинно-опосередковану цитотоксичність(A3KЦ); фагоцитоз; і пригнічення рецепторів поверхні клітини. Варіанти константної ділянки включають варіанти, які змінюють ефекторний профіль, зв'язування з рецепторами Fc і тому подібним.

Залежно від амінокислотних послідовностей Fc (константних доменів) важких ланцюгів, антитіла і різноманітні антиген-зв'язуючі білки можуть бути надані як різні "класи". Існує п'ять основних класівFc ділянок важкого ланцюга: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі з них можуть бути

40 додатково розділені на "підкласи" (ізотипи), наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, і IgA2. Fc константні домени, які відповідають різним класам антитіл, можуть згадуватись як α , δ , ϵ , γ і μ , відповідно. Добревідомі суб'єдинична структура і тривимірна конфігурація різних класів імуноглобулінів. Форми Ig включають модифікації шарнірної ділянки або безшарнірні форми (Roux і співавт. (1998 рік) J. Immunol. 161: 4083-4090; Lund і співавт. (2000 рік) Eur. J. Biochem. 267:7246-7256; США 2005/0048572; США 2004/0229310). Легкі ланцюги антитіл будь-якого виду хребетних можна віднести до одного з двох типів, які називаються к- іl-ланцюгами, на основі амінокислотної послідовності їх константних доменів.

"Функціональна ділянка Fc" має "ефекторну функцію" нативної послідовності ділянки Fc. Типові ефекторні функції включають зв'язування C1q; K3Ц (комплементзалежну цитотоксичність); Зв'язування з Fc рецептором; A3KЦ; A3KF (антитілозалежний клітинний фагоцитоз); пригнічення рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора) тощо. Такі ефекторні функції зазвичай вимагають взаємодії Fc ділянки з рецептором, наприклад, рецепторами Fc γ RI; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB1; Fc γ RIIB2; Fc γ RIIA; Fc γ RIIB, і Fc рецепторомRn, що має низьку афінність; їх оцінку можна здійснити за допомогою різних аналізів, описаних, наприклад, у визначеннях в цьому документі. "Мертва" ділянка Fc є ділянкою Fc, мутованою з метою збереження активності по відношенню до, наприклад, збільшення

50 тривалості періоду напівжиття сироватки, яка, проте, не активує рецептор Fc, що має високу афінність.

"Нативна послідовність Fc-ділянки"містить амінокислотну послідовність, ідентичну амінокислотній послідовності Fc-ділянки, що зустрічається в природі. Нативні послідовностіFc-ділянок людини включають, наприклад, нативну послідовність Fc-ділянки IgG1 людини (відмінних від A і A аллотипи); нативну послідовність Fc-ділянки IgG2 людини; нативну

60

послідовність Fc-ділянки IgG3 людини; і нативну послідовність Fc-ділянки IgG4 людини, а також їх варіанти, що зустрічаються в природі.

"Варіантна Fc-ділянка" містить амінокислотну послідовність, що відрізняється від нативної послідовності Fc-ділянки за рахунок модифікації щонайменше однієї амінокислоти, переважно заміни однієї або більше амінокислот. переважно, варіантна Fc-ділянка містить щонайменше одну амінокислотну заміну в порівнянні з нативною послідовністю Fc-ділянки або Fc-ділянки вихідного поліпептиду, наприклад, від приблизно однієї до приблизно десяти амінокислотних заміни, і переважно від приблизно однієї до приблизно п'яти амінокислотних заміни в нативній послідовності Fc-ділянки або Fc-ділянки вихідного поліпептиду. Варіантна Fc-ділянка згідно з цим винаходом переважно має щонайменше близько 80 % гомології по відношенню до нативної послідовності Fc-ділянки та/або з Fc-ділянки вихідного поліпептиду, і найбільш переважно, щонайменше близько 90 % гомології по відношенню до них, більш переважно, щонайменше близько 95 % гомології по відношенню до них.

Варіантні послідовності Fc можуть містити три амінокислотних заміни в ділянці CH2 з метою ослаблення зв'язування FcγRI в положеннях 234, 235 і 237 відповідно до індексу ЕС (див., Duncan і співавт., (1988 рік) *Nature* 332: 563). Дві амінокислотні заміни в сайті зв'язування комплементу C1q в положеннях 330 і 331 відповідно до індексу ЕС, послаблюють фіксацію комплементу (див., Тао і співавт., *J. Exp. Med.* 178: 661 (1993 рік) і Canfield and Morrison, *J. Exp. Med.* 173:1483 (1991 рік)). Заміна залишків в положеннях 233-236 IgG1 або IgG2 людини і в положеннях 327, 330 і 331 IgG4 значно послаблює A3KЦ і K3Ц (див., наприклад, Armour KL. і співавт., 1999 год. *Eur J Immunol.* 29 (8): 2613-24; і Shields RL. і співавт., 2001 рік. *J Biol Chem.* 276(9):6591-604). Можливі інші варіанти Fc-ділянки, в тому числі, без обмежень, варіант, в якому ділянку, здатну утворювати дисульфідний зв'язок, видалено, або варіант, в якому видалені деякі амінокислотні залишки на N-кінці нативної Fc-форми або до них додано залишок метіоніну. Таким чином, в одному варіанті реалізації цього винаходу один або більше з Fc-фрагментів молекули scFc може містити одну або більше мутацій в шарнірній ділянці з метою усунення можливості утворення дисульфідних зв'язків. У ще одному варіанті реалізації шарнірна Fc-ділянка може бути повністю видалена. У ще одному варіанті реалізації молекула може містити варіант Fc-ділянки.

Крім того, можна сконструювати варіант Fc-ділянки, видаливши або значно послабивши ефекторні функції за допомогою заміни, делеції або додавання амінокислотних залишків для впливу на зв'язування комплементу або Fc рецептора. У якості необмежуючого прикладу, можлива делеція в сайті зв'язування комплементу, наприклад, C1q-зв'язуючому сайті. Методи отримання таких похідних послідовностей фрагмента Fc імуноглобулінів описані в міжнародних патентних публікаціях № WO 97/34631 і WO 96/32478. Крім того, можна модифікувати Fc домен шляхом фосфорилювання, сульфатування, ацилювання, глікозилювання, метилювання, фарнезилювання, ацетилювання, амідуювання і тому подібного.

Fc-ділянка може перебувати у формі, що містить нативні вуглеводні ланцюги, збільшену кількість вуглеводних ланцюгів в порівнянні з нативною формою або зменшену кількість вуглеводних ланцюгів в порівнянні з нативною формою, або може перебувати в аглікозильованій або деглікозильованій формі. Збільшення, зменшення, видалення або інші модифікації вуглеводних ланцюгів можна здійснити за допомогою способів, які часто застосовуються в цій галузі техніки, наприклад, хімічного способу, ферментативного способу або за допомогою експресії в генетично сконструйованій лінії клітин-продуцентів. Такі лінії клітин можуть включати мікроорганізми, наприклад, *Pichia Pastoris* (дріжджі) і клітинну лінію ссавців, наприклад, клітини CHO, які природним чином експресують глікозилюючі ферменти. Крім того, можна сконструювати мікроорганізми або клітини для експресії глікозилюючих ферментів або зробити їх нездатними до експресії ферментів глікозилювання (див., наприклад, Hamilton і співавт., *Science*, 313: 1 441 (2006 рік); Kanda, і співавт., *J. Biotechnology*, 130: 300 (2007 рік); Kitagawa і співавт., *J. Biol. Chem.*, 269 (27): 17872 (1994 рік); Ujita-Lee і співавт., *J. Biol. Chem.*, 264 (23): 13848 (1989 рік); Imai-Nishiya і співавт., *BMC Biotechnology* 7:84 (2007 рік); і WO 07/055916). Як приклад сконструйованих клітин з модифікованою активністю сіалювання, в клітини яєчника китайського хом'ячка і в клітини sf9 рекомбінантно ввели ген альфа-2,6-сіалілтрансферази 1. Антитіла, які експресуються цими рекомбінантними клітинами, піддаються сіалюванню продуктом екзогенного гену. Додатковий спосіб отримання молекул Fc з модифікованою кількістю вуглеводних залишків в порівнянні з безліччю нативних молекул включає розділення зазначеної множини молекул на глікозильовану і неглікозильовану фракції, наприклад, за допомогою афінної хроматографії з лектином (див., наприклад, WO 07/117505). Показано, що наявність конкретних глікозилюючих функціональних груп призводить до зміни функції імуноглобулінів. Наприклад, видалення вуглеводних ланцюгів з молекули Fc призводить до

різкого зниження афінності зв'язування з фрагментом C1q першого компонента комплементу C1 і ослаблення або втрати антитілозалежної клітинноопосередованої цитотоксичності (A3KЦ) або комплементзалежної цитотоксичності (K3Ц) і, отже, відсутності індукції непотрібних імунних реакцій *in vivo*. Додаткові важливі модифікації включають сіалювання і фукозилування: присутність сіалової кислоти в IgG корелювало з протизапальною активністю (див., наприклад, Kaneko, і співавт., Science 313: 760 (2006 рік)), в той час як видалення фукози з IgG призводить до посилення активності A3KЦ (див., наприклад, Shoj-Hosaka, і співавт., J. Biochem., 140:777 (2006 рік)).

В альтернативних варіантах реалізації антитіла за цим винаходом можуть містити послідовність Fc з посиленими ефекторними функціями, наприклад, підвищеною здатністю до зв'язування з FcγRIIIA і підвищеною активністю A3KЦ. Наприклад, приєднання фукози до N-зв'язаного глікану біля Asn-297 Fc-ділянки стерично ускладнює взаємодію Fc з FcγRIIIA, а видалення фукози за допомогою глікоінженерії може посилити зв'язування з FcγRIIIA, що призводить до >50-кратного збільшення активності A3KЦ в порівнянні з контрольними IgG1 дикого типу. Білкова інженерія дозволяє отримати різні варіанти з підвищеною афінністю зв'язування Fc з FcγRIIIA за рахунок мутацій амінокислот в Fc ділянці IgG1. Примітно, що потрібний мутант із заміною на аланін S298A/E333A/K334A демонструє 2-кратне посилення зв'язування з FcγRIIIA і функцію A3KЦ. Варіанти S239D/I332E (2X) і S239D/I332E/A330L (3X) характеризуються значним збільшенням спорідненості зв'язування з FcγRIIIA і посиленням A3KЦ *in vitro* та *in vivo*. Інші варіанти Fc-ділянки, виявлені за допомогою фагового дисплея, також демонстрували поліпшене зв'язування з FcγRIIIA і посилене знищення пухлинних клітин в моделях ксенотрансплантатів у мишей. Див., наприклад, Liu і співавт. (2014 рік) JBC 289 (6): 3571-90, явно включений в цей документ за допомогою посилання.

Термін "антитіло, що містить Fc-ділянку" відноситься до антитіла, що містить Fc-ділянку. C-кінцевий залишок лізину (залишок 447 відповідно до ЕС-системи нумерації) в Fc-ділянці можна видалити, наприклад, при очищенні антитіла або за допомогою рекомбінантної інженерії нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло. Відповідно, антитіло, що містить Fc-ділянку згідно з цим винаходом, може включати антитіло з K447 або без нього.

"Fv" являє собою мінімальний фрагмент антитіла, що містить повну ділянку, що розпізнає антиген і ділянку, що зв'язує антиген. Антитіла, що зв'язують CD3з цим винаходом містять димер одного домену варіабельної ділянки важкого ланцюга і одного домену варіабельної ділянки легкого ланцюга, з'єднаних жорстким нековалентним зв'язком; однак додаткові антитіла, наприклад, для застосування в мультиспецифічній конфігурації може містити VH за відсутності послідовності VL. Навіть один варіабельний домен (або половина Fv, що містить тільки три гіперваріабельні ділянки, специфічні для антигена) має здатність розпізнавати і зв'язувати антиген, хоча афінність може бути нижче, ніж афінність сайту зв'язування двох доменів.

Фрагмент Fab також містить константний домен легкого ланцюга і перший константний домен (CH1) важкого ланцюга. Фрагменти Fab' відрізняються від фрагментів Fab додатковими декількома залишками на карбоксильному кінці домену CH1 важкого ланцюга, включаючи один або більше цистеїнів з шарнірної ділянки антитіла. В цьому описі Fab'-SH є позначення Fab', в якому цистеїновий(ві) залишок(ки) константних доменів несе щонайменше одну вільну тиольну групу. Фрагменти F(ab')₂ антитіла спочатку отримували у вигляді пар фрагментів Fab', між якими знаходяться шарнірні залишки цистеїну. Відомі також інші варіанти хімічного зв'язування фрагментів антитіл.

"Гуманізовані" форми антитіл нелюдського походження (наприклад, гризунів), включаючи одноланцюгові антитіла, являють собою химерні антитіла (включаючи одноланцюгові антитіла), що містять мінімальні послідовності, що походять від імуноглобуліну нелюдського походження. Див., наприклад, Jones і співавт., (1986 рік) Nature 321: 522-525; Chothia і співавт., (1989 рік) Nature 342: 877; Riechmann і співавт., (1992 рік) J. Mol. Biol. 224, 487-499; Foote and Winter, (1992 рік) J. Mol. Biol. 224: 487-499; Presta і співавт., (1993 рік) J. Immunol. 151, 2623-2632; Werther і співавт., (1996 рік) J. Immunol. Methods 157: 4986-4995; i Presta і співавт., (2001 рік) Thromb. Haemost. 85: 379-389. Додаткову інформацію див. в патентах США № 5225539; 6548640; 6982321; 5585089; 5693761; 6407213; Jones і співавт., (1986 рік) Nature, 321: 522-525; i Riechmann і співавт., (1988 рік) Nature 332: 323-329.

В цьому контексті термін "одноланцюгове антитіло" означає один поліпептидний ланцюг, що містить один або більше антигензв'язуючих доменів, які зв'язують епітоп антигену, при цьому такі домени отримані з або мають ідентичність послідовності з варіабельною ділянкою важкого або легкого ланцюга антитіла. Частини такої варіабельної ділянки можуть кодуватися генними сегментами V_H або V_L, генними сегментами D і J_H або генними сегментами J_L. Варіабельна ділянка може кодуватися перебудованими генними сегментами V_HDJ_H, V_LDJ_L, V_HJ_L або V_LJ_L. Генні

сегменти V-, D- і J- можуть бути отримані від людей і різних тварин, включаючи птахів, риб, акул, ссавців, гризунів, приматів, відмінних від людини, верблюдів, лам, кроликів і тому подібних.

CD3-зв'язуючі антитіла за цим винаходом знаходять конкретне застосування в мультиспецифічних конфігураціях, які включають, без обмеження, біспецифічні антитіла, трифункціональні антитіла тощо. Велика розмаїтість способів і конфігурацій білків відомо і застосовується в біспецифічних моноклональних антитілах (бсМАт), тріспецифічних антитілах і тому подібних.

БсМАт першого покоління склалися з двох важких і двох легких ланцюгів, по одній від двох різних антитіл. Дві Fab ділянки спрямовані проти двох антигенів. Fc-ділянка складається з двох важких ланцюгів і утворює третій сайт зв'язування з Fc рецептором на імунних клітинах (див., наприклад, Lindhofer і співавт., *The Journal of Immunology*, Том 155, стор. 219-225, 1995 рік). Антитіла можуть бути з одного або різних видів. Наприклад, клітинні лінії, які експресують антитіла щури і миші, секретують функціональні біспецифічні Ат через переважне, обмежене видом, спарювання важких і легких ланцюгів. В інших варіантах реалізації винаходу Fc-ділянки сконструйовані так, що вони підходять один одному тільки певним чином.

Інші типи біспецифічних антитіл включають хімічно зв'язані Fab, що складаються тільки з ділянок Fab. Два хімічно пов'язаних фрагмента Fab або Fab2 утворюють штучне антитіло, яке зв'язується з двома різними антигенами, що робить його типом біспецифічного антитіла. Виходять антигензв'язуючі фрагменти (Fab або Fab2) двох різних моноклональних антитіл зв'язані хімічними засобами, такими як тіоефір (див., Glennie, MJ і співавт., *Journal of immunology* 139, стор. 2367-75, 1987 рік; Peter Borchmann і співавт., *Blood*, Том 100, № 9, стор. 3101-3107, 2002 рік).

Різні інші способи отримання полівалентних штучних антитіл були розроблені шляхом рекомбінантного злиття варіабельних доменів двох антитіл. Одноланцюговий варіабельний фрагмент (scFv) являє собою злитий білок варіабельних ділянок важких (VH) і легких ланцюгів (VL) імуноглобулінів, пов'язаних з коротким лінкерним пептидом з 10-25 амінокислот. Зазвичай лінкер насичений гліцином для гнучкості, а також серином або треоніном для розчинності і може з'єднувати N-кінець VH з C-кінцем VL, або навпаки. Біспецифічні одноланцюгові варіабельні фрагменти (ди-scFvs, бі-scFvs) можуть бути сконструйовані шляхом сполучення двох scFv з різною специфічністю. Виробляється один пептидний ланцюг з двома ділянками VH і двома ділянками VL, що призводить до отримання двоавалентних scFv.

Біспецифічні тандемні scFv також відомі як біспецифічні активатори, що залучають Т-клітини (BiTE-Bispecific T cell Engager). Біспецифічні scFv можуть бути створені за допомогою лінкерних пептидів, які є занадто короткими для того, щоб дві варіабельні ділянки склалися разом (довжиною близько п'яти амінокислот), що змушує scFv димеризуватись. Цей тип відомий як диатіла (Adams і співавт., *British journal of cancer* 77, стор. 1405-12, 1998 рік). Технологія платформи двоафінного перенацілювання (DART-Dual-Affinity Re-Targeting) (MacroGenics, Роквілл, штат Меріленд). Ця технологія злиття білків застосовує два одноланцюгових варіабельних фрагмента (scFv) різних антитіл на одному пептидному ланцюгу довжиною близько 55 кілодальтон. SCORPION Therapeutics (Emergent Biosolutions, Inc., Сіетл, штат Вашингтон) об'єднує два антигензв'язуючих домени в одноланцюговий білок. Один зв'язуючий домен знаходиться на C-кінці, а другий зв'язуючий домен знаходиться на N-кінці ефекторного домену на основі Fc ділянок імуноглобуліну.

Тетравалентні і біспецифічні подібні до антитіл білки також включають DVD-Ig, які сконструйовані з двох моноклональних антитіл (Wu, C. і співавт., *Nature Biotechnology*, 25, стр. 1290-1297, 2007 рік). Для конструювання молекули DVD-Ig домени V двох МАТ зливаються в тандемі з допомогою короткого лінкера (TVAAP) з варіабельним доменом легкого ланцюга (VL) першого антитіла на N-кінці, за яким йдуть VL і Ck інших антитіл для утворення легкої ланцюга білка DVD-Ig. Аналогічним чином, варіабельні ділянки важкого (VH) ланцюга двох МАТ зливаються в тандемі з допомогою короткого лінкера (ASTKGP) з першим антитілом на N-кінці, за яким слідує інше антитіло і константні домени важкого ланцюга з утворенням важкого ланцюга (VH1/VL1) білка DVD-Ig. Всі константні домени легкого ланцюга і важкого ланцюга зберігаються в конструкції DVD-Ig, оскільки вони є критичними для утворення дисульфід-зв'язаної повної IgG-подібної молекули. Котрансфекція клітин ссавців експресійними векторами, що кодують легкий ланцюг і важкий ланцюг DVD-Ig, призводить до секреції IgG-подібної молекули одного виду з молекулярною масою приблизно 200 кДа. Ця молекула тепер має чотири сайти зв'язування, по 2 від кожного МАТ.

Термін "біспецифічна триланцюгова антитіло-подібна молекула" або "ТСА" (three-chain antibody) застосовується в цьому документі для позначення антитіло-подібних молекул, що

включають, що складаються по суті або складаються з трьох поліпептидних субодиниць, дві з яких включають в себе, складаються по суті з або складаються з одного важкого і одного легкого ланцюга моноклонального антитіла або функціональних антигензв'язуючих фрагментів таких ланцюгів антитіла, що містять антигензв'язуючу ділянку і щонайменше один домен СН. Ця пара важкий ланцюг/легкий ланцюг має специфічність зв'язування для першого антигену. Третя поліпептидна субодиниця містить, складається по суті або складається з антитіла з тільки важким ланцюгом, що містить Fc-ділянку, що містить домени СН2та/або СН3, та/або СН4, за відсутності домену СН1, і антигензв'язуючий домен, який зв'язує епітоп другого антигену або інший епітоп першого антигену, при цьому такий зв'язуючий домен походить з або має ідентичність послідовності з варіабельною ділянкою важкого або легкого ланцюга антитіла. Частини такої варіабельної ділянки можуть кодуватися генними сегментами V_H або V_L, генними сегментами D і J_H або генними сегментами J_L. Варіабельна ділянка може кодуватися перебудованими генними сегментами V_HDJ_H, V_LDJ_L, V_HJ_L або V_LJ_L.

Білок TCA, що використовує "антитіло тільки з важким ланцюгом" або "антитіло з важким ланцюгом" або "поліпептид важкого ланцюга", в цьому контексті означає одностанцюгове антитіло, що містить константні ділянки важкого ланцюга СН2та/або СН3, та/або СН4, але не має домену СН1. В одному варіанті реалізації винаходу антитіло з важким ланцюгом складається з антигензв'язуючого домену, щонайменше, частини шарнірної ділянки та доменів СН2 і СН3. В іншому варіанті реалізації винаходу антитіло з важким ланцюгом складається з антигензв'язуючого домену, щонайменше, частини шарнірної ділянки та домену СН2. У подальшому варіанті реалізації винаходу антитіло з важким ланцюгом складається з антигензв'язуючого домену, щонайменше, частини шарнірної ділянки та домену СН3. Антитіла з важким ланцюгом, в яких домен СН2та/або СН3 укорочений, також включені в цей документ. У подальшому варіанті реалізації винаходу важкий ланцюг складається з антигензв'язуючого домену і, щонайменше, одного домену СН (СН1, СН2, СН3 або СН4), але без шарнірної ділянки. Антитіло тільки з важким ланцюгом може бути у формі димера, в якому два важкі ланцюги дисульфідні зв'язані один з одним або ковалентно або нековалентно зв'язані один з одним. Антитіло з важким ланцюгом може належати до підкласу IgG, але антитіла, що належать до інших підкласів, таких як підклас IgM, IgA, IgD і IgE, також включені в цей документ. У конкретному варіанті реалізації винаходу антитіло з важким ланцюгом відноситься до підтипу IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4, зокрема підтипу IgG1.

Антитіла з важким ланцюгом становлять близько однієї четвертої частини антитіл IgG, які продукуються у верблюжих, наприклад, верблюдами і ламами (Hamers-Casterman C., і співавт. Nature. 363, 446-448 (1993 рік)). Ці антитіла утворені двома важкими ланцюгами, але позбавлені легких ланцюгів. Як наслідок, варіабельна антигензв'язуюча частина називається доменом V_{HH} і являє собою найменший інтактний антигензв'язуючий сайт, який зустрічається в природі, довжиною всього близько 120 амінокислот (Desmyter A., і співавт. J. Biol. Chem. 276, 26285-26290 (2001 рік)). Антитіла з важким ланцюгом з високою специфічністю і афінністю можуть вироблятися проти різних антигенів за допомогою імунізації (van der Linden, R. H., і співавт. Biochim. Biophys. Acta. 1431, 37-46 (1999 рік)), а частина V_{HH} може бути легко клонована і експресована в дріжджах (Frenken, LGJ, і співавт. J. Biotechnol. 78, 11-21 (2000 рік)). Їх рівні експресії, розчинності і стабільності значно вище, ніж у класичних фрагментів F(ab) або Fv (Ghahroudi, MA і співавт. FEBS Lett. 414, 521-526 (1997 рік)). Також було показано, що акули мають один V_H-подібний домен в своїх антитілах, який називається VNAR. (Nuttall і співавт. Eur. J. Biochem. 270, 3543-3554 (2003 рік); Nuttall і співавт., Function and Bioinformatics 55, 187-197 (2004 рік); Dooley і співавт., Molecular Immunology 40, 25-33 (2003 рік)).

Антитіло або антигензв'язуюча молекула, включаючи антитіла, що містять тільки важкий ланцюг, і біспецифічні триланцюгові антитілоподібні молекули (TCA) в цьому документі, "які зв'язують" антиген, що становить інтерес, являють собою молекули, які зв'язують антиген з достатньою афінністю, так що антитіло або зв'язуюча молекула корисні в якості діагностичного та/або терапевтичного агента при націлювання на антиген і не мають значної перехресної взаємодії з іншими білками. У таких варіантах реалізації винаходу ступінь зв'язування антитіла або іншої зв'язуючої молекули з нецільовим антигеном становитиме не більше 10 %, як визначено аналізом протокової цитометрії (FACS-fluorescence activated cell sorting) або радіоіммунопреципітацією (РІП)

Білки

Цей винахід забезпечує сімейство споріднених антитіл, які зв'язуються і активують передачу сигналів CD3, наприклад, через активацію CD3+Т-клітин. Антитіла в цьому сімействі містять набір послідовностей CDR, як визначено в цьому документі, і прикладами яких є надані послідовності V_H з SEQ ID NO: 1-18. Це сімейство антитіл забезпечує ряд переваг, які сприяють

його корисності у якості клінічного лікарського засобу(ів). Антитіла в цьому сімействі включають членів з рядом афінностей зв'язування, що дозволяють вибирати конкретну послідовність з бажаною афінністю. Здатність точно налаштовувати афінність має особливе значення для керування рівнем активації CD3 у індивіда, якого лікують, а отже, і для зниження токсичності.

Наприклад, якщо метою є пухлинні антигени, присутні в невеликій кількості (менше 10000 молекул на клітину), очікується, що кращими є високоафінні зв'язувачі CD3 (<30 нМ). Якщо метою є пухлинні антигени, присутні у великій кількості (понад 50000 молекул на клітину), перевагу надають низькоафінним зв'язувачам CD3 (> 50 нМ). Окремо від афінності може визначатись здатність антитіла індукувати вивільнення цитокінів при зв'язуванні Т клітин, наприклад, вивільнення ІЛ-2, ІФН-γ і ін., в умовах, в яких вивільнення цитокінів може бути бажаним.

Відповідне антитіло може бути вибрано з тих, які надані в цьому документі для розробки і застосування, включаючи без обмеження застосування в якості біспецифічного антитіла. Визначення афінності до білка-кандидату може бути виконано із застосуванням способів, відомих в цій галузі техніки, наприклад, вимірювання *Biacore* і тому подібного. Члени сімейства антитіл можуть мати афінність до CD3 з K_d від близько 10^{-6} до близько 10^{-11} , включаючи без обмежень: від близько 10^{-6} до близько 10^{-10} ; від близько 10^{-6} до близько 10^{-9} ; від близько 10^{-6} до близько 10^{-8} ; від близько 10^{-8} до близько 10^{-11} ; від близько 10^{-8} до близько 10^{-10} ; від близько 10^{-8} до близько 10^{-9} ; від близько 10^{-9} до близько 10^{-11} ; від близько 10^{-9} до близько 10^{-10} ; або будь-яке значення в цих діапазонах. Вибір афінності може бути підтверджений біологічною оцінкою активації Т-клітин, наприклад, *in vitro* або в доклінічній моделі, і оцінкою потенційної токсичності. Вимірювання вивільнення цитокінів може здійснюватися за допомогою будь-якого зручного аналізу, включаючи, але не обмежуючись ними, аналізи описані в прикладах.

Стимуляція рецептора Т-клітини (ТКР) шляхом зв'язування комплексів МН-пептид або антитіл до ТКР/CD3 ініціює активацію Т-клітин. Прикладами антитіл до ТКР/CD3, які активують Т-клітини, є ОКТ3 і UCNT1. Ці антитіла проти CD3 перехресно конкурують за зв'язування з CD3 на Т-клітинах і зазвичай застосовуються в аналізах активації Т-клітин. Антитіла проти CD3 за цим винаходом перехресно конкурують з ОКТ3 за зв'язування з CD3 людини. Залежно від афінності зв'язування CD3 і епітопу на CD3 антитіла проти CD3 активували Т-клітини з різними функціональними результатами. Інкубація *in vitro* Т-клітин людини з низькоафінними антитілами проти CD3 приводила до неповної активації Т-клітин, низької продукції ІЛ-2 та ІЛ-10. Навпаки, високоафінні зв'язуючі CD3 активували Т-клітини, щоб продукувати значно більше ІЛ-2 та інших цитокінів. Низькоафінні антитіла проти CD3 вважаються частковими агоністами, які вибірково індукують деякі ефекторні функції, сильне знищення пухлини і активацію CD69, але не викликають інших, таких як продукція ІЛ-2 та ІЛ-10. Високоафінні зв'язуючі за цим винаходом є повними агоністами, що активують багато імунних ефекторних функцій Т-клітин. Сила взаємодії з CD3 і епітопом, що впізнається, призвела до якісно різної активації Т-клітин. Максимальна продукція цитокінів Т-клітинами, які були активованими низькоафінними антитілами проти CD3, була нижче, ніж при максимальній активації високоафінними антитілами проти CD3. У деяких варіантах реалізації антитіло за цим винаходом призводить до вивільнення менших кількостей одного або обох ІЛ-2 та ІЛ-10 при об'єднанні з Т-клітинами в аналізі активації в порівнянні з еталонним антитілом проти CD3 в тому ж аналізі, при цьому еталонне антитіло може являти собою ID 304703 (SEQ ID NO: 22) або антитіло з еквівалентної афінністю. Максимальне вивільнення ІЛ-2 та/або ІЛ-10 може становити менше ніж близько 75 % вивільнення за допомогою еталонного антитіла, менш ніж близько 50 % вивільнення за допомогою еталонного антитіла, і може становити менше ніж близько 25 % вивільнення за допомогою еталонного антитіла, і може становити менше ніж близько 10 % вивільнення за допомогою еталонного антитіла.

У деяких варіантах реалізації винаходу пропонуються біспецифічні або мультиспецифічні антитіла, які можуть мати будь-яку з обговорюваних в цьому документі конфігурацій, включаючи, але не обмежуючись, біспецифічну триланцюгову конфігурацію. Біспецифічні антитіла містять щонайменше варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла, специфічного до білка, відмінного від CD3, і можуть містити варіабельну ділянку важкого і легкого ланцюга. У деяких таких варіантах реалізації винаходу друга специфічність антитіла зв'язується з антигеном, асоційованим з пухлиною, націлюючим антигеном, наприклад, інтегринамитою, патогенним антигеном, білком контрольної точки і тому подібним. Різні формати біспецифічних антитіл знаходяться в межах обсягу цього винаходу, включаючи, без обмеження, одноланцюгові поліпептиди, дволанцюгові поліпептиди, триланцюгові поліпептиди, чотириланцюгові поліпептиди і кратні їм.

Сімейство CD3-специфічних антитіл містить домен VH, що містить послідовності CDR1,

CDR2 і CDR3 в каркасі VH людини. Послідовності CDR можуть бути розташовані, наприклад, в ділянці амінокислотних залишків 26-33; 51-58; і 97-112 для CDR1, CDR2 і CDR3, відповідно, наданих типових послідовностей варіабельної ділянки, викладених в SEQ ID NO: 1-18. Фахівцю в цій галузі техніки повинно бути зрозуміло, що послідовності CDR можуть перебувати в іншому положенні, в разі якщо обрана інша каркасна послідовність, хоча зазвичай порядок послідовностей буде залишатися тим же.

Послідовності CDR для антитіла сімейства 2 можуть мати наступні формули послідовності. X позначає варіабельну амінокислоту, яка може являти собою специфічні амінокислоти, як зазначено нижче.

CDR1

G₁ F₂ T₃ F₄ X₅ X₆ Y₇ A₈

при цьому:

X₅ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₅ являє собою D, A або H; в деяких варіантах реалізації винаходу X₅ являє собою D.

X₆ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₆ являє собою D або N, в деяких варіантах реалізації винаходу X₆ являє собою D.

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR1 анти-CD3 антитіла сімейства 2 містить послідовність визначену в будь-який з SEQ ID NO: 1-18, залишках 26-33.

CDR2

I₁" S₂" W₃" N₄" S₅" G₆" S₇" I₈"

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR2 антитіла проти CD3 сімейства 2 містить послідовність, визначену в будь-який з SEQ ID NO: 1-18, залишки 51-58.

CDR3

A₁" K₂" D₃" S₄" R₅" G₆" Y₇" G₈" X₉" Y₁₀" X₁₁" X₁₂" G₁₃" G₁₂" A₁₅" Y₁₆"

при цьому:

X₉ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₉ являє собою D або S; в деяких варіантах реалізації винаходу X₉ являє собою D;

X₁₁ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₁₁ являє собою R або S.

X₁₂ може бути будь-якою амінокислотою; в деяких варіантах реалізації винаходу X₁₂ являє собою L або R.

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CD3 анти-CD3 антитіла сімейства 2 має формулу AKDSRGYGDYX₁₁"X₁₂"GGAY, в якій X₁₁"X₁₂" являють собою визначене вище. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR3 антитіла проти CD3 сімейства 2 містить послідовність, викладену в будь-який з SEQ ID NO: 1-18, залишки 97-112.

У деяких варіантах реалізації винаходу CD3-зв'язуючий домен VH пов'язаний з доменом варіабельної ділянки легкого ланцюга. У деяких таких варіантах реалізації винаходу легкий ланцюг являє собою фіксований легкий ланцюг. У деяких варіантах реалізації винаходу легкий ланцюг містить домен VL з послідовностями CDR1, CDR2 і CDR3 в каркасі VL людини. Послідовності CDR можуть бути послідовностями з SEQ ID NO 1-9. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR1 містить амінокислотні залишки 27-32; 50-52; 89-97 для CDR1, CDR2, CDR3 відповідно.

У деяких варіантах реалізації винаходу послідовності CDR антитіла сімейства 2 мають послідовність з щонайменше 85 % ідентичністю, щонайменше 90 % ідентичністю, щонайменше 95 % ідентичністю, щонайменше 99 % ідентичністю відносно послідовності CDR або набору послідовностей CDR в будь-який з SEQ ID NO: 1-18. У деяких варіантах реалізації винаходу послідовність CDR3а цим винаходом містить одну, дві, три або більше амінокислотних замін по відношенню до послідовності CDR або набору послідовностей CDR в будь-який з SEQ ID NO: 1-18. У деяких варіантах реалізації винаходу зазначена амінокислотна заміна(и) являє собою одну або більше в положенні 5 або 10 з CDR1, положенні 2, 6 або 7 з CDR2, положенні 1, 8, 9 або 10 з CDR3 відносно формул, наведених вище.

Коли білок за цим винаходом являє собою біспецифічне антитіло, один зв'язуючий фрагмент, тобто комбінація VH/VL або тільки VH, є специфічним до CD3 людини, тоді як інше плече може бути специфічним до клітин-мішеней, включаючи ракові клітини, такі як клітини яєчника, молочної залози, шлунково-кишкового тракту, головного мозку, голови і шиї, передміхурової залози, товстої кишки і рак легені тощо, а також гематологічні пухлини, такі як В-клітинні пухлини, включаючи лейкомії, лімфоми, саркоми, карциноми, пухлини нервових клітин, плоскоклітинні карциноми, ембріонально-клітинні пухлини, метастази, недиференційовані

пухлини, семиноми, меланоми, мієломи, нейробластоми, пухлини змішаних клітин, новоутворення, викликані інфекційними агентами, і інші злоякісні новоутворення, клітини, інфіковані патогеном, аутореактивні клітини, які викликають запалення та/або аутоімунну реакцію. Частина, яка не містить CD3, також може бути специфічною до імунорегуляторного білку, як буде описано в цьому документі.

Пухлиноасоційовані антигени (TAA) відносно обмежені пухлинними клітинами, тоді як пухлиноспецифічні антигени (TSA) є унікальними для пухлинних клітин. TSA і TAA зазвичай являють собою частини внутрішньоклітинних молекул, що експресуються на поверхні клітини як частина основного комплексу гістосумісності.

Тканиноспецифічні антигени диференціації являють собою молекули, присутні на пухлинних клітинах і їх нормальних клітинних аналогах. Пухлиноасоційовані антигени, про які відомо, що вони розпізнаються терапевтичними антитілами, діляться на кілька різних категорій. Гематопоетичні антигени диференціації являють собою глікопротеїни, які зазвичай зв'язані з групами кластера диференціювання (CD) і включають в себе CD20, CD30, CD33 і CD52. Антигени диференціації клітинної поверхні являють собою різноманітну групу глікопротеїнів і вуглеводів, які знаходяться на поверхні як нормальних, так і пухлинних клітин. Антигени, які беруть участь у передачі сигналів росту і диференціювання, часто є факторами росту і рецепторами факторів росту. Фактори зростання, які є мішенями для антитіл у онкопациєнтів, включають CEA, рецептор епідермального фактора росту (EGFR (epidermal growth factor receptor); також відомий як ERBB1), ERBB2 (також відомий як HER2), ERBB3, MET (також відомий як HGFR), рецептор інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF1R-insulin-like growth factor 1 receptor), рецептор ефріна A3 (EPHA3), рецептор ФНП-залежного апоптоз-індукуючого ліганда 1 (TRAILR1 (tumor necrosis factor (TNF) -related apoptosis-inducing ligand receptor 1); також відомий як TNFRSF10A), TRAILR2 (також відомий як TNFRSF10B) і ліганд рецептора-активатора ядерного фактора κ B (RANKL; також відомий як TNFSF11). Антигенами, які беруть участь в ангіогенезі, зазвичай є білки або фактори росту, які підтримують утворення нових мікроциркуляторних шляхів, включаючи фактор росту судинного ендотелію (VEGF-vascular endothelial growth factor), рецептор VEGF (VEGFR), інтегрин α V β 3 і інтегрин α 5 β 1. Строма пухлини і позаклітинний матрикс є необхідними опорними структурами для пухлини. Антигени стромального і позаклітинного матриксу, які є терапевтичними мішенями, включають білок активації фібробластів (FAP-fibroblast activation protein) і тенасцин.

Приклади лікарських засобів на основі моноклональних антитіл, корисних в біспецифічних конфігураціях, включають, без обмеження, рітуксімаб; Ібрітумомаб; Тіуксетан; Тозітумомаб; Брентуксімаб; ведотін; Гемтузумаб; озогаміцин; алемтузумаб; IG101; адекатумумаб; Лабетузумаб; huA33; Пемтумомаб; ореговомаб; CC49 (мінретумомаб); cG250; J591; MOv18; MORAb-003 (фарлетузумаб); 3F8, ch14. 18; KW-2871; hu3S193; IgN311; бевацизумаб; IM-2C6; CDP791; Етарацизумаб; Волоцксімаб; Цетуксімаб, панітумумаб, німотузумаб; 806; трастузумаб; пертузумаб; MM-121; AMG 102, METMAB; SCH 900105; AVE1642, IMC-A12, MK-0646, R1507; CP 751871; KB004; IIIA4; Мопатумумаб (HGS-ETR1); HGS-ETR2; CS-1008; Деносумаб; Сибротузумаб; F19; і 81C6.

Рецептори імунної контрольної точки, які найбільш активно вивчалися в контексті клінічної імунотерапії раку, антиген 4 асоційований з цитотоксичними Т-лімфоцитами (CTLA4-cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen4; також відомий як CD152) і білок 1 запрограмованої смерті клітини (PD1-programmed cell death protein 1; також відомий як CD279) - обидва являють собою інгібіторні рецептори. Клінічна активність антитіл, які блокують будь-який з цих рецепторів, передбачає, що протипухлинний імунітет може бути посилений на декількох рівнях і що комбінаторні стратегії можуть бути розумно розроблені, керуючись механістичними міркуваннями і доклінічними моделями.

Двома лігандами для PD1 є ліганд 1 PD1 (PDL1; також відомий як B7-H1 і CD274) і PDL2 (також відомий як B7-DC і CD273). PDL1 експресується на ракових клітинах і за допомогою зв'язування з його рецептором PD1 на Т-клітинах пригнічує активацію/функцію Т-клітин.

Ген 3 активації лімфоцитів (LAG3; також відомий як CD223), 2B4 (також відомий як CD244), послаблювач (attenuator) В і Т-лімфоцитів (BTLA; також відомий як CD272), білок 3 мембрани Т-клітин (TIM3; також відомий як HAVcr2), рецептор аденозину А2а (A2aR) і сімейство рецепторів пригнічення цитотоксичності, були зв'язані з пригніченням активності лімфоцитів і в деяких випадках з індукцією анемії лімфоцитів. Націлювання антитіл на ці рецептори можна застосовувати в способах за цим винаходом.

Агенти, які є агоністичними імунній коstimулюючій молекулі, також корисні в способах за цим винаходом. Такі агенти включають агоністи або CD40 і OX40. CD40 являє собою коstimулюючий білок, виявлений в антигенпрезентуючих клітинах (АПК) і необхідний для їх

активації. Ці АПК включають фагоцити (макрофаги і дендритні клітини) і В-клітини. CD40 є частиною сімейства рецепторів ФНП. Первинними активуючими сигнальними молекулами для CD40 є ІФНγ і ліганд CD40 (CD40L). Стимуляція через CD40 активує макрофаги.

Антитіла до CCR4, що становлять інтерес, (CD194) включають гуманізовані моноклональні антитіла, спрямовані проти С-С-хемокінового рецептора 4 (CCR4) з потенційною протизапальною і протипухлинною активностями. CCR2 експресується на вільних макрофагах, які можуть бути виявлені при різних запальних станах, наприклад, ревматоїдному артриті; і також були ідентифіковані як такі, що експресуються на макрофагах, що стимулюють пухлину. CCR2 також експресується на регуляторних Т-клітинах, а ліганд CCR2, CCL2, опосередковує залучення регуляторних Т-клітин у пухлині. Регуляторні Т-клітини пригнічують відповідь на протипухлинні Т-клітини, і тому бажано їх інгібування або деплетування їх популяції.

Отримання білків за цим винаходом

Хоча антитіла можуть бути отримані за допомогою хімічного синтезу, їх зазвичай отримують методами рекомбінантної ДНК, такими як коекспресія всіх ланцюгів, що складають білок в одній рекомбінантній клітині-господарі, або коекспресія поліпептиду важкого ланцюга і антитіла, наприклад, людського антитіла. Крім того, важкий і легкий ланцюги антитіла також можуть бути експресовані із застосуванням одного поліцистронного експресійного вектора. Очищення окремих поліпептидів досягається із застосуванням стандартних методів очищення білків, таких як афінна (білок А) хроматографія, ексклюзійна хроматографія та/або хроматографія гідрофобної взаємодії. Біспецифіки мало відрізняються за розміром і гідрофобністю, тому очищення можна проводити із застосуванням стандартних процедур.

Кількість антитіла і поліпептиду важкого ланцюга, що продукуються в одній клітині-господарі, можна мінімізувати шляхом конструювання константних ділянок антитіла і важкого ланцюга, так що гомодімерізація є переважною за гетеродімерізацію, наприклад, шляхом введення самокомплементарних взаємодій (див., наприклад, WO 98/50431 про можливості таких стратегій, як стратегія "опуклості-в-порожнину" (див., WO 96/27011)). Тому ще одним аспектом цього винаходу є надання способу отримання біспецифіка в рекомбінантному господарі, способу, що включає етап експресії в рекомбінантній клітині-господарі послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує щонайменше два поліпептиди важкого ланцюга, при цьому зазначені поліпептиди важкого ланцюга відрізняються своїми константними ділянками достатньою мірою, щоб зменшити або запобігти утворенню гомодимеру, але збільшити утворення біспецифіка.

Коли білок містить три ланцюги, наприклад, FlicAb, вони можуть бути отримані шляхом коекспресії трьох ланцюгів (2 важких ланцюгів і одного легкого ланцюга), що складають молекулу в одній рекомбінантній клітині-господарі.

Для рекомбінантної продукції білків в цьому документі застосовують одну або більше нуклеїнових кислот, що кодують всі ланцюги, наприклад, 2, 3, 4 тощо, виділяють і вбудовують у вектор, що здатен реплікуватись, для подальшого клонування (ампліфікації ДНК) або для експресії. Багато векторів є доступними. Компоненти вектора, як правило, включають в себе, але не обмежуються ними, один або більше з таких елементів: сигнальну послідовність, точку початку реплікації, один або більше маркерних генів і енхансерний елемент, промотор і послідовність термінації транскрипції.

У кращому варіанті реалізації винаходу клітина-господар у відповідності зі способом за цим винаходом здатна до експресії людського імуноглобуліну на високому рівні, тобто, щонайменше, 1 пг/клітина/день, переважно, щонайменше, 10 пг/клітина/день і навіть більш переважно щонайменше 20 пг/клітина/день або більш без необхідності ампліфікації молекул нуклеїнової кислоти, що кодують окремі ланцюги в зазначеній клітині-господарі.

ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ

Іншим аспектом цього винаходу є надання фармацевтичних композицій, що містять один або більше білків за цим винаходом в суміші з відповідним фармацевтично прийнятним носієм. Прикладами фармацевтично прийнятних носіїв, застосовуваних у цьому документі, є, але без обмежень, ад'юванти, тверді носії, вода, буфери або інші носії, що застосовуються в цій галузі техніки для зберігання терапевтичних компонентів або їх комбінації.

Терапевтичні складки білків, що застосовуються відповідно до цього винаходу, готують для зберігання шляхом змішування білків, що мають бажану ступінь чистоти, з необов'язковими фармацевтично прийнятними носіями, наповнювачами або стабілізаторами (див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences 16-е видання, Osol, A. ред. (1980 рік)), наприклад, у вигляді ліофілізованих складів або водних розчинів. Прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів в дозах і концентраціях, що використовуються, і включають буферні речовини, наприклад, фосфат, цитрат і інші органічні солі; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (наприклад, хлорид

октадецилдіметілбензіламонія; хлорид гексаметоній; хлорид бензалконію; хлорид бензетонія; фенол; бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, наприклад, метил або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і m-крезол); низькомолекулярні (містять менше 10 залишків) поліпептиди; білки, наприклад, сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, наприклад, полівінілпіролідон; амінокислоти, наприклад, гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, включаючи глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, наприклад, ЕДТА; цукор, наприклад, сахарозу, маніт, трегалозу або сорбіт; солеутворюючі протиіони, наприклад, натрію; металовмістні комплекси (наприклад, комплекси Zn-білок) та/або неіоногенні ПАВ, наприклад, TWEEN™, PLURONICS™ або поліетиленгліколь (ПЕГ).

Склади антитіл проти CD3 описані, наприклад, в патентній публікації США № 20070065437, повний опис якої включено в цей документ за допомогою посилання. Подібні склади можуть бути застосовані для білків з цього винаходу. Основними компонентами таких складів є pH-буферний засіб, ефективний в діапазоні від 3,0 до 6,2, сіль, поверхнево-активна речовина і ефективна кількість біспецифіка зі специфічністю проти CD3.

Способи застосування

Пропонуються способи лікування або зниження захворюваності, включаючи, але не обмежуючись ними, інфекцію, аутоімунне захворювання, первинний або метастатичний рак тощо, в схемі прийому ліків, що включає контакт клітин-мішеней з антигензв'язуючою композицією за цим винаходом, особливо коли антигензв'язуюча композиція являє собою мультиспецифічне антитіло, що підходить для стану, що піддається лікуванню, наприклад де один зв'язуючий фрагмент специфічно зв'язується з антигеном, асоційованим з пухлиною, для лікування відповідних ракових клітин; зв'язуючий фрагмент, специфічний для патогена, що становить інтерес, для лікування відповідної інфекції, тощо. Такі способи включають в себе введення суб'єкту, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості або ефективної дози агентів за цим винаходом, включаючи без обмеження комбінації реагенту з хіміотерапевтичним лікарським засобом, променевою терапією або хірургічне втручання.

Ефективні дози композицій за цим винаходом для лікування захворювання варіюють в залежності від багатьох різних факторів, в тому числі способу введення, цільового сайту, фізіологічного стану пацієнта, від того, чи являє собою пацієнт людину або тварину, інших медикаментів, що вводяться, і того, чи є лікування профілактичним або терапевтичним. Зазвичай пацієнтом є людина, але ссавці, відмінні від людини, також можуть піддаватися лікуванню, наприклад, домашні тварини, такі як собаки, кішки, коні тощо, лабораторні ссавці, такі як кролики, миші, щури тощо, тощо. Дозування для лікування можна підбирати для оптимізації безпеки та ефективності.

Рівні дозування можуть бути легко визначені кваліфікованим лікарем і можуть бути змінені при необхідності, наприклад, при необхідності зміни реакції суб'єкта на терапію. Кількість активного інгредієнта, яке можна комбінувати з речовинами-носіями для отримання разової лікарської форми, змінюється в залежності від індивіда, який отримує лікування, і конкретного способу введення. Поодинокі лікарські форми зазвичай містять від близько 1 мг до близько 500 мг активного інгредієнта.

У деяких варіантах реалізації винаходу терапевтичне дозування агента може складати від близько 0,0001 до 100 мг/кг і більше, зазвичай від 0,01 до 5 мг/кг маси тіла господаря. Наприклад, дозування можуть становити 1 мг/кг маси тіла або 10 мг/кг маси тіла або в межах 1-10 мг/кг. Типова схема лікування включає в себе введення один раз кожні два тижні або один раз на місяць або один раз кожні 3-6 місяців. Терапевтичні препарати за цим винаходом зазвичай вводять кілька разів. Інтервали між введенням кожної дози можуть бути щотижневими, щомісячними або щорічними. Інтервали також можуть бути нерівномірними, на що вказує вимір рівня терапевтичного препарат в крові пацієнта. В альтернативному варіанті, терапевтичні препарати за цим винаходом можуть бути введені у вигляді складу для тривалого вивільнення, в цьому випадку необхідне менше часте введення. Дозування і частота варіюють в залежності від часу напівжиття поліпептиду у пацієнта.

У профілактичних цілях відносно невелика доза може вводитися через відносно тривалі інтервали протягом тривалого періоду часу. Деякі пацієнти продовжують отримувати лікування протягом всього життя. В інших терапевтичних цілях іноді потрібно відносно високе дозування з відносно короткими інтервалами, до тих пір, поки прогресування захворювання не зменшиться або не припиниться, і прийнятніше, до тих пір, поки пацієнт не покаже часткове або повне поліпшення симптомів захворювання. Після цього пацієнтові може бути призначений профілактичний режим.

У ще інших варіантах реалізації способи за цим винаходом включають в себе лікування,

зменшення або запобігання зростанню пухлини, метастазування пухлини або інвазії онкологічних пухлин, включаючи карциноми, гематологічні злоякісні пухлини, такі як лейкомії та лімфоми, меланоми, саркоми, гліоми, тощо. Для профілактичного застосування фармацевтичні композиції або лікарські препарати вводять пацієнту, схильному до ризику захворювання або іншим чином чутливому до захворювання, в кількості, достатній для усунення або зменшення ризику, зменшення ступеня тяжкості або затримки початку захворювання, включаючи біохімічні, гістологічні та/або поведінкові симптоми захворювання, його ускладнення і проміжні патологічні фенотипи, присутні в ході розвитку захворювання.

Композиції для лікування захворювання можуть вводитися парентеральним, місцевим, внутрішньовенним, внутрішньопухлинним, пероральним, підшкірним, внутрішньоартеріальним, внутрішньочерепним, внутрішньоочеревинним, інтраназальним або внутрішньом'язовим способом. Типовим шляхом введення є внутрішньовенний або внутрішньопухлинний, хоча інші шляхи можуть бути однаково ефективними.

Зазвичай композиції готують у вигляді ін'єкційних розчинів, або у вигляді рідких розчинів, або суспензій; також можуть бути приготовлені тверді форми, придатні для розчинення або суспендування в рідких носіях перед ін'єкцією. Препарат також може бути емульгованим або інкапсульованим в ліпосоми або мікрочастинки, такі як полілактид, полігліколід або сополімер, для посилення ад'ювантного ефекту, як обговорювалося вище. Langer, Science 249: 1527, 1990 год. і Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997 рік. Агенти за цим винаходом можна вводити у формі ін'єкції речовин уповільненого всмоктування або імплантату препарату, який може бути складений таким чином, щоб забезпечити тривале або пульсуюче вивільнення активного інгредієнта. Фармацевтичні композиції, як правило, складені як стерильні, по суті ізотонічні і повністю відповідають усім нормам Належної Виробничої Практики (GMP-Good Manufacturing Practice) США управління з контролю якості харчових продуктів і лікарських засобів США.

Токсичність білків, описаних в цьому документі, може бути визначена стандартними фармацевтичними процедурами на клітинних культурах або експериментальних тваринах, наприклад, шляхом визначення ЛД₅₀(доза, летальна для 50 % популяції) або ЛД₁₀₀(доза, летальна для 100 % популяції). Співвідношення доз між токсичним і терапевтичним ефектом, являє собою терапевтичний індекс. Дані, отримані з цих аналізів клітинних культур і досліджень на тваринах, можуть бути застосовані при визначенні діапазону доз, який не токсичний для застосування у людини. Дозування білків, описаних в цьому документі, переважно знаходиться в діапазоні значень концентрацій в кровообігу, які включають ефективну дозу з невеликою токсичністю або без неї. Дозування може змінюватися в цьому діапазоні в залежності від застосовуваної форми дозування і шляху введення, який використовується. Точний склад, спосіб введення та дозування можуть бути обрані окремим лікарем з урахуванням стану пацієнта.

Фармацевтичні композиції можна вводити в різних стандартних лікарських формах в залежності від способу введення. Наприклад, стандартні лікарські форми, придатні для перорального введення, включають, але без обмеження, порошок, таблетки, пігулки, капсули і пастилки для розсмоктування. Загальновизнано, що композиції за цим винаходом при пероральному введенні повинні бути захищені від впливу травлення. Це зазвичай досягається або шляхом утворення комплексів молекул з композицією для надання їм стійкості до кислотного і ферментативного гідролізу, або шляхом упаковки молекул в сумісний стійкий носій, такий як ліпосома або захисний бар'єр. Засоби захисту агентів від системи травлення добре відомі в цій галузі техніки.

Композиції для введення зазвичай містять антитіло або інший абляційний агент, розчинений в фармацевтичній прийнятній носії, прийнятніше у водній носії. Можуть застосовуватися різні водні носії, наприклад, забуферений фізіологічний розчин тощо. Ці розчини є стерильними і, як правило, не містять небажаних речовин. Ці композиції можуть бути стерилізовані звичайними, добре відомими методами стерилізації. Композиції можуть містити фармацевтично прийнятні допоміжні речовини, які необхідні для відповідності фізіологічним умовам, такі як засоби, що регулюють рН і буферні засоби, засоби, що регулюють токсичність тощо, наприклад, ацетат натрію, хлорид натрію, хлорид калію, хлорид кальцію, лактат натрію і тому подібне. Концентрація активного агента в цих складах може варіюватися в широких межах і буде вибиратися в першу чергу на основі обсягів рідини, в'язкості, маси тіла і тому подібного відповідно до конкретного обраного шляху введення і потреб пацієнта (наприклад, Remington's Pharmaceutical Science (15-е. изд., 1980 рік) і Goodman & Gillman, The Pharmacological Basis of Therapeutics (Hardman і співавт., ред., 1996 рік)).

Також в обсяг цього винаходу входять набори, що містять активні агенти і їх склади, за цим

винаходомі інструкції по застосуванню. Набір може додатковомістити щонайменше один додатковий реагент, наприклад, хіміотерапевтичний лікарський засібтощо. Набори зазвичай включають в себе етикетку, яка вказує на передбачуване застосування вмісту набору. Термін "етикетка" включає в себе будь-які письмові або записані матеріали, що поставляються в комплекті або разом з ним, або іншим чином супроводжують набір.

Вказані композиції можна вводити для терапевтичного лікування. Композиції вводять пацієнтові в кількості, достатній для істотного видалення клітин-мішеней, як описано вище. Кількість, достатня для досягнення цього, визначається як "терапевтично ефективна доза", яка може забезпечити поліпшення загального виживання. Композиції можна вводити одноразово або багаторазово в залежності від необхідного дозування і частоти, що переноситься пацієнтом. Конкретна доза, необхідна для лікування, буде залежати від медичного діагнозу і історії захворювання ссавця, а також від інших факторів, таких як вік, вага, стать, шлях введення, ефективність і тому подібного.

Тепер, коли винахід повністю описано, для фахівця в цій галузі техніки буде очевидно, що різні зміни і модифікації можуть бути зроблені без відхилення від суті або обсягу винаходу.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Генетично сконструйовані щури, які експресують антитіла, що містять тільки важкі ланцюги Людський локус IgH був сконструйований і зібраний з декількох частин, які включали модифікацію і об'єднання генів С-ділянки щура, які потім з'єднувалися по ходу транскрипції ділянки V_H6-DJ_Hлюдини. Два ВАС з окремими кластерами людських генів V_Hбули потім спільно введені з ВАС, що кодує зібраний (людський V_H6-DJ_H-щурячий С) фрагмент.

Були отримані трансгенні щури, що несуть штучні локуси імунoglobulinів важкого ланцюга в невпорядкованій конфігурації. Включені гени константної ділянки кодують IgM, IgD, IgG2b, IgE, IgA і 3'-енхансер. ЗТ-ПЛР і аналіз сироватки (ІФА) трансгенних щурів виявили продуктивну перебудову локусів трансгенних імунoglobulinів і експресію в сироватці різних ізотипів антитіл тільки з важким ланцюгом. Трансгенні щури перехресно схрещувалися з щурами з мутованими ендогенними локусами важкого ланцюга і легкого ланцюга, раніше описаними в публікації патенту США 2009/0098134 А1. Аналіз таких тварин продемонстрував інактивацію експресії важкого і легкого ланцюга імунoglobulinу щура і високий рівень експресії антитіл важкого ланцюга з варіабельними ділянками, кодованими генами V, D і J людини. Імунізація трансгенних щурів приводила до отримання сироваткових відповідей з високим титром антигенспецифічних антитіл з важким ланцюгом. Ці трансгенні щури, які експресують антитіла з важким ланцюгом з ділянкою VDJ людини, були названі UniRats.

Приклад 2

Генетично сконструйовані щури, які експресують антитіла з фіксованим легким ланцюгом Набори трансгенних людських антитіл були отримані з Н-ланцюгів з різноманітною (V_H-D-J_H)перебудовою в поєднанні з унікальним L-ланцюгом. Для цього перебудований L-ланцюг, людського Vk-Jk1-Ck, був інтегрований в зародкову лінію щура за допомогою мікро ін'єкції ДНК, і отримані трансгенні тварини були схрещені з раніше описаною лінією щурів, яка природним чином експресує набір людського Н-ланцюга (Osborni співавт., 2013 рік). Ця нова лінія щурів була названа OmniFlic.

Імунізація щурів OmniFlic із застосуванням безлічі різних антигенів продукувала високі рівні антигенспецифічного IgG, схожі з іншими трансгенними щурами, що несуть той же локус IgH. Аналіз набору методом ЗТ-ПЛР дозволив виявити сильно варіабельні перебудови гена V_Hпри високих рівнях транскрипта і білка. Крім того, був ідентифікований тільки один продукт L-ланцюга, що також експресувався на високому рівні.

Антигенспецифічні зв'язуючі з OmniFlic були отримані за допомогою сіквенування нового покоління (NGS) і відібрані з бібліотек кДНК (дріжджів, E. coli, фагів), в яких після сіквенування ідентифікували різноманітні транскрипти Н-ланцюга. Для експресії в клітинах ссавців гіпермутовані конструкції Н-ланцюга трансфікували в комбінації з вихідною трансгенною послідовністю Igk. У цьому перебудованому Vk-Jk1-Ck не допускалися мутаційні зміни, і завжди один і той же L-ланцюг експресувався з різними продуктами Н-ланцюга для генерації моноклонального людського IgG.

Приклад 3

Отримання антигенспецифічних антитіл у трансгенних щурів.

Для отримання антигенспецифічних антитіл з важким ланцюгом у щурів, генетично сконструйованих щурів, які експресують антитіла з важкими ланцюгами, імунізували двома способами.

Імунізація рекомбінантними позаклітинними доменами PD-L1 і BCMA. Рекомбінантні

позаклітинні домени PD-L1 і BCMA були придбані у R&D Systems, розбавлені стерильним фізіологічним розчином і об'єднані з ад'ювантом. імуногени або комбінували з повним ад'ювантом Фрейнда (CFA) і неповним ад'ювантом Фрейнда (IFA), або з ад'ювантами Titermax і Ribі. Першу імунізацію (праймування) імуногеном в CFA або Titermax вводили в ліву і праву

5 ноги. Після першої імунізації імуногенними в CFA в кожну ногу вводили ще дві імунізації в IFA (бустер-ін'єкції) або ще 4 імунізації в Ribі і ще одну в Titermax. Ця послідовність імунізацій призводить до розвитку В-клітин, що продукують високоафінні антитіла. Концентрації імуногена становили 10 мкг на ногу. Сироватку збирали у щурів при останньому кровопусканні для визначення титрів сироватки.

10 Для отримання антитіл проти CD3δє людини генетично сконструйованих щурів імунізували із застосуванням протоколів імунізації на основі ДНК.

Щурів OmniFlic імунізували конструкціями CD3-Епсілон/дельта людини і яванського макака в Aldevron, Inc. (Фарго, штат Північна Дакота) із застосуванням технології антитіл GENOVAC. Дренуючі лімфатичні вузли збирали після остаточної імунізації і виділяли РНК. Після синтезу

15 кДНК набір антитіл важкого ланцюга IgH був охарактеризований за допомогою секвенування нового покоління і нашого власного програмного забезпечення для внутрішнього використання. Були відібрані кандидатні антигенспецифічні послідовності VH, що демонструють докази антигенспецифічного позитивного відбору. Кілька сотень послідовностей VH, що кодують FlicAb, були відібрані для збірки генів і клоновані в експресійний вектор. Згодом повністю людські

20 антитіла FlicAb IgG1 експресували в клітинах HEK для аналізу за допомогою проточної цитометрії і ІФА. Людські FlicAb тестували на зв'язування з первинними людськими Т-клітинами і клітинами Jurkat за допомогою проточної цитометрії. Крім того, людські FlicAb були протестовані з застосуванням рекомбінантних білків CD3δє в ІФА. Всі FlicAb з позитивним зв'язуванням з Т-клітинами людини перераховані на Фіг. 1 і 2. Вибрані послідовності були додатково

25 охарактеризовані в аналізах активації Т-клітин.

Приклад 4 Характеристика антитіл.

Таблиця даних на Фіг. 3 узагальнює поведінку анти-CD3 антитіл сімейства 2 в моноспецифічному і біспецифічному форматі. У колонці 1 показаний ідентифікатор послідовності для послідовності VH анти-CD3. У колонці 2 показано значення СІФ для зв'язування

30 клітинами Jurkat вихідного моноспецифічного (антитіла) проти CD3. У колонці 3 показано значення СІФ для зв'язування Т-клітинами яванського макака вихідного моноспецифічного (антитіла) проти CD3. Колонка 4 демонструє назву αCD3:αBCMA біспецифічного антитіла. У колонці 5 показані пікограми ІЛ-2, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 6 показані пікограми ІЛ-6, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були

35 стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 7 показані пікограми ІЛ-10, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. В колонці 8 показані пікограми ІФН-γ, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 9 показані пікограми ФНО, що вивільняється всіма Т-клітинами, які були стимульовані біспецифічним антитілом, що зв'язує білок BCMA, іммобілізованим на пластику, в зазначеній дозі. У колонці 10 показана ЕК50 лізису

40 пухлинних клітин U266, опосередкованого біспецифічними антитілами, в присутності всіх Т-клітин людини. У колонці 11 показаний відсоток лізису пухлинних клітин U266, в присутності біспецифічного антитіла і всіх Т-клітин людини при дозі 333 нг/мл біспецифічного антитіла. У колонці 12 показана афінність білкового зв'язування плеча проти CD3 біспецифічного антитіла, виміряна за допомогою Octet. У колонці 13 показано значення СІФ для зв'язування клітинами Jurkat біспецифічного антитіла.

50 Приклад 5 Характеризація біспецифічних антитіл.

Сім біспецифічних антитіл αCD3_fam2: αBCMA, кожне з унікальним плечем проти CD3 і загальним плечем проти BCMA, були протестовані на здатність вбивати пухлинні клітини U266 BCMA+ за допомогою перенаправлення активованих первинних Т-клітин. В цьому експерименті клітини U266, які експресують BCMA, змішували з активованими всіма Т-клітинами в

55 співвідношенні Е:Т 10:1 разом з додаванням біспецифічного антитіла. На Фіг. 4 вісь x демонструє концентрацію антитіла, що застосовується, а вісь y демонструє % лізису пухлинних клітин через 6 годин після додавання антитіла.

Порівняння активності по лізису пухлинних клітин опосередкованої біспецифічними антитілами з вивільненням цитокінів ІЛ-2 продемонстровано на точковій діаграмі Фіг. 5. Кореляція між продукуванням ІЛ-2 і лізисом пухлинних клітин U266 становить $R^2=0,37$.

60

Порівняння активності лізису пухлинних клітин опосередкованої біспецифічними антитілами з вивільненням цитокінів ІФН- γ продемонстровано на точковій діаграмі Фіг. 6. Кореляція між продукуванням ІФН- γ і лізисом пухлинних клітин U266 становить $R^2=0,53$. Порівняння активності по лізису пухлинних клітин U266 опосередкованої біспецифічними антитілами з анти-CD3 зв'язуючою афінністю продемонстровано на точковій діаграмі Фіг. 7. Кореляція між ЕК50 знищення U266 і афінністю зв'язування білка становить $R^2=0,93$.

Приклад 6 Лізис пухлинних клітин.

Біспецифічні антитіла α CD3_F1F: α BCMA аналізували на здатність знищувати три різних лінії пухлинних клітин BCMA+ і одну лінію BCMA-негативних клітин шляхом перенаправлення активованих вихідних Т-клітин. В цьому експерименті пухлинні клітини змішували за активованими всіма Т-клітинами в співвідношенні Е:Т 10:1 разом з додаванням біспецифічного антитіла. Результати продемонстровані на Фіг. 8A-6D. Панель А демонструє знищення клітин RPMI-8226, панель В демонструє знищення клітин NCI-H929, панель С демонструє знищення клітин U-266 і панель D демонструє знищення клітин K562, негативний контроль. Всіх демонструє концентрацію антитіла, що застосовується, а вісь у демонструє % лізису пухлинних клітин через 6 годин після додавання антитіла.

Вимірювали рівень вивільнення цитокінів ІЛ-2 виміряний після культивування Т-клітин людини в спокої з різними лініями пухлинних клітин і зростаючими дозами біспецифічного антитіла α CD3_F1F: α BCMA. На Фіг. 9A проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами RPMI-8226, на Фіг. 9B проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами NCI-H929, на Фіг. 9C проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами U-266 і на Фіг. 9D проілюстровано вивільнення ІЛ-2, стимульоване клітинами K562, негативний контроль.

Рівень вивільнення цитокіну ІФН- γ вимірювали після культивування Т-клітин людини в спокої з різними лініями пухлинних клітин і зростаючими дозами біспецифічного антитіла α CD3_F1F: α BCMA. Фіг. 10А демонструє вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами RPMI-8226, на Фіг. 10В проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами NCI-H929, на Фіг. 10С проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами U-266 і на Фіг. 10D проілюстровано вивільнення ІФН- γ , стимульоване клітинами K562, негативний контроль.

Приклади продемонстровані таким чином, щоб забезпечити звичайним фахівцям в цій галузі техніки повне розкриття і опис того, як виготовляти і застосовувати цей винахід, і не призначені для обмеження обсягу того, що автори винаходу вважають своїм винаходом, і вони не призначені для представлення того, що експерименти, наведені нижче, це все експерименти, які проводилися. Було вжито заходів для забезпечення точності відносно чисел, що застосовуються (наприклад, кількостей, температури і тому подібного), але деякі експериментальні помилки і відхилення повинні враховуватися. Якщо не вказано інше, частини являють собою частини по вазі, молекулярна маса являє собою середню молекулярну масу, температура представлена в градусах Цельсія, а тиск дорівнює або близький до атмосферного.

У той час як цей винахід було описано з посиланнями на конкретні варіанти його реалізації, фахівцям в цій галузі техніки слід розуміти, що можуть бути проведені різні зміни еквіваленти можуть бути замінені без відходу від істинної суті і обсягу цього винаходу. Крім того, багато модифікацій можуть бути зроблені для того, щоб адаптувати конкретну ситуацію, матеріал, склад речовини, процес, технологічні стадії або стадії до завдання, суті і обсягу цього винаходу. Передбачається, що всі зазначені модифікації знаходяться в межах обсягу формули винаходу, що додається.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Trinklein, Nathan
vanSchooten, Wim
Aldred, Shelley Force
Harris, Katherine
Pham, Duy

<120> Антитіла, які зв'язують CD3

<130> TEBO-001WO2

<150> 62/394,360

<151> 2016-09-14

<150> 62/491,908
<151> 2017-04-28

5 <160> 22

<170> FastSEQ для Windows версія 4.0

<210> 1

10 <211> 123

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

15 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 20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
20 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
25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
30 115 120

<210> 2

<211> 123

35 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 2

40 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala 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
50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

55

<210> 3

<211> 123

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

5  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
    Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    10          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 Lys Ser Leu Tyr
    65          70          75          80
    15  Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
      85          90          95
    Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
      100          105          110
    Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    20          115          120

```

<210> 4

<211> 123

25 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

30  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
    Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
    35          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
    40  Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
      85          90          95
    Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
      100          105          110
    Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
    45          115          120

```

<210> 5

<211> 123

<212> Білок

50 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

55  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
    Ala 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
5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
10 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 123
15 <212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asn Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
25 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Asp 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
30 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
35

<210> 7
<211> 123
40 <212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
50 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 Gly Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
55 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
 <211> 123
 5 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 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
 20 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25

<210> 9
 <211> 123
 30 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 35 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 Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 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 Lys 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
 45 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

50

<210> 10
 <211> 123
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

55 <400> 10
 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 Asn Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
5 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
10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 11

<211> 123

<212> Білок

20 <213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
30 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
35 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

40

<210> 12

<211> 123

<212> Білок

<213> Homo sapiens

45

<400> 12

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala 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
55 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 Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Ser Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

5

<210> 13
<211> 123
<212> Білок
10 <213> Homo sapiens

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asn Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
20 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
25 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

30

<210> 14
<211> 123
<212> Білок
35 <213> Homo sapiens

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala 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
45 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
50 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Arg Gly Gly Ala Tyr
100 105 110
Cys Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

55

<210> 15
<211> 123
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10 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 Lys 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
 15 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Ser Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 16
 <211> 123
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

25

<400> 16
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala 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
 35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys 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
 40 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

45

<210> 17
 <211> 123
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

50

<400> 17
 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 Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 55 Ala 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
 5 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 10
 <210> 18
 <211> 123
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 15
 <400> 18
 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 20 25 30
 Ala 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
 25 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 Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Lys Asp Ser Arg Gly Tyr Gly Asp Tyr Arg Leu Gly Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 35
 <210> 19
 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

 40
 <400> 19
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 45 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 55

 <210> 20
 <211> 243

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

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

```

<210> 21

40 <211> 119

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 22
<211> 128
<212> Білок
<213> H. sapiens

10 <400> 22
Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30
15 Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Val Ile Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
20 65 70 75 80
Ser Leu Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Trp Arg His Asp Ile Phe Ala Ala Tyr Pro Tyr Tyr Tyr
100 105 110
25 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

30 ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Мультиспецифічне антитіло, яке містить:

(i) перший зв'язуючий фрагмент, який має специфічність зв'язування для людської CD3 ϵ , що містить:

35 варіабельний домен важкого ланцюга, який містить:

A) послідовність CDR1, що містить GFTFDDYA, послідовність CDR2, що містить ISWNSGSI, і послідовність CDR3, що містить AKDSRGYGDYRLGGAY;

B) послідовність CDR1, що містить GFTFHNYA, послідовність CDR2, що містить ISWNSGSI, і послідовність CDR3, що містить AKDSRGYGDYSLGGAY; і

40 варіабельний домен легкого ланцюга, який містить послідовність CDR1, що містить QSVSSN, послідовність CDR2, що містить GAS, і послідовність CDR3, що містить QQYNNWPWT; і

(ii) другий зв'язуючий фрагмент, який має специфічність зв'язування щодо пухлиноасоційованого антигену (TAA) або пухлиноспецифічного антигену (TSA).

2. Мультиспецифічне антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що перший зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюга, який містить послідовність CDR1, що містить GFTFDDYA, послідовність CDR2, що містить ISWNSGSI, і послідовність CDR3, що містить AKDSRGYGDYRLGGAY.

3. Мультиспецифічне антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що перший зв'язуючий фрагмент містить варіабельний домен важкого ланцюга, який містить послідовність CDR1, що містить GFTFHNYA, послідовність CDR2, що містить ISWNSGSI, і послідовність CDR3, що містить AKDSRGYGDYSLGGAY.

4. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-3, яке **відрізняється** тим, що: послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 у варіабельному домені важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента присутні в каркасі VH людини; і

55 послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 у варіабельному домені легкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента присутні в каркасі V κ ра людини.

5. Мультиспецифічне антитіло за п. 4, яке **відрізняється** тим, що:

варіабельний домен важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичності з SEQ ID NO: 1; і

варіабельний домен легкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичності з SEQ ID NO: 19.

6. Мультиспецифічне антитіло за п. 4, яке **відрізняється** тим, що:

5 варіабельний домен важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичності з SEQ ID NO: 13; і

варіабельний домен легкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність, що має щонайменше 95 % ідентичності з SEQ ID NO: 19.

7. Мультиспецифічне антитіло за п. 5, яке **відрізняється** тим, що:

10 варіабельний домен важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність SEQ ID NO: 1; і

варіабельний домен легкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність SEQ ID NO: 19.

8. Мультиспецифічне антитіло за п. 6, яке **відрізняється** тим, що:

15 варіабельний домен важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність SEQ ID NO: 13; і

варіабельний домен легкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить послідовність SEQ ID NO: 19.

9. Мультиспецифічне антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що другий зв'язуючий фрагмент містить одну варіабельну область важкого ланцюга в одній або тандемній конфігурації.

20 10. Мультиспецифічне антитіло за п. 1, яке **відрізняється** тим, що перший зв'язуючий фрагмент містить поліпептидну субодиницю легкого ланцюга і поліпептидну субодиницю важкого ланцюга, і де другий зв'язуючий фрагмент містить поліпептидну субодиницю важкого ланцюга.

11. Мультиспецифічне антитіло за п. 10, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця легкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить константний домен легкого ланцюга.

25 12. Мультиспецифічне антитіло за п. 10, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить щонайменше один константний домен важкого ланцюга.

13. Мультиспецифічне антитіло за п. 12, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить домен CH1, домен CH2 та домен CH3.

30 14. Мультиспецифічне антитіло за п. 13, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця важкого ланцюга першого зв'язуючого фрагмента містить шарнірну область, розташовану між доменом CH1 і доменом CH2.

15. Мультиспецифічне антитіло за п. 10, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця важкого ланцюга другого зв'язуючого фрагмента містить щонайменше один константний домен.

35 16. Мультиспецифічне антитіло за п. 15, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця важкого ланцюга другого зв'язуючого фрагмента містить домен CH2 і домен CH3, але не домен CH1.

17. Мультиспецифічне антитіло за п. 15 або 16, яке **відрізняється** тим, що поліпептидна субодиниця важкого ланцюга другого зв'язуючого фрагмента містить шарнірну область, розташовану між другим зв'язуючим фрагментом та доменом CH2.

40 18. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 13-17, яке **відрізняється** тим, що домени CH2 і CH3 важкого ланцюга поліпептидної субодиниці першого зв'язуючого фрагмента та домени CH2 і CH3 важкого ланцюга поліпептидної субодиниці другого зв'язуючого фрагмента разом утворюють Fc-ділянку.

45 19. Мультиспецифічне антитіло за п. 18, яке **відрізняється** тим, що Fc-ділянка містить нативну послідовність Fc-ділянки IgG1 людини.

20. Мультиспецифічне антитіло за п. 18, яке **відрізняється** тим, що Fc-ділянка містить варіантну Fc-ділянку IgG1 людини.

50 21. Мультиспецифічне антитіло за п. 20, яке **відрізняється** тим, що варіантну Fc-ділянку IgG1 людини сконструйовано для зменшення однієї або декількох ефektorних функцій.

22. Мультиспецифічне антитіло за п. 18, яке **відрізняється** тим, що Fc-ділянка містить нативну послідовність Fc-ділянки IgG4 людини.

23. Мультиспецифічне антитіло за п. 18, яке **відрізняється** тим, що Fc-ділянка містить варіантну Fc-ділянку IgG1 людини.

55 24. Мультиспецифічне антитіло за п. 23, яке **відрізняється** тим, що варіантну Fc-ділянку IgG1 людини сконструйовано для зменшення однієї або декількох ефektorних функцій.

25. Мультиспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 18-24, яке **відрізняється** тим, що Fc-ділянка була сконструйована для зменшення утворення гомодимера.

26. Фармацевтична композиція, що містить мультиспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-25.

27. Застосування мультиспецифічного антитіла за будь-яким з пп. 1-25 при приготуванні лікарського засобу для лікування захворювання або розладу у людини, яка цього потребує. 28. Застосування мультиспецифічного антитіла за будь-яким з пп. 1-25 в терапії у людини, яка цього потребує.
- 5 29. Застосування мультиспецифічного антитіла за будь-яким з пп. 1-25 в ефективній кількості для лікування захворювання або стану у людини, яка цього потребує.
30. Застосування за п. 29, яке **відрізняється** тим, що захворювання є автоімунним захворюванням.
31. Застосування за п. 29, яке **відрізняється** тим, що захворювання є раком.
- 10 32. Набір для лікування захворювання або розладу у людини, що потребує цього, який містить мультиспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 1-25 та інструкцію із застосування.
33. Набір за п. 32, який додатково містить щонайменше один додатковий реагент.
34. Набір за п. 33, який **відрізняється** тим, що щонайменше один додатковий реагент містить хіміотерапевтичний препарат.
- 15 35. Біспецифічна триланцюгова антитілоподібна молекула, що містить:
першу поліпептидну субодиницю, яка містить:
варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що містить послідовність SEQ ID NO: 19; і
константний домен легкого ланцюга (CL);
другу поліпептидну субодиницю, що містить:
- 20 варіабельний домен важкого ланцюга (VH), що містить:
(i) послідовність SEQ ID NO: 1; або
(ii) послідовність SEQ ID NO: 13; і
константний домен важкого ланцюга (CH), що містить домен CH1, шарнірну область, домен CH2, домен CH3;
- 25 де варіабельний домен легкого ланцюга і варіабельний домен важкого ланцюга разом утворюють перший зв'язуючий фрагмент, який має специфічність зв'язування для людської CD3 ϵ ; і
третю поліпептидну субодиницю, що містить:
одиначну варіабельну область важкого ланцюга в одинарній або тандемній конфігурації, яка
- 30 має специфічність зв'язування для пухлиноасоційованого антигену (TAA) або пухлиноспецифічного антигену (TSA); і
константний домен важкого ланцюга (CH), що містить шарнірну область, домен CH2 та домен CH3, за відсутності домену CH1.
- 35 36. Біспецифічна триланцюгова антитілоподібна молекула за п. 35, яка **відрізняється** тим, що константний домен важкого ланцюга другої поліпептидної субодиниці та константний домен важкого ланцюга третьої поліпептидної субодиниці були сконструйовані для зменшення однієї або декількох ефекторних функцій.
37. Біспецифічна триланцюгова антитілоподібна молекула за п. 35 або 36, яка **відрізняється** тим, що константний домен важкого ланцюга другої поліпептидної субодиниці та константний
- 40 домен важкого ланцюга третьої поліпептидної субодиниці були сконструйовані для зменшення утворення гомодимера.
38. Фармацевтична композиція, що містить біспецифічну триланцюгову антитілоподібну молекулу за будь-яким з пп. 35-37.
39. Застосування біспецифічної триланцюгової антитілоподібної молекули за будь-яким з пп.
- 45 35-37 у приготуванні лікарського засобу для лікування захворювання або розладу у людини, яка цього потребує.
40. Застосування біспецифічної триланцюгової антитілоподібної молекули за будь-яким з пп. 35-37 в терапії у людини, яка цього потребує.
41. Застосування біспецифічної триланцюгової антитілоподібної молекули за будь-яким з пп.
- 50 35-37 в ефективній кількості для лікування захворювання або стану у людини, яка цього потребує.
42. Застосування за п. 41, яке **відрізняється** тим, що захворювання є автоімунним захворюванням.
43. Застосування за п. 41, яке **відрізняється** тим, що захворювання є раком.
- 55 44. Набір для лікування захворювання або розладу у людини, що потребує цього, який містить біспецифічну триланцюгову антитілоподібну молекулу за будь-яким з пп. 35-37 та інструкцію із застосування.
45. Набір за п. 44, який додатково містить щонайменше один додатковий реагент.
46. Набір за п. 45, який **відрізняється** тим, що щонайменше один додатковий реагент містить хіміотерапевтичний препарат.
- 60

47. Застосування фармацевтичної композиції за п. 26 для приготування лікарського засобу для лікування захворювання або розладу у людини, яка цього потребує.
48. Застосування фармацевтичної композиції за п. 26 в терапії у людини, яка цього потребує.
49. Застосування фармацевтичної композиції за п. 26 в ефективній дозі для лікування захворювання або стану у людини, яка цього потребує.
50. Застосування за п. 49, яке **відрізняється** тим, що захворювання є автоімунним захворюванням.
51. Застосування за п. 49, яке **відрізняється** тим, що захворювання є раком.
52. Набір для лікування захворювання або розладу у людини, яка цього потребує, що містить фармацевтичну композицію за п. 26 та інструкцію із застосування.
53. Набір за п. 52, який додатково містить щонайменше один додатковий реагент.
54. Набір за п. 53, в якому щонайменше один додатковий реагент містить хіміотерапевтичний препарат.
55. Застосування фармацевтичної композиції за п. 38 для приготування лікарського засобу для лікування захворювання або розладу у людини, яка цього потребує.
56. Застосування фармацевтичної композиції за п. 38 в терапії у людини, яка цього потребує.
57. Застосування фармацевтичної композиції за п. 38 в ефективній дозі для лікування захворювання або стану у людини, яка цього потребує.
58. Застосування за п. 57, де захворювання є автоімунним захворюванням.
59. Застосування за п. 57, яке **відрізняється** тим, що захворювання є раком.
60. Набір для лікування захворювання або розладу у людини, яка цього потребує, що містить фармацевтичну композицію за п. 38 та інструкцію із застосування.
61. Набір за п. 60, який додатково містить щонайменше один додатковий реагент.
62. Набір за п. 61, в якому щонайменше один додатковий реагент містить хіміотерапевтичний препарат.

Внутренние ID		CDR1	CDR2	CDR3
312587	SEQ ID NO:1	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312588	SEQ ID NO:2	YFTYDGA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312589	SEQ ID NO:3	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312590	SEQ ID NO:4	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312591	SEQ ID NO:5	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312592	SEQ ID NO:6	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312593	SEQ ID NO:7	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312594	SEQ ID NO:8	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312595	SEQ ID NO:9	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312596	SEQ ID NO:10	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312597	SEQ ID NO:11	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312598	SEQ ID NO:12	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312599	SEQ ID NO:13	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312600	SEQ ID NO:14	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312601	SEQ ID NO:15	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312602	SEQ ID NO:16	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312603	SEQ ID NO:17	CFTFLDFA	LSNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY
312604	SEQ ID NO:18	CFTFLDFA	LDNNNSGI	AKDSAGTGVSLQRAY

Fig. 1A

313225	SEQ ID NO:19	GYTGG	SSS	QVTHHPT
339902- Eucaryot	SEQ ID NO:20	GYTGGTC	ISSGGST	ANQSHHPTPI
308902	SEQ ID NO:21	GYTGGTC	ISSGGST	ANQSHHPTPI

Fig. 1B

004003	NO TO NO, 22	0001550000	101000	00000000000000000000
--------	--------------	------------	--------	----------------------

Fig. 1C

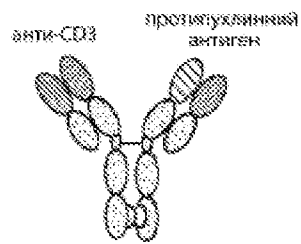


Fig. 2A

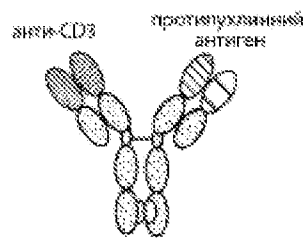


Fig. 2B

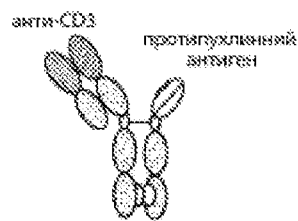


Fig. 2C

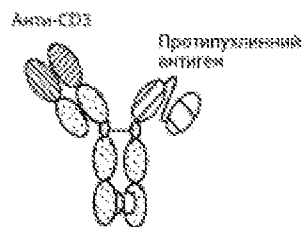


Fig. 2D

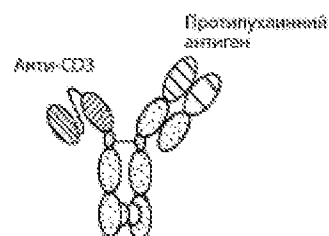
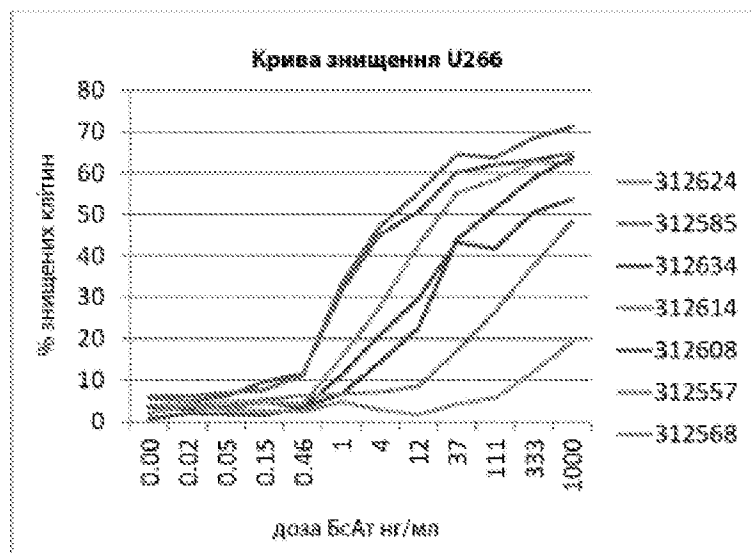


Fig. 2E

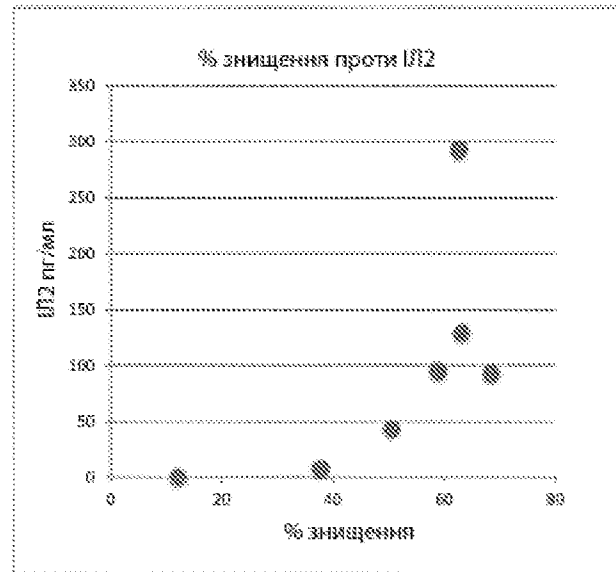
Колонка

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
ВИХІДНЕ АНТИТІЛО АНТИ-CD3			БІСПЕЦИФІЧНЕ АНТИТІЛО АНТИ-CD3-BCMA									
ID анти-CD3	Зв'язування клітин Jurkat (СДФ)	Зв'язування клітин Cymol (СДФ)	в дозі БсАт нг/мл	II-2	II-6	II-10	IIHq	ФНПа	ЕК50 знищення (нг/мл)	% знищення (333 нг/мл)	KD (нМ)	Зв'язування клітин Jurkat (СДФ)
				37	111	111	12	12				
312624	30.5	1.4	CD3_F2E-BCMA	130	1.0	24.1	706	1787	2.0	83	227	296
312585	32.7	0.9	CD3_F2C-BCMA	83	0.5	19.2	751	1821	2.1	66	44	513
312614	32.4	0.9	CD3_F2D-BCMA	294	1.5	89.9	1185	2387	6.1	63	86	357
312634	21.4	1.1	CD3_F2F-BCMA	44	0.5	2.4	333	485	9.8	51	714	67
312608	25.9	1.0	CD3_F2A-BCMA	96	0.5	3.3	505	1181	22.2	59	199	110
312557	6.1	1.0	CD3_F2B-BCMA	8	0.5	0.6	154	553	150.1	38	1000	31
312568	4.1	1.2	CD3_F2G-BCMA	1	0.5	0.5	49	231	352.0	12	ND	9
304703	15.9	26.2	CD3_F1A-BCMA	212	0.8	48.5	745	1844	26.4	71	98	149

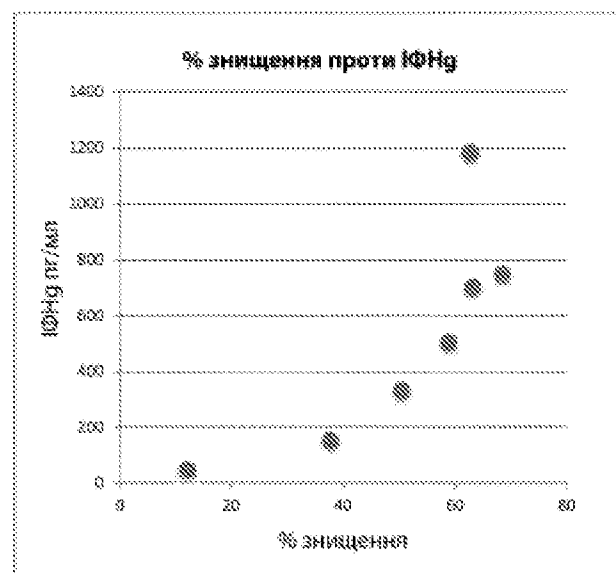
Фіг. 3



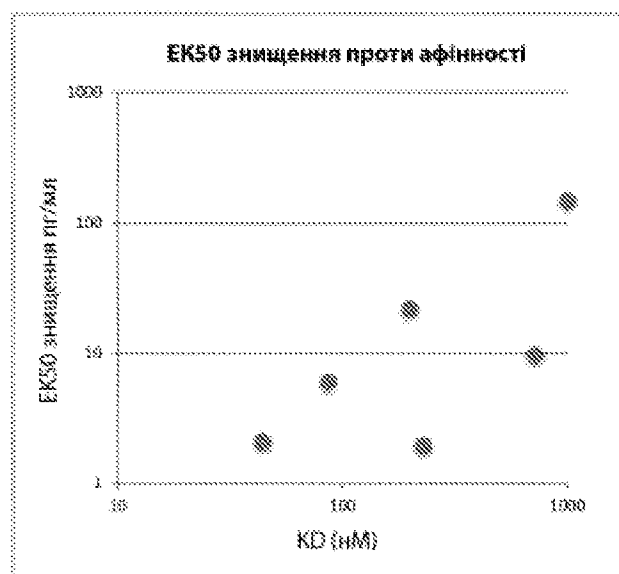
Фіг. 4



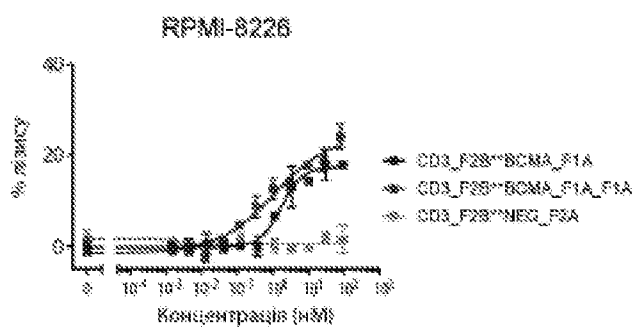
Фіг. 5



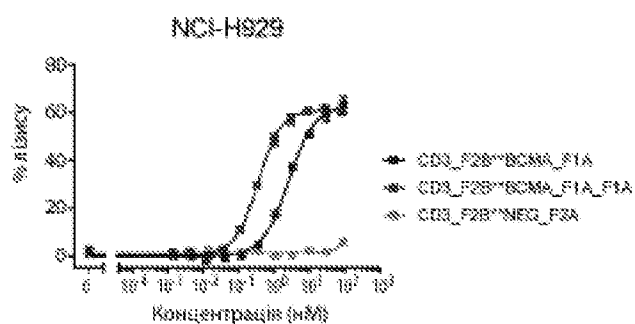
Фіг. 6



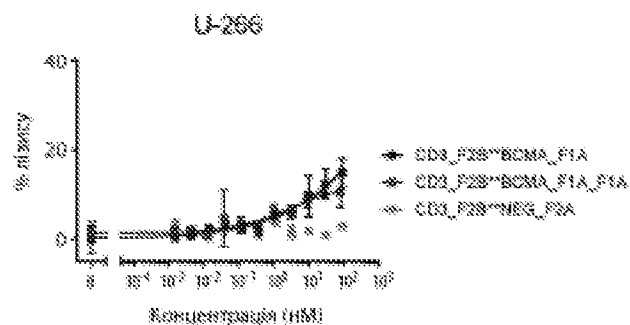
Фиг. 7



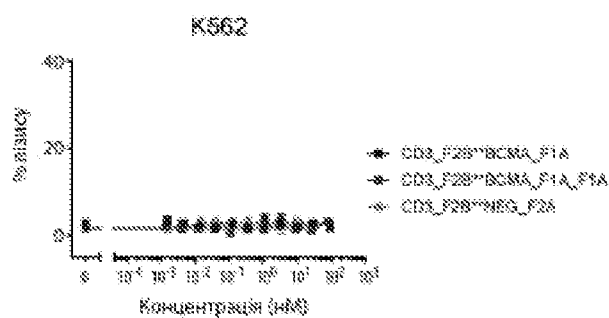
Фиг. 8A



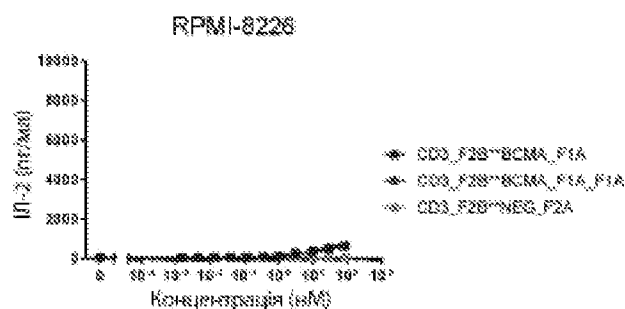
Фиг. 8B



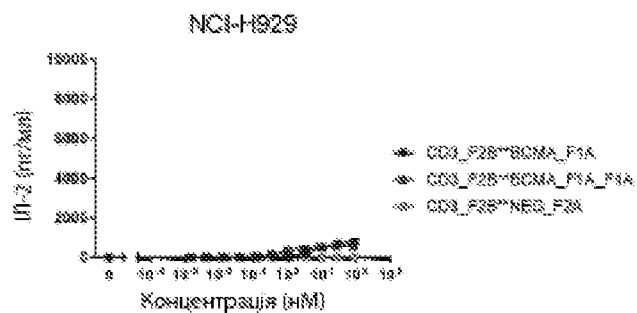
Фіг. 8С



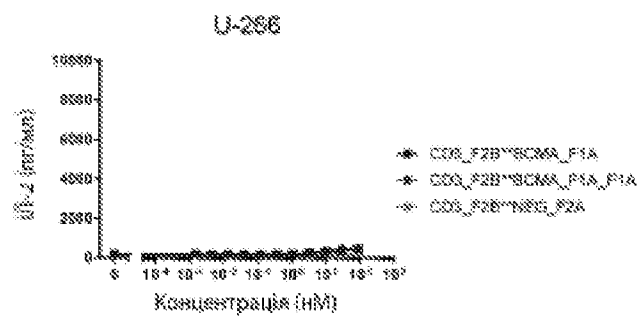
Фіг. 8D



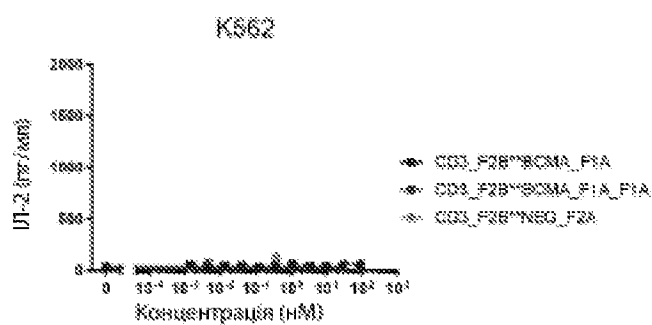
Фіг. 9А



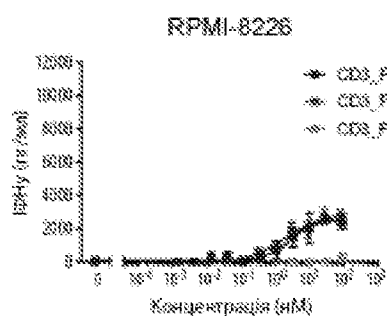
Фіг. 9В



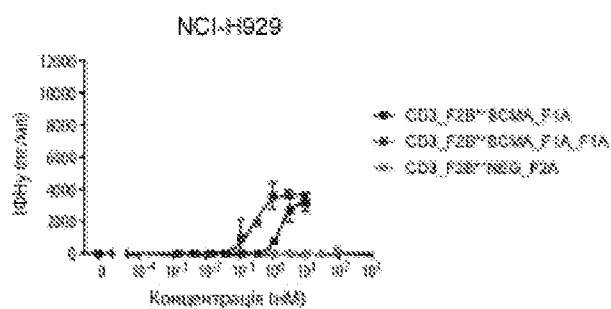
Фіг. 9C



Фіг. 9D



Фіг. 10A



Фіг. 10B

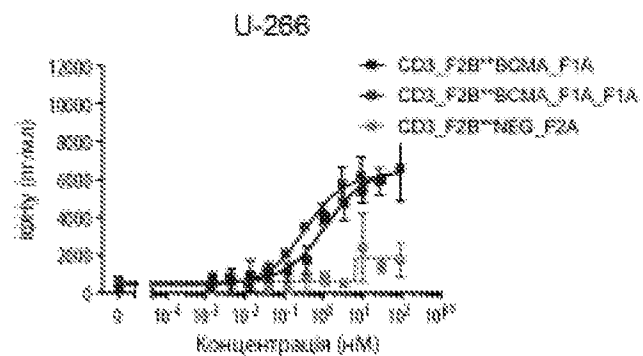


Fig. 10C

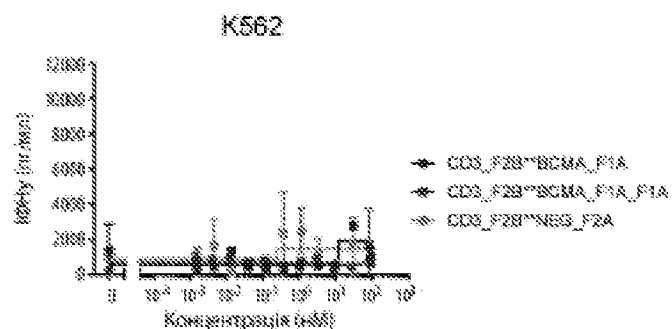


Fig. 10D