



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **119646** (13) **C2**  
(51) МПК (2019.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**C12N 15/13** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/00

МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

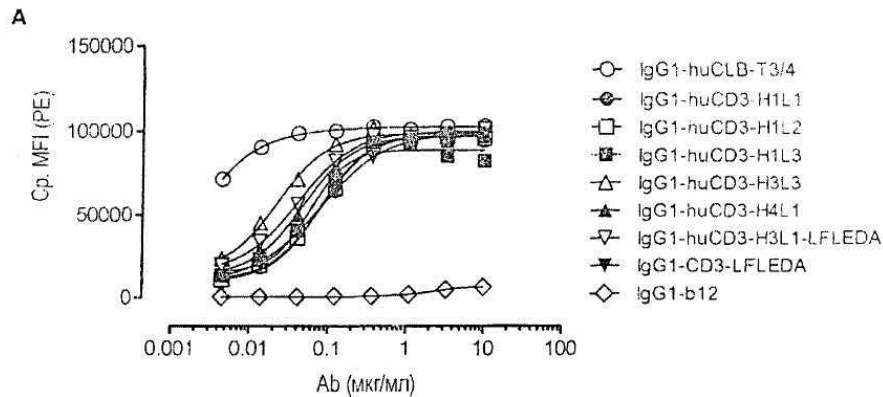
<p>(21) Номер заявки: <b>а 2016 00940</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>04.07.2014</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>25.07.2019</b></p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>PCT/EP2013/064330, PCT/EP2014/050340, PA 2014 00009</b></p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>05.07.2013, 09.01.2014, 09.01.2014</b></p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>EP, EP, DK</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: <b>10.08.2016, Бюл.№ 15</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.07.2019, Бюл.№ 14</b></p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: <b>PCT/EP2014/064326, 04.07.2014</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>ван ден Брінк Едвард (NL), Нейсен Йост Й. (NL), Лабрейн Аран Франк (NL), Местерс Йойсе (NL), Схюрман Яніне (NL), Парен Паул (NL)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ГЕНМАБ А/С,</b> Bredgade 34 E, DK-1260 Copenhagen K, Denmark (DK)</p> <p>(74) Представник: <b>Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2007042261 A2, 19.04.2007 WO 2012143524 A2, 26.10.2012 WO 2012113813 A1, 30.08.2012 Construction of a Recombinant Non-Mitogenic Anti-Human CD3 Antibody / Luis E. Hinojosa, Tays Hernáandez, Cristina Mateo de Acosta et al. // Hybridoma. – 2010. – Vol. 29 (2). – P. 115-124 Construction and characterization of a humanized anti-human CD3 monoclonal antibody 12F6 with effective immunoregulation functions / Bohua Li, Hao Wang, Jianxin Dai et al. // Immunology. – 2005. – Vol. 116 (4). – P. 487-498 Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection / Steve E. Woodle, D. Xu, R. A. Zivin et al. // Transplantation. – 1999. – Vol. 68. (5). – P. 608-616 Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding anti-CD3 antibody, hu12F6mu in patients receiving renal allografts / Jing Li, Bo Zhou, Jianzhong Shentu et al. // mAbs. – 2010. – Vol. 2 (4). – P. 449-556 Effector Function Activities of a Panel of Mutants of a Broadly Neutralizing Antibody against Human Immunodeficiency Virus Type 1 / Marjan Hezareh, Ann J. Hessel, Richard C. Jensen et al. // Journal of virology. – 2001. – Vol. 75 (24). – P. 12161-12168</p>
---	--

## (54) ГУМАНІЗОВАНЕ АНТИТІЛО, ЩО ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З CD3 ЛЮДИНИ

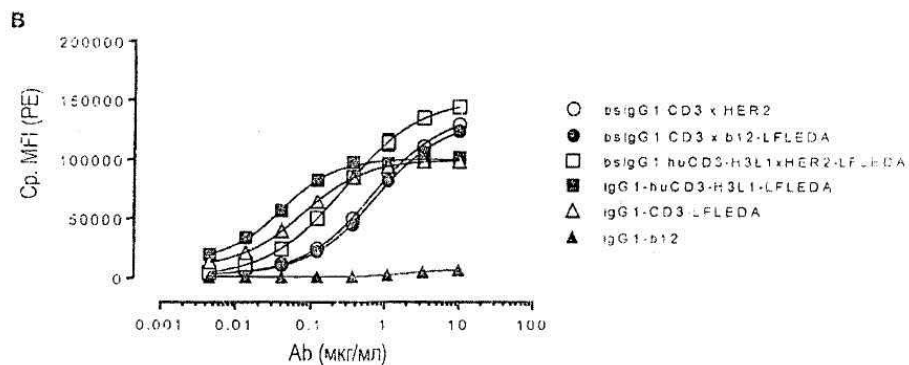
(57) Реферат:

UA 119646 C2

Винахід стосується гуманізованого антитіла, що зв'язується з CD3 людини. Також, винахід стосується біспецифічного антитіла, конструкції з нуклеїнової кислоти, експресуючого вектора, клітини хазяїна, фармацевтичної композиції, способу одержання антитіла, діагностичної композиції, способу виявлення наявності антигену CD3 та набору для виявлення наявності антигену CD3 або клітин, експресуючих CD3, у зразку.



Антитело	EC50 (мкг/мл)
IgG1-huCD3-H1L1	0.07
IgG1-huCD3-H1L2	0.08
IgG1-huCD3-H1L3	0.06
IgG1-huCD3-H3L3	0.02
IgG1-huCD3-H4L1	0.05
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.08



Антитело	EC50 (мкг/мл)
bsIgG1 CD3 x HER2	0.68
bsIgG1 CD3 x b12-LFLEDA	0.75
bsIgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-CD3-LFLEDA	0.07

Даний винахід стосується гуманізованих або химерних антитіл, що зв'язуються з CD3 людини, композицій, які містять такі гуманізовані або химерні антитіла, і застосування таких гуманізованих або химерних антитіл при лікуванні захворювань.

Попередній рівень техніки

5 Кластер диференціювання 3 (CD3) відомий уже багато років і тому він був предметом інтересу в багатьох відношеннях. Зокрема, відомі антитіла проти CD3 або комплексу Т-клітинних рецепторів, до складу якого входить CD3. Були описані характеристики *in vitro* 5 гуманізованих варіантів антитіл з ефекторною функцією ОКТ3 [1].

10 Лікування моноклональним антитілом hОКТ3gamma1 (Ala-Ala) проти CD3 приводить до поліпшення відповідей на С-пептид і клінічних параметрів протягом щонайменше 2 років після виникнення цукрового діабету 1-го типу за відсутності безперервного застосування імунодепресивних препаратів [2].

15 Перспективний підхід до поліпшення прицільної терапії антитілами полягає в доставці цитотоксичних клітин спеціально до експресуючих антиген ракових клітин. Ця концепція застосування Т-клітин для ефективного знищення клітин пухлин уже була описана [3]. Проте, первинні клінічні дослідження були досить невтішними в основному через низьку ефективність, важкі побічні ефекти (цитокіновий шторм) та імуногеність біспецифічних антитіл [4]. Досягнення в області розробки й застосування біспецифічних антитіл змогли частково подолати первинний бар'єр цитокінового шторму й поліпшити клінічну ефективність без обмежуючої дозування токсичності [5].

20 Наприклад, деякі біспецифічні антитіла, у яких одне плече спрямоване на антиген на пухлинних клітинах, а інше плече, приміром, на CD3 на Т-клітинах, забезпечують зв'язування Fc-рецептора з Fc-фрагментом. Після зв'язування утворюється комплекс Т-клітин, пухлинних клітин і ефекторних клітин, який зв'язується з Fc-фрагментом антитіла, що призводить до загибелі пухлинних клітин [4]. Катумаксомаб (catumaxomab) складається з гетеродимера IgG2a миші й IgG2b пацюка й виявився успішним для лікування пов'язаного з раком асцити після внутрішньоочеревинного застосування [6]. Проте, гібрид миша/пацюк є імуногенним [7] і не може застосовуватися для тривалого внутрішньовенного введення людині. Пов'язані з лікуванням часті побічні ефекти, що відносяться до катумаксомабу, включають симптоми, пов'язані з вивільненням цитокінів (тобто гіпертермію, нудоту, блювоту, пропасницю, тахікардію й гіпотензію) [8]-[9], які пов'язані з ефекторною функцією Fc-фрагмента катумаксомаба. Інше антитіло – ертумаксомаб (ertumaxomab, HER2×CD3), який викликає цитотоксичність у клітинних лініях з низькою експресією HER2. Ертумаксомаб проходить II фазу клінічної розробки для метастатичного раку молочної залози [10]-[11].

35 Були описані антитіла до CD3, що дають перехресну реакцію з CD3 яванської макаки-краб'їда й/або макаки-резус [12]-[13], однак необхідне подальше вдосконалення таких антитіл, що дають перехресну реакцію.

Суть винаходу

40 Об'єктом даного винаходу є одержання гуманізованих або химерних антитіл до CD3. Так, в одному аспекті даний винахід стосується гуманізованих або химерних антитіл, що зв'язуються з CD3 людини, причому такі антитіла містять у собі єднальну область, що містить CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH), послідовності яких наведені в SEQ ID NO: 1, 2 і 3, відповідно, і CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області легкого ланцюга (VL), послідовності яких наведені в SEQ ID NO: 4, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 5, відповідно.

В іншому аспекті даний винахід стосується біспецифічних антитіл, що містять першу єднальну область антитіла за винаходом й другу єднальну область, яка зв'язується з іншою мішенню, ніж дана перша область, що зв'язує антиген.

50 В іншому аспекті даний винахід стосується конструкцій з нуклеїнової кислоти, що кодують одну або кілька амінокислотних послідовностей за винаходом.

В іншому аспекті даний винахід стосується експресуючого вектора, що містить (i) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність важкого ланцюга гуманізованого або химерного антитіла за винаходом, (ii) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність легкого ланцюга гуманізованого або химерного антитіла за винаходом, або ж (iii) – і (i), і (ii).

55 В іншому аспекті даний винахід стосується клітин хазяїна, що містять експресуючий вектор за винаходом.

В іншому аспекті даний винахід стосується композицій, які містять антитіло або біспецифічне антитіло за винаходом.

60 В іншому аспекті даний винахід стосується фармацевтичних композицій, які містять антитіло або біспецифічне антитіло за винаходом й фармацевтично прийнятний носій.

В іншому аспекті даний винахід стосується антитіл або біспецифічних антитіл, композицій або фармацевтичних композицій за винаходом для застосування як лікарського засобу.

В іншому аспекті даний винахід стосується антитіл або біспецифічних антитіл, композицій або фармацевтичних композицій за винаходом для застосування при лікуванні захворювань.

5 В іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування захворювань, який включає введення антитіла або біспецифічного антитіла, композиції або фармацевтичної композиції за винаходом пацієнтові, який цього потребує.

В одному аспекті даний винахід стосується способу діагностики захворювань, які характеризуються участю або нагромадженням експресуючих CD3 клітин, який включає  
10 введення суб'єктові гуманізованого або химерного антитіла, композиції або фармацевтичної композиції за винаходом, при цьому необов'язково дане гуманізоване або химерне антитіло мітитися детектованою міткою.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу одержання антитіл або біспецифічних антитіл за винаходом, який включає стадії а) культивування клітин хазяїна за винаходом й b) виділення антитіл з культурального середовища.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу одержання антитіл або біспецифічних антитіл за винаходом, який включає стадії а) культивування клітин хазяїна за винаходом й b) виділення антитіл з культурального середовища.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу виявлення наявності антигену CD3 або клітин, експресуючих CD3, у зразку, який включає стадії а) контактування зразка з антитілом або  
20 біспецифічним антитілом за винаходом в умовах, що сприяють утворенню комплексу між антитілом або біспецифічним антитілом і CD3, і b) аналізу того, чи утворився комплекс.

В іншому аспекті даний винахід стосується набору для виявлення наявності антигену CD3 або клітин, експресуючих CD3, у зразку, який включає і) антитіло або біспецифічне антитіло за винаходом й ii) інструкції із застосування набору.

25 В іншому аспекті даний винахід стосується антиідіотипічних антитіл, які зв'язуються з антитілом за винаходом.

Короткий опис фігур

На Фіг. 1 представлені криві зв'язування (Фіг. 1A) варіантів моноспецифічних антитіл IgG1-huCD3 і (Фіг. 1B) варіантів біспецифічних антитіл bsIgG1-huCD3×HER2 з Т-клітинами лінії Jurkat  
30 людини. Дані представлені у вигляді середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) з одного репрезентативного експерименту, як описано в прикладі 2. У таблицях наведені концентрації антитіл (мкг/мл), що дають напівмаксимальне зв'язування (EC<sub>50</sub>).

На Фіг. 2 представлені криві зв'язування (Фіг. 2A) варіантів моноспецифічних антитіл IgG1-huCD3 і (Фіг. 2B) варіантів біспецифічних антитіл bsIgG1-huCD3×HER2 з Т-клітинами лінії HSC-F  
35 макаки-крабоїда. Дані представлені у вигляді середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) з одного репрезентативного експерименту, як описано в прикладі 2.

На Фіг. 3 представлена активація Т-клітин варіантами антитіл IgG1-CD3. Експресію CD69 на Т-клітинах людини (Фіг. 3A) і макаки (3B) у культурі PBMC вимірювали методом FACS, як описано у прикладі 3. Ці експерименти повторювали двічі, а представлені репрезентативні  
40 результати з одного експерименту.

На Фіг. 4 представлена проліферація Т-клітин, індукована варіантами антитіл IgG1-CD3. Клітини PBMC людини (Фіг. 4A) або макаки (Фіг. 4B) інкубували з варіантами антитіл IgG1-CD3 протягом 3 днів, після чого вимірювали проліферацію методом ELISA для проліферації клітин, як описано в прикладі 4. Представлені репрезентативні результати із двох незалежних  
45 експериментів.

На Фіг. 5 представлена опосередкована Т-клітинами людини (Фіг. 5A) й макаки (5B) цитотоксичність, індукована варіантами антитіл huCD3 з неактивуючими мутаціями LFLEDA, яку визначали, як описано в прикладі 5. Представлені репрезентативні результати із двох незалежних експериментів, виконаних у двох повторях.

50 На Фіг. 6 представлені криві зв'язування неактивуючих варіантів моноспецифічних антитіл IgG1-huCD3 (Фіг. 6A) і неактивуючих варіантів біспецифічних антитіл bsIgG1-huCD3×HER2 (Фіг. 6B) з Т-клітинами лінії Jurkat людини. Дані представлені у вигляді середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) з одного репрезентативного експерименту, як описано в прикладі 2. У таблицях наведені концентрації антитіл (мкг/мл), що дають напівмаксимальне зв'язування  
55 (EC<sub>50</sub>).

На Фіг. 7 представлені криві зв'язування неактивуючих варіантів моноспецифічних антитіл IgG1-huCD3 (Фіг. 7A) і неактивуючих варіантів біспецифічних антитіл bsIgG1-huCD3×HER2 (Фіг. 7B) з Т-клітинами лінії HSC-F макаки. Дані представлені у вигляді середньої інтенсивності флуоресценції (MFI) з одного репрезентативного експерименту, як описано в прикладі 2. У  
60 таблицях наведені концентрації антитіл (мкг/мл), що дають напівмаксимальне зв'язування

(EC<sub>50</sub>).

На Фіг. 8 представлена активація Т-клітин неактивуючими моноспецифічними варіантами антитіл IgG1-huCD3 ((Фіг. 8A й B) або неактивуючими біспецифічними варіантами антитіл bsIgG1-huCD3xHER2 ((Фіг. 8C і D). Експресію CD69 на Т-клітинах людини (Фіг. 8A і C) і макаки (Фіг. 8B і D) у культурі PBMC вимірювали методом FACS, як описано у прикладі 3. Ці експерименти повторювали двічі, а представлені репрезентативні результати з одного експерименту.

На Фіг. 9 представлена проліферація Т-клітин, індукована неактивуючими моноспецифічними варіантами антитіл IgG1-huCD3 (Фіг. 9A й B) або неактивуючими біспецифічними варіантами антитіл bsIgG1-huCD3xHER2 (Фіг. 9C і D). Проліферацію Т-клітин вимірювали на клітинах PBMC людини (Фіг. 9A і C) або макаки (Фіг. 9B і D), які інкубували з різними варіантами антитіл протягом 3 днів, після чого вимірювали проліферацію методом ELISA для проліферації клітин, як описано в прикладі 4. Представлені репрезентативні результати із двох незалежних експериментів.

На Фіг. 10 представлена опосередкована Т-клітинами людини (Фіг. 10A) й макаки (Фіг. 10B) цитотоксичність, індукована варіантами антитіл huCD3 з неактивуючими мутаціями LFLEDA, яку визначали, як описано в прикладі 5. Представлені репрезентативні результати із двох незалежних експериментів, виконаних у двох повторях.

На Фіг. 11 представлена активація Т-клітин макаки резус варіантами антитіл IgG1-huCD3. Експресію CD69 на Т-клітинах макаки в культурі PBMC вимірювали методом FACS, як описано у прикладі 6.

На Фіг. 12 представлена активація Т-клітин неактивуючими варіантами антитіл huCLB-T3/4. Варіанти IgG1-huCLB-T3/4 титрували на PBMC. Експресію CD69 на Т-клітинах у культурі PBMC вимірювали методом FACS, як описано у прикладі 7. Представлені репрезентативні результати з 3 експериментів.

На Фіг. 13 представлена проліферація Т-клітин неактивуючими варіантами антитіл huCLB-T3/4. Клітини PBMC інкубували з антитілами протягом 3 днів, після чого вимірювали проліферацію методом ELISA для проліферації клітин, як описано в прикладі 8. Представлені репрезентативні результати із двох незалежних експериментів.

На Фіг. 14 представлена опосередкована Т-клітинами *in vitro* цитотоксичність, індукована неактивуючими варіантами антитіл до CD3. Індукування опосередкованої Т-клітинами цитотоксичності варіантами антитіл (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ, LFLEDANQPS [Фіг. 14A-G]) визначали, як викладено в прикладі 9. Представлені середні значення із двох експериментів, виконаних у двох повторях.

На Фіг. 15 представлена опосередкована Т-клітинами *in vitro* цитотоксичність, індукована неактивуючими варіантами антитіл huCLB-T3/4. Індукування опосередкованої Т-клітинами цитотоксичності варіантами антитіл (LFLEDA, LAL [Фіг. 15A-C]) визначали, як описано в прикладі 9. Представлені середні значення з одного експерименту, виконаного у двох повторях.

На Фіг. 16 представлена оцінка зв'язування C1q з неактивуючими варіантами антитіл huCLB-T3/4. Зв'язування C1q з моноспецифічними антитілами IgG1-huCLB-T3/4 (Фіг. 16A-C) і біспецифічними антитілами bsIgG1-huCLB-T3/4xHER2 (Фіг. B-D) і їх неактивуючими варіантами визначали методом ELISA, як описано в прикладі 10. Результати на графіках представлені для n=2 експериментів.

На Фіг. 17 представлений аналіз фармакокінетики (ПК) неактивуючих варіантів антитіл huCLB-T3/4 у порівнянні з антитілом дикого типу IgG1-huCLB-T3/4, як описано в прикладі 11. Будували графіки концентрації IgG1 у плазмі людини залежно від часу (Фіг. 17A). Швидкість кліренсу в плазмі розраховували, як описано в прикладі 11 (Фіг. 17B). Горизонтальна пунктирна лінія представляє середню швидкість кліренсу антитіл IgG1 людини в мишей SCID (10 мл/день/кг).

На Фіг. 18 представлена частота позитивних Т-клітинних відповідей серед здорових HLA-типіваних донорів. Індеси SI  $\geq 1,9$  при аналізі як проліферації, так і секреції IL-2 уважалися позитивними відповідями. У якості клінічного еталона контрольного антитіла використовували гуманізоване антитіло A33, яке проявляє високий рівень імуногенності в клініці й зазвичай викликає 20-30 % Т-клітинних відповідей при аналізі методом EpiScreen. Також включені відповіді KLN для перевірки якості PBMC (після відтавання).

На Фіг. 19 представлено сполучення послідовностей варіабельної області важкого ланцюга (VN) і легкого ланцюга (VL) у гуманізованих антитілах до CD3 за даним винаходом.

Докладний опис винаходу

В одному аспекті даний винахід стосується гуманізованих або химерних антитіл, що зв'язуються з CD3 людини, причому такі антитіла містять у собі єднальну область, яка містить

CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області важкого ланцюга (VH), послідовності яких наведені в SEQ ID NO: 1, 2 і 3, відповідно, і CDR1, CDR2 і CDR3 варіабельної області легкого ланцюга (VL), послідовності яких наведені в SEQ ID NO: 4, послідовність GTN і послідовність, наведену в SEQ ID NO: 5, відповідно.

5 Термін "антитіло" у даному винаході служить для позначення молекул імуноглобуліну, фрагментів молекул імуноглобуліну або похідних будь-кого з них, які мають здатність до специфічного зв'язування з антигеном у звичайних фізіологічних умовах з періодом напіврозпаду, який становить значний період часу, як то: щонайменше 30 хвилин, щонайменше 45 хвилин, щонайменше 1 годину, щонайменше 2 години, щонайменше 4 години, щонайменше 8 годин, щонайменше 12 годин, 24 години або більше, 48 годин або більше, 3, 4, 5, 6, 7 днів або більше і т.д., або ж будь-який інший значимий, функціонально визначений період часу (приміром, достатній, щоб викликати, сприяти, підсилювати й/або модулювати фізіологічну реакцію, пов'язану зі зв'язуванням антитіла з антигеном, і/або достатній для того, щоб антитіло задіяло ефекторну активність). Єднальна область (або єднальний домен, що також може застосовуватися в даному описі, причому обидва терміни мають те саме значення), яка взаємодіє з антигеном, включає варіабельні області важких і легких ланцюгів молекули імуноглобуліну. Константні області антитіл (Ab) можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну із тканинами або факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (як, наприклад, ефекторні клітини й Т-клітини) і компонента системи комплементу типу C1q, першого компонента в класичному шляху активації комплементу. Як зазначено вище, у даному винаході термін "антитіло", якщо не зазначене інакше або явно не суперечить контексту, включає фрагменти антитіл, які зберігають здатність до специфічної взаємодії, як, наприклад, зв'язування, з антигеном. Було показано, що антиген-єднальна функція антитіл може виконуватися фрагментами повнорозмірних антитіл. Приклади єднальних фрагментів, охоплюваних терміном "антитіло", включають (i) Fab'- або Fab-фрагменти – моновалентні фрагменти, які складаються із доменів  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  і  $C_H1$ , або моновалентні антитіла, описані в WO 2007059782 (Genmab A/S); (ii)  $F(ab')_2$ -фрагменти – бівалентні фрагменти, які містять два Fab-фрагмента, з'єднаних дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd-фрагменти, які складаються в основному з доменів  $V_H$  і  $C_H1$ ; і (iv) Fv-фрагменти, які складаються в основному з доменів  $V_L$  і  $V_H$  одного плеча антитіла. Крім того, хоча два домени фрагмента  $F_v$ ,  $V_L$  і  $V_H$ , кодуються окремими генами, але їх можна з'єднати рекомбінантними методами через синтетичний лінкер, який дозволить їм вироблятися у вигляді єдиного білкового ланцюга, у якому області  $V_L$  і  $V_H$  утворюють пари з утворенням моновалентних молекул (відомих як одноланцюгові антитіла або одноланцюгові Fv (scFv), наприклад, див. Bird et al., Science 242, 423-426 (1988); і Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такі одноланцюгові антитіла охоплюються терміном "антитіло", якщо не зазначене інакше або не очевидно з контексту. Хоча такі фрагменти зазвичай охоплюються значенням терміна "антитіло", однак усі вони разом і незалежно один від одного є унікальними особливостями даного винаходу, проявляючи різноманітні біологічні властивості й корисність. Ці й інші корисні фрагменти антитіл обговорюються в контексті даного винаходу далі. Слід також мати на увазі, що термін "антитіло", якщо не зазначене інакше, також охоплює й поліклональні антитіла, моноклональні антитіла (mAbs), химерні антитіла й гуманізовані антитіла, а також фрагменти антитіл, що зберігають здатність до специфічного зв'язування з антигеном (антиген-єднальні фрагменти), отримані будь-яким відомим методом типу ферментативного розщеплення, пептидного синтезу й рекомбінантних методів. Отримані антитіла можуть мати будь-який ізотип.

Термін "імуноглобуліновий важкий ланцюг", "важкий ланцюг імуноглобуліну" або "важкий ланцюг" у даному винаході служить для позначення одного з ланцюгів імуноглобуліну. Важкий ланцюг зазвичай складається з варіабельної області важкого ланцюга (скорочено  $V_H$ ) і константної області важкого ланцюга (скорочено  $C_H$ ), які визначають ізотип імуноглобуліну. Константна область важкого ланцюга зазвичай складається із трьох доменів,  $C_H1$ ,  $C_H2$  і  $C_H3$ . Константна область важкого ланцюга також може включати шарнірну область. Термін "імуноглобулін" у даному винаході служить для позначення цілого класу близьких за структурою глікопротеїнів поліпептидних ланцюгів, які складаються із двох пар: однієї пари легких (L) низькомолекулярних ланцюгів і однієї пари важких (H) ланцюгів, причому всі чотири ланцюги потенційно з'єднуються між собою дисульфідними зв'язками. Структура імуноглобулінів добре вивчена (наприклад, див. [14]). У структурі імуноглобуліну два важкі ланцюги з'єднуються між собою дисульфідними зв'язками в так званий "шарнірній області". Так само, як і важкі ланцюги, кожний легкий ланцюг зазвичай складається з декількох областей: варіабельної області легкого ланцюга (скорочено  $V_L$ ) і константної області легкого ланцюга (скорочено  $C_L$ ). Константна область легкого ланцюга, як правило, складається з одного домена  $C_L$ . Крім того, області  $V_H$  і  $V_L$

можна додатково підрозділити на ділянки гіперваріабельності (або гіперваріабельні ділянки, які можуть бути гіперваріабельними за послідовністю й/або утворювати петлі з певною структурою), які також називають визначальними комплементарність ділянками (CDR), упереміж з більш консервативними ділянками, які іменуються каркасними ділянками (FRs). Як правило, кожний  $V_H$  і  $V_L$  складається із трьох CDR і чотирьох FR, що розташовуються від N-кінця до C-кінця в наступному порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (див. [15]). Послідовності CDR можна визначити методом, який надається IMGT [16]-[17].

Термін "ізотип" у даному винаході відноситься до класу імуноглобулінів (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, або IgM) або будь-якого їх алотипу, такого як IgG1m(za) і IgG1m(f) [SEQ ID NO: 15]), який кодується генами константної області важкого ланцюга. Так, в одному втіленні антитіло містить важкий ланцюг імуноглобуліну класу IgG1 або будь-якого його алотипу. Крім того, кожний ізотип важкого ланцюга може сполучатися з легким ланцюгом типу каппа ( $\kappa$ ) або лямбда ( $\lambda$ ).

Термін "химерне антитіло" у даному винаході відноситься до антитіл, у яких варіабельна область походить із іншого виду, ніж людей (приміром, із гризунів), а константна область походить із такого виду як людина. Химерні антитіла можуть бути отримані шляхом інженерії антитіл. Термін "інженерія антитіл" застосовується як загальний термін для різного роду модифікацій антитіл і добре відомий фахівцям. Зокрема, химерні антитіла можна одержувати стандартними методами ДНК, як описано в [18]. Так, химерними можуть бути отримані методами генетичної або ензиматичної інженерії рекомбінантні антитіла. Одержання химерних антитіл перебуває в компетенції фахівців, тому одержання химерних антитіл за даним винаходом може здійснюватися й іншими методами, ніж описані тут. Химерні моноклональні антитіла для терапевтичного застосування розробляються, щоб зменшити імуногенність антитіл. Як правило, вони містять варіабельні області не людини (наприклад, миші), які специфічні для потрібного антигену, і константні домени важкого й легкого ланцюга антитіл людини. Терміни "варіабельна область" або "варіабельні домени" у контексті химерних антитіл відносяться до тієї області, у якій містяться ділянки CDR і каркасні ділянки як важких, так і легких ланцюгів імуноглобуліну.

Термін "гуманізоване антитіло" у даному винаході відноситься до генетично сконструйованих антитіл не людини, які містять константні домени антитіл людини й варіабельні домени не людини, модифіковані для того, щоб вони мали високий рівень гомології послідовності з варіабельними доменами людини. Це може здійснюватися шляхом пересадження шести визначальних комплементарність ділянок (CDR) з антитіл не людини, спільно утворюючих антигензв'язуючий сайт, у гомологічну акцепторну каркасну область (FR) людини (див. [19]-[20]). Для повної реконструкції спорідненості зв'язування й специфічності вихідного антитіла може знадобитися вставка каркасних залишків вихідного антитіла (тобто не людини) у каркасні ділянки людини (back-мутації). Моделювання структурної гомології може допомогти встановити ті амінокислотні залишки в каркасних ділянках, які важливі для єднальних властивостей антитіла. Таким чином, гуманізоване антитіло може містити послідовності CDR не людини, переважно людські каркасні ділянки, що необов'язково містять одну або кілька зворотних мутацій амінокислот до амінокислотної послідовності не людини, і повністю людські константні області. Необов'язково можуть проводитися додаткові модифікації амінокислот, які не обов'язково є зворотними мутаціями, щоб одержати гуманізовані антитіла із кращими характеристиками типу спорідненості й біохімічних властивостей.

Гуманізовані або химерні антитіла за кожним з аспектів або втілень даного винаходу можуть іменуватися "гуманізованими або химерними антитілами до CD3", "гуманізованими або химерними антитілами за винаходом", "антитілами до CD3" або "антитілами до CD3 за винаходом", які всі мають те саме значення й зміст, якщо це не суперечить контексту.

Амінокислотна послідовність антитіл не людського походження відрізняється від антитіл людського походження, тому не людські антитіла потенційно імуногенні при введенні людям. Проте, незважаючи на те, що антитіло походить не з людини, його CDR-сегменти відповідають за здатність антитіла до зв'язування з його антигеном-мішенню, а гуманізація призначається для збереження специфічності й спорідненості зв'язування даного антитіла. Таким чином, гуманізація нелюдських терапевтичних антитіл проводиться для того, щоб звести до мінімуму їх імуногенність для людини, хоча такі гуманізовані антитіла в той же час зберігають специфічність і спорідненість зв'язування антитіл нелюдського походження.

Термін "ділянка зв'язування" у даному винаході відноситься до тієї ділянки антитіла, яка здатна зв'язуватися з будь-якою молекулою типу поліпептиду, наприклад, що перебуває на клітині, бактерії або віріоні.

Термін "зв'язування" у даному винаході відноситься до зв'язування антитіла із заданим

антигеном або мішенню, з якими воно зазвичай зв'язується зі спорідненістю, що відповідає  $K_D$  близько  $10^{-6}$  М або менше, наприклад,  $10^{-7}$  М або менше, як от  $10^{-8}$  М або менше, типу  $10^{-9}$  М або менше,  $10^{-10}$  М або менше або  $10^{-11}$  М або навіть менше, при визначенні, наприклад, методом поверхневого плазменного резонансу (SPR) на приладі BIAcore 3000 з використанням антигену в якості ліганда й антитіла як аналізованої речовини, і зв'язується із заданим антигеном зі спорідненістю, відповідною до значення  $K_D$ , яке щонайменше в 10 разів менше, як от щонайменше в 100 разів менше, приміром, щонайменше в 1000 разів менше, як от щонайменше в 10 000 разів менше, приміром, щонайменше в 100 000 разів менше, ніж його спорідненість зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїном), а не заданим антигеном або спорідненим антигеном. Ступінь, у якому спорідненість буде менше, залежить від  $K_D$  антитіла, так що коли  $K_D$  антитіла дуже низька (тобто антитіло має високу специфічність), то ступінь, у якому спорідненість до антигену буде менше, ніж спорідненість до неспецифічного антигену, може становити щонайменше 10 000 разів. Термін " $K_D$ " (М) у даному винаході відноситься до рівноважної константи дисоціації конкретної взаємодії антитіло-антиген.

Термін "CD3 людини" у даному винаході відноситься до білка кластера диференціювання 3 людини, який входить до складу комплексу білка з Т-клітинним рецептором і складається із чотирьох окремих ланцюгів. CD3 також виявлений в інших видів, тому термін "CD3" може застосовуватися тут і не обмежується CD3 людини, якщо це не суперечить контексту. У ссавців комплекс містить ланцюг CD3 $\gamma$  (гама) (ланцюг CD3 $\gamma$  людини: Swissprot P09693, CD3 $\gamma$  макаки-крабоїда: Swissprot Q95LI7), ланцюг CD3 $\delta$  (дельта) (CD3 $\delta$  людини: Swissprot P04234, CD3 $\delta$  макаки-крабоїда: Swissprot Q95LI8), два ланцюги CD3 $\epsilon$  (епсилон) (CD3 $\epsilon$  людини: Swissprot P07766, CD3 $\epsilon$  макаки-крабоїда: Swissprot Q95LI5, CD3 $\epsilon$  макаки-резус: Swissprot G7NCB9), і ланцюг CD3 $\zeta$  (дзета) (CD3 $\zeta$  людини: Swissprot P20963, CD3 $\zeta$  макаки-крабоїда: Swissprot Q09TK0). Ці ланцюги асоційовані з молекулою, відомою як Т-клітинний рецептор (TCR), і генерують сигнал активації Т-лімфоцитів. Молекули TCR і CD3 разом становлять комплекс TCR.

Фахівцям повинно бути відомо, що амінокислотні послідовності, наведені у вигляді номерів Swissprot, включають і сигнальний пептид, який видаляється після трансляції білка. Таким чином, білки типу CD3, присутні на поверхні клітин, не містять сигнальних пептидів. Зокрема, амінокислотні послідовності, перераховані в табл. 1, не містять таких сигнальних пептидів. Такі білки, як наведені в табл. 1, можуть іменуватися "зрілими білками". Таким чином, SEQ ID NO: 14 представляє амінокислотну послідовність зрілого CD3 $\delta$  (дельта) людини, SEQ ID NO: 13 представляє амінокислотну послідовність зрілого CD3 $\epsilon$  (епсилон) людини, SEQ ID NO: 21 представляє амінокислотну послідовність зрілого CD3 $\epsilon$  макаки-крабоїда й SEQ ID NO: 23 представляє амінокислотну послідовність зрілого CD3 $\epsilon$  макаки-резус. Таким чином, термін "зрілий" у даному винаході відноситься до білків, які не містять ніякої сигнальної або лідерної послідовності.

Добре відомо, що гомологічність, довжина й положення сайту розщеплення послідовностей сигнальних пептидів суттєво відрізняється між різними білками. Сигнальні пептиди можна визначати різними методами, наприклад, SEQ ID NO: 13 за даним винаходом визначали за допомогою додатка Signalp (доступно на <http://www.cbs.dtu.dk/services/Signalp/>).

У кращому втіленні гуманізоване або химерне антитіло за даним винаходом зв'язується з епсилон-ланцюгом CD3, як от із епсилон-ланцюгом CD3 людини (SEQ ID NO: 13). В іншому кращому втіленні гуманізоване або химерне антитіло зв'язується з епітопом у межах амінокислот 1-27 в N-кінцевій частині CD3 $\epsilon$  (епсилон) людини (SEQ ID NO: 13). У такому кращому втіленні антитіло навіть може ще перехресно реагувати й з іншими видами приматів, ніж людина, такими як макака-крабоїд (CD 3-епсилон крабоїда: SEQ ID NO: 21) і/або макака-резус (CD 3-епсилон резусу: SEQ ID NO: 23).

Термін "перехресно реагувати" у даному винаході відноситься до здатності антитіла типу гуманізованого або химерного антитіла за винаходом до зв'язування своєї мішені у різних видів. Зокрема, гуманізоване антитіло до CD3, наведене в описаних тут прикладах, має здатність до зв'язування й з CD3 людини (приклад 2), і макаки-крабоїда (приклад 2), і макаки-резус.

Антитіла за даним винаходом, що містять послідовності CDR, як визначено тут, а також утримуючі каркасні області, можуть відрізнятися за послідовностями за межами послідовностей CDR, але усе ще повністю зберігати здатність до зв'язування, як у вихідного антитіла. Так, даний винахід також стосується антитіл, що містять амінокислотну послідовність варіабельної області, що має певну ідентичність послідовності з будь-якою описаною тут послідовністю.

Термін "ідентичність послідовності" у контексті даного винаходу означає ступінь ідентичності між двома послідовностями залежно від числа ідентичних положень, спільних для цих послідовностей (тобто гомологія в % = число ідентичних положень/загальне число положень  $\times 100$ ), з урахуванням кількості пробілів і довжини кожного пробілу, які необхідно ввести для



оптимального сполучення двох послідовностей. Ступінь ідентичності між двома нуклеотидними або амінокислотними послідовностями можна визначити, приміром, за алгоритмом E. Meyers and W. Miller [21]. Крім того, ступінь ідентичності між двома амінокислотними послідовностями можна визначити за алгоритмом Needleman and Wunsch [22]. Множинні співставлення переважно виконуються за допомогою алгоритму Clustal W [23] (він використовується, наприклад, у програмному забезпеченні Vector NTI Advance® версії 11.5; Invitrogen Inc.).

Так, в одному втіленні область  $V_H$  за амінокислотною послідовністю щонайменше на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 99 % ідентична щонайменше одній амінокислотній послідовності, наведений в числі послідовностей  $V_H$  із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6;
- b) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8;
- c) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7; i
- d) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9.

В одному кращому втіленні область  $V_H$  за амінокислотною послідовністю щонайменше на 96 % ідентична щонайменше одній амінокислотній послідовності, наведений в числі послідовностей  $V_H$  із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6;
- b) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8;
- c) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7; i
- d) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9.

В одному втіленні область  $V_L$  за амінокислотною послідовністю щонайменше на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 99 % ідентична щонайменше одній амінокислотній послідовності, наведений в числі послідовностей  $V_L$  із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- b) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11; i
- c) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12.

В одному кращому втіленні область  $V_L$  за амінокислотною послідовністю щонайменше на 95 % ідентична щонайменше одній амінокислотній послідовності, наведений в числі послідовностей  $V_L$  із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- b) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11; i
- c) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12.

В одному втіленні область  $V_H$  обрана із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6;
- b) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8;
- c) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7; i
- d) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9.

В одному втіленні область  $V_L$  обрана із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- b) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11; i
- c) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12.

В одному втіленні тільки послідовність  $V_H$  або  $V_L$  на 100 % ідентична одній з наведених тут послідовностей, тоді як інша за амінокислотною послідовністю може бути щонайменше на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 99 % ідентична одній з наведених тут послідовностей.

В одному кращому втіленні амінокислотна послідовність  $V_H$  щонайменше на 97 % ідентична щонайменше одній амінокислотній послідовності, наведений в числі послідовностей  $V_H$  із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6;
- b) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7;
- c) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8; i
- d) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9.

а амінокислотна послідовність  $V_L$  щонайменше на 95 % ідентична щонайменше одній амінокислотній послідовності, наведений в числі послідовностей  $V_L$  із групи, яка складається з:

- i) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- ii) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11; i
- iii) послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12.

В одному втіленні послідовності  $V_H$  і  $V_L$  обрані із групи, яка складається з:

a) послідовностей  $V_H$  і  $V_L$ , щонайменше на 90 % ідентичних послідовностям, наведеним в SEQ ID NO:6 і 10, відповідно; 7 і 10, відповідно; 8 і 10, відповідно; 9 і 10, відповідно; 6 і 11, відповідно; 7 і 11, відповідно; 8 і 11, відповідно; 9 і 11, відповідно; 6 і 12, відповідно; 7 і 12,









NO:9, і послідовностей  $V_L$ , щонайменше на 97 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:10, 11 або 12;

ср) послідовностей  $V_H$ , щонайменше на 99 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:9, і послідовностей  $V_L$ , щонайменше на 100 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:10, 11 або 12;

сq) послідовностей  $V_H$ , щонайменше на 100 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:9, і послідовностей  $V_L$ , щонайменше на 90 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:10, 11 або 12;

сr) послідовностей  $V_H$ , щонайменше на 100 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:9, і послідовностей  $V_L$ , щонайменше на 95 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:10, 11 або 12;

сs) послідовностей  $V_H$ , щонайменше на 100 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:9, і послідовностей  $V_L$ , щонайменше на 97 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:10, 11 або 12; і

сt) послідовностей  $V_H$ , щонайменше на 100 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:9, і послідовностей  $V_L$ , щонайменше на 99 % ідентичних послідовності, наведених в SEQ ID NO:10, 11 або 12;

В одному втіленні єднальна область містить  $V_H$  і  $V_L$ , обрані із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- b) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- c) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- d) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11;
- e) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12;
- f) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- g) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11;
- h) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:7, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12;
- i) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11;
- j) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12;
- k) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:11;

l) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:12.

У кращому втіленні єднальна область містить послідовність  $V_H$  і послідовність  $V_L$ , обрані із групи, яка складається з:

- a) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:6, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;
- b) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:8, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10;

c) послідовності  $V_H$ , наведеної в SEQ ID NO:9, і послідовності  $V_L$ , наведеної в SEQ ID NO:10.

Гуманізовані антитіла за даним винаходом можуть бути отримані шляхом порівняння амінокислотних послідовностей варіабельної області важкого й легкого ланцюга за всією базою даних гаметних послідовностей варіабельних областей людини для того, щоб ідентифікувати послідовності важкого й легкого ланцюга людини з відповідним ступенем гомології для використання як каркаса варіабельних областей людини. Можна скласти цілий ряд гуманізованих варіабельних областей важкого й легкого ланцюга шляхом пересадження ділянок CDR, наприклад, миші, у каркасні ділянки (ідентифіковані, як описано вище), і, якщо потрібно, за допомогою зворотних мутацій (мутацій одного або декількох амінокислотних залишків людини в каркасних ділянках назад в амінокислоти не людини в певних положеннях) на конкретну послідовність тих ідентифікованих залишків миші, які можуть мати вирішальне значення для відновлення ефективності зв'язування у антитіла. Потім можна відібрати варіанти послідовностей з найменшим рівнем потенційних Т-клітинних епітопів, визначених із застосуванням технологій *in silico*: iTope™ і TCED™ ([24], [25] і [26]).

Крім того, гуманізовані антитіла за даним винаходом також можна "деімунізувати". Деімунізація може бути бажана, оскільки наявність Т-клітинних епітопів людини в послідовності такого білка, як гуманізоване антитіло за даним винаходом, може збільшити ступінь ризику імуногенності, тому що вони мають потенціал для активації хелперних Т-клітин. Такої активації хелперних Т-клітин можна уникнути шляхом деімунізації. Деімунізація може здійснюватися шляхом введення мутацій в амінокислотну послідовність гуманізованого антитіла для того, щоб вилучити Т-клітинні епітопи без істотного зниження спорідненості зв'язування у антитіла.

Так, в одному втіленні даного винаходу, гуманізоване антитіло може бути отримане способом, що має стадії: (i) порівняння повної послідовності варіабельної області важкого ланцюга не людини й/або повної послідовності варіабельної області легкого ланцюга не людини

за базою даних гаметних послідовностей людини, (ii) вибору гаметної послідовності людини з найбільшою гомологією до послідовності не людини, одержуючи гуманізовану послідовність, (iii) оптимізації гуманізованої послідовності за допомогою зворотних мутацій, якщо потрібно, і (iv) експресії цієї послідовності в придатній системі експресії.

Таким чином, повнорозмірне антитіло за даним винаходом можна одержати способом, що має стадії: (i) порівняння послідовності варіабельної області важкого ланцюга не людини й послідовності варіабельної області легкого ланцюга не людини за базою даних гаметних послідовностей людини, (ii) вибору гаметної послідовності людини з найбільшою гомологією до послідовності не людини, (iii) пересадження ділянок CDR не людини в обрану гаметну послідовність людини, одержуючи гуманізовані послідовності, (iv) оптимізації гуманізованих послідовностей за допомогою зворотних мутацій, якщо потрібно, (v) визначення послідовностей константних областей важкого й легкого ланцюга, і (vi) експресування повної послідовності важкого ланцюга й повної послідовності легкого ланцюга в придатних системах експресії. Повнорозмірне антитіло за даним винаходом може бути отримане так, як описано в прикладі 1. Одержання повнорозмірного антитіла, виходячи з послідовностей CDR або повних послідовностей варіабельних областей, перебуває в компетенції фахівців. Отже фахівцям повинно бути відомо, як одержати повнорозмірне антитіло за даним винаходом.

Термін "повна послідовність важкого ланцюга" у даному винаході відноситься до послідовності, яка складається з послідовностей варіабельної області важкого ланцюга й константної області важкого ланцюга.

Термін "повна послідовність легкого ланцюга" у даному винаході відноситься до послідовності, яка складається з послідовностей варіабельної області легкого ланцюга й константної області легкого ланцюга.

Зворотні мутації можна вводити стандартними методами мутагенезу ДНК. Такі стандартні методи мутагенезу ДНК описані в [18]. З іншого боку, можна використовувати комерційно доступні набори типу Quickchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) або ж вводити потрібні зворотні мутації методом синтезу ДНК de novo.

Отже, в одному втіленні антитіло є гуманізованим антитілом.

Химерні антитіла можуть бути отримані шляхом заміни всіх послідовностей константної області антитіла не людини (типу миші) на послідовності константної області з людини. Таким чином, у химерного антитіла зберігаються повні послідовності варіабельної області не людини. Так, химерні антитіла за даним винаходом можуть бути отримані способом, що включають стадію експресування послідовностей варіабельної області важкого ланцюга не людини (SEQ ID NO: 27) і варіабельної області легкого ланцюга не людини (SEQ ID NO: 28), послідовностей константної області важкого ланцюга людини й константної області легкого ланцюга людини в придатних системах експресії, одержуючи при цьому повнорозмірне химерне антитіло. Можна використовувати й альтернативні способи. Такі способи одержання химерних антитіл перебувають у компетенції фахівців, тому фахівцям повинно бути відомо, як одержати химерне антитіло за даним винаходом.

Отже, в одному втіленні антитіло є химерним антитілом.

В одному втіленні антитіло є повнорозмірним антитілом. Термін "повнорозмірне антитіло" у даному винаході відноситься до таких антитіл (наприклад, вихідних або варіантів антитіл), у яких усі константні й варіабельні домени важкого й легкого ланцюга відповідають тим, що зазвичай зустрічаються в антитілах дикого типу цього ізотипа.

В одному втіленні антитіло містить область Fc, яка містить перший і другий важкий ланцюг імуноглобуліну.

Термін "Fc-область" у даному винаході відноситься до області, яка містить у напрямку від N-кінця до C-кінця, як мінімум шарнірну ділянку, область C<sub>H</sub>2 і область C<sub>H</sub>3. Fc-область також може містити область C<sub>H</sub>1 на N-кінці шарнірної ділянки.

Термін "шарнірна ділянка" у даному винаході відноситься до шарнірної ділянки важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, шарнірна ділянка антитіла типу IgG1 людини відповідає амінокислотам 216-230 за нумерацією Eu, наведеною в Kabat.

Якщо не зазначене інакше або не суперечить контексту, амінокислоти в послідовності константної області пронумеровані тут відповідно до індексу нумерації Eu (описаним в [27]) і можуть іменуватися "відповідно до нумерації Eu, наведеної в Kabat", "нумерацією Eu згідно Kabat" або "за системою нумерації Eu".

Термін "область C<sub>H</sub>1" або "домен C<sub>H</sub>1" у даному винаході відноситься до області C<sub>H</sub>1 важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, область C<sub>H</sub>1 антитіла типу IgG1 людини відповідає амінокислотам 118-215 за системою нумерації Eu. Проте, область C<sub>H</sub>1 також може бути будь-якого з інших підтипів, як описано тут.

Термін "область C<sub>H</sub>2" або "домен C<sub>H</sub>2" у даному винаході відноситься до області C<sub>H</sub>2 важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, область C<sub>H</sub>2 антитіла типу IgG1 людини відповідає амінокислотам 231-340 за системою нумерації Eu. Проте, область C<sub>H</sub>2 також може бути будь-якого з інших підтипів, як описано тут.

5 Термін "область C<sub>H</sub>3" або "домен C<sub>H</sub>3" у даному винаході відноситься до області C<sub>H</sub>3 важкого ланцюга імуноглобуліну. Так, наприклад, область C<sub>H</sub>3 антитіла типу IgG1 людини відповідає амінокислотам 341-447 за системою нумерації Eu. Проте, область C<sub>H</sub>3 також може бути будь-якого з інших підтипів, як описано тут.

10 В одному втіленні ізотип важкого ланцюга імуноглобуліну обраний із групи, яка складається з IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Важкий ланцюг імуноглобуліну може бути будь-якого алотипу в межах кожного із класів імуноглобулінів, таких як IgG1m(f) (SEQ ID NO: 15). Так, в одному кращому втіленні ізотипом важких ланцюгів імуноглобуліну є IgG1 або будь-який його алотип, як от IgG1m(f) (SEQ ID NO: 15).

15 При впливі на антиген CD3, який входить до складу Т-клітинного рецептора (TCR), бажані специфічні до Т-клітин механізми знищення клітин. Інші ефекторні функції, наприклад, активація комплементу, можуть бути небажаними, тому бажане зниження ефекторних функцій. Зв'язування C1q є першою стадією каскаду комплементу, тому воно служить індикатором залежної від комплементу цитотоксичності (CDC) антитіл. Якщо можна уникнути зв'язування C1q з антитілом, то можна уникнути й активації каскаду комплементу.

20 Так, в одному втіленні антитіло включає Fc-область, яка була модифікована так, щоб зв'язування C1q з даним антитілом зменшилося у порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, на 97 %, на 99 % або на 100 % при визначенні зв'язування з C1q методом ELISA.

25 Термін "модифікована" у даному винаході відноситься до такої амінокислотної послідовності Fc-області, яка не ідентична амінокислотній послідовності Fc-області дикого типу. Тобто амінокислотні залишки в певних положеннях Fc-області дикого типу були замінені, вилучені або вставлені для того, щоб змінити, приміром, сайт зв'язування з C1q, сайти зв'язування для інших ефекторних молекул або зв'язування з Fc-рецепторами (FcR). Такі модифікації амінокислотної послідовності можуть бути отримані шляхом заміни однієї або декількох амінокислот на консервативну амінокислоту або ж шляхом заміни однієї або декількох амінокислот на альтернативну амінокислоту, яка фізично й/або функціонально аналогічна амінокислоті, присутній у дикого типу. Заміни також можуть бути отримані шляхом заміни на неконсервативну амінокислоту.

35 У контексті даного винаходу, амінокислоти можуть бути описані як консервативні або неконсервативні, тому їх можна класифікувати відповідним чином. Амінокислотні залишки також можна підрозділити на класи за альтернативними фізичними і функціональними властивостями. Так, класи амінокислот можна представити у вигляді однієї або обох з нижченаведених таблиць.

Амінокислотні залишки з консервативних класів

Кислі залишки	D i E
Основні залишки	K, R i H
Гідрофільні незаряджені залишки	S, T, N i Q
Аліфатичні незаряджені залишки	G, A, V, L i I
Неполярні незаряджені залишки	C, M i P
Ароматичні залишки	F, Y i W

40

Альтернативна фізична й функціональна класифікація амінокислотних залишків

Залишки, що містять спиртову групу	S i T
Аліфатичні залишки	I, L, V i M
Залишки, пов'язані із циклоаленілами	F, H, W i Y
Гідрофобні залишки	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W i Y
Негативно заряджені залишки	D and E
Полярні залишки	C, D, E, H, K, N, Q, R, S i T
Позитивно заряджені залишки	H, K i R
Невеликі залишки	A, C, D, G, N, P, S, T i V
Дуже маленькі залишки	A, G i S
Залишки, які беруть участь у формуванні складки	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P i T
Гнучкі залишки	Q, T, K, S, G, P, D, E i R



У контексті даного винаходу, заміни в антитілах типу гуманізованих або химерних антитіл позначаються як:

вихідна амінокислота – положення – амінокислота, що заміняє.

Відносно загальноприйнятої номенклатури для амінокислот, застосовується трибуквений код або однобуквений код, включаючи коди Хаа і Х для позначення будь-якого амінокислотного залишку. Відповідно, позначення "L234F" або "Leu234Phe" означає, що антитіло містить заміну лейцину на фенілаланін у положенні амінокислоти 234.

Заміна амінокислоти в заданому положенні на будь-яку іншу амінокислоту позначається як: вихідна амінокислота – положення; наприклад, "L234".

Для таких модифікацій, при яких вихідна амінокислота й/або амінокислота, що заміняє, може містити більш ніж одну, але не всі амінокислоти, ці більш ніж одна амінокислоти можуть відділятися через "," або "/". Наприклад, заміна лейцину на фенілаланін, аргінін, лізин або триптофан у положенні 234 позначається як:

"Leu234Phe, Arg, Lys, Trp" або "Leu234Phe/Arg/Lys/Trp" або "L234F, R,K, W" або "L234F/R/K/W" або "L234 на F, R, K або W".

Такі позначення можуть застосовуватися взаємозамінно в контексті даного винаходу, але вони мають те саме значення й зміст.

Крім того, термін "заміна" охоплює заміни на будь-які з інших 19 природних амінокислот або ж на інші амінокислоти типу, що не зустрічаються в природі амінокислот. Наприклад, заміна амінокислоти L у положенні 234 містить у собі кожну з наступних заміни: 234A, 234C, 234D, 234E, 234F, 234G, 234H, 234I, 234K, 234M, 234N, 234Q, 234R, 234S, 234T, 234V, 234W, 234P і 234Y. До речі, це еквівалентно позначенню 234X, де X означає будь-яку амінокислоту, крім вихідної. Ці заміни також можуть позначатися як L234A, L234C і т.д., або L234A, C і т.д., або ж L234A/C і т.д. Те ж саме за аналогією відноситься до кожного з наведених тут положень, так що вони конкретно включають будь-які наведені тут заміни.

Антитіло за винаходом також може містити делецію амінокислотного залишку. Такі делеції позначаються "del" і включають, приміром, написання у вигляді L234del. Таким чином, у таких втіленнях лейцин у положенні 234 був вилучений з амінокислотної послідовності.

Терміни "амінокислота" і "амінокислотний залишок" можуть застосовуватися тут взаємозамінним чином.

Термін "зв'язування C1q" у даному винаході відноситься до зв'язування C1q з антитілом, коли дане антитіло зв'язане зі своїм антигеном. Термін "зв'язане зі своїм антигеном" у даному винаході відноситься до зв'язування антитіла зі своїм антигеном як *in vivo*, так і *in vitro*.

Термін "зменшувати" у даному винаході відносно зв'язування C1q означає здатність антитіла за винаходом зменшити, мінімізувати або навіть повністю інгібувати зв'язування C1q з антитілом у порівнянні зі зв'язуванням C1q з антитілом дикого типу.

Термін "антитіло дикого типу" у даному винаході відносно застосування при порівняльних аналізах антитіл за даним винаходом відноситься до таких антитіл, які ідентичні антитілу, що підлягає аналізу, але не є інертними. При цьому термін "інертні" означає те, що в модифікованій Fc-області знижене або відсутнє зв'язування з C1q при визначенні його як у прикладі 10, тобто при визначенні зв'язування з C1q методом ELISA; знижена або відсутня Fc-опосередкована проліферація Т-клітин при визначенні її як у прикладі 4, тобто при вимірюванні проліферації Т-клітин методом функціонального аналізу на основі мононуклеарів периферичної крові (PBMC); і/або знижена або відсутня Fc-опосередкована експресія CD69 при визначенні її як у прикладі 3, тобто при визначенні Fc-опосередкованої експресії CD69 методом функціонального аналізу на основі PBMC. Так, антитіло дикого типу містить амінокислоти, які зустрічаються в природі у важких ланцюгах імуноглобуліну, тобто таке антитіло не містить ніяких модифікацій амінокислот, які можуть змінити або зменшити здатність антитіла до взаємодії, наприклад, з C1q, Fc-рецепторами й т.п. При цьому антитіло дикого типу повинне залишатися активуючим антитілом, яке здатне зв'язуватися, наприклад, з C1q. Антитіла дикого типу й антитіла за даним винаходом можуть містити інші модифікації амінокислот, ніж ті, які стосуються здатності антитіла індукувати ефекторні функції, наприклад, щоб одержати з них біспецифічні антитіла.

Термін "ELISA" у даному винаході означає імуоферментний твердофазний аналіз, тобто тест, у якому для ідентифікації субстанції використовуються антитіла й зміна забарвлення. На поверхні планшета фіксується перше специфічне антитіло. Потім додають білок зі зразка, при цьому тестують зв'язування даного першого специфічного антитіла. Додають друге антитіло, що зв'язується з антитілом зі зразка. Друге антитіло пов'язане з ферментом, і на кінцевій стадії додається субстанція, що містить субстрат для ферменту. Наступна реакція дає детектований сигнал, найчастіше зміну забарвлення субстрату. Концепція методу ELISA добре відома в даній

області, і передбачені різні способи виконання ELISA у складі способу визначення антитіла за винаходом. Таким чином, дана інтерпретація не повинна сприйматися як обмежувальна, оскільки можуть застосовуватися різні форми ELISA типу описаних у прикладі 4.

Зокрема, здатність антитіл за даним винаходом зв'язуватися з C1q можна визначати методом ELISA, що включає стадії: (i) покриття даним антитілом 96-коміркового планшета, (ii) додавання 3 % сироватки, (iii) додавання антитіла проти C1q людини, (iv) проявлення планшета й (v) вимірювання OD<sub>405nm</sub>. Так, в одному втіленні антитіло включає Fc-область, яка була модифікована таким чином, що зв'язування C1q з даним антитілом зменшилося у порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 100 %, причому зв'язування з C1q визначається методом ELISA, що включає стадії: (i) покриття даним антитілом 96-коміркового планшета, (ii) додавання 3 % сироватки, (iii) додавання антитіла проти C1q людини, (iv) проявлення планшета й (v) вимірювання OD<sub>405nm</sub>. Так, у кращому втіленні зв'язування C1q визначається, як описано в прикладі 10.

Терміни "Fc-рецептор" або "FcR" у даному винаході відносяться до білка, що перебуває на поверхні деяких клітин. Fc-рецептор зв'язується з Fc-областю антитіла. Є кілька різних типів FcRs, які класифікують на основі типу антитіла, які вони розпізнають. Наприклад, Fcγ-рецептори (гама) зв'язуються з антитілами із класу IgG.

Терміни "Fcγ-рецептор", "Fc-гамма-рецептор" або "FcγR" у даному винаході відносяться до тієї групи Fc-рецепторів, які належать до надсімейства імуноглобулінів і є найбільш важливими Fc-рецепторами для індукування фагоцитозу опсонізованих (покрытих антитілами) мікробів. Це сімейство містить у собі декілька представників: FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32a), FcγRIIb (CD32b), FcγRIIIa (CD16a), FcγRIIIb (CD16b), які відрізняються за спорідненістю до антитіл через відмінності в молекулярній структурі.

Fc-опосередковані ефекторні функції є частиною біологічної активності молекул імуноглобуліну G (IgG) людини. Приклади таких ефекторних функцій включають, наприклад, залежну від антитіл опосередковану клітинами цитотоксичність (ADCC) і залежну від комплементу цитотоксичність (CDC), які запускаються при зв'язуванні різних ефекторних молекул з Fc-областю. У контексті даного винаходу "Fc-зв'язування", "зв'язування з Fc-рецептором", "зв'язування з FcR" і "зв'язування Fc-області антитіла з FcR" відносяться до зв'язування Fc-області з Fc-рецептором (FcR) або ефекторною молекулою. Терміни "зв'язування з FcγR" і "зв'язування FcγRI" відносяться до зв'язування Fc-області з Fc-гамма-рецептором і Fc-гамма-рецептором I, відповідно. При зв'язуванні антитіл до CD3 з Т-клітинами Fc-область антитіла дикого типу до CD3 зв'язується з FcRs, що перебувають на інших клітинах, наприклад, моноцитах, що веде до неспецифічної Fc-опосередкованої активації Т-клітин. Така неспецифічна Fc-опосередкована активація Т-клітин може бути небажаною. Т-клітини також можуть бути активовані шляхом прицільної або адресної активації Т-клітин. Така адресна активація Т-клітин може бути досить бажана при лікуванні цілого ряду показань, таких як рак. Термін "адресна активація Т-клітин" у даному винаході означає спрямованість Т-клітин на певні клітини типу пухлинних клітин за допомогою біспецифічного антитіла, що містить першу ділянку зв'язування для зв'язування з конкретною мішенню типу ракової мішені на пухлинних клітинах і другу ділянку зв'язувань для зв'язування зі специфічною для Т-клітин мішенню типу CD3. Таким чином, таргетинг Т-клітин на певні клітини, наприклад, пухлинні клітини, може полегшуватися за допомогою біспецифічного антитіла, у якого одна з ділянок зв'язування зв'язується з CD3, присутнім на Т-клітинах, а інша ділянка зв'язування зв'язується зі специфічним антигеном мішені, наприклад, на пухлинній клітині. При цьому усе ще може бути можлива неспецифічна, Fc-опосередкована активація Т-клітин, тому такої неспецифічної, Fc-опосередкованої активації Т-клітин за допомогою Fc-опосередкованої зшивки слід уникати і її можна відключити, зробивши Fc-область інертною для такої активності. Тим самим буде запобігатися взаємодії такої інертної Fc-області із присутніми Fc-рецепторами. При тестуванні декількома різними методами було доведено, що гуманізоване антитіло за даним винаходом є інертним, наприклад, див. приклади 3-5. Інше досліджене антитіло до CD3, huCLB-T3/4, що містить амінокислотні модифікації в Fc-області, також виявилось інертним при тестуванні різними методами, наприклад, див. приклади 7-10. Гуманізоване антитіло до CD3 за даним винаходом, що містить амінокислотні заміни L234F, L235E і D265A, як описано в прикладах, проявляло низькі рівні експресії CD69 на Т-клітинах (приклад 3), усунення Fc-опосередкованої проліферації Т-клітин (приклад 4) і відсутність неспецифічного знищення мішені при використанні у вигляді біспецифічного антитіла (приклад 5). Таким чином, гуманізоване антитіло за даним винаходом проявляє чудові результати при аналізі декількома методами в порівнянні з антитілом дикого типу.

Антитіло за даним винаходом може містити модифікації в Fc-області. Коли антитіло містить такі модифікації, воно може стати інертним або неактивуючим антитілом. Термін "інертність",

"інертна" або "неактивуюча" у даному винаході відноситься до такої Fc-області, яка, щонайменше, не здатна зв'язуватися з Fc $\gamma$ -рецепторами, індукувати Fc-опосередковану зшивку FcRs або викликати FcR-опосередковану зшивку антигенів мішені через дві Fc-області індивідуальних антитіл або не здатна зв'язуватися з C1q. Інертність Fc-області гуманізованого або химерного антитіла до CD3 переважно тестують за допомогою антитіла в моноспецифічному форматі, хоча ідентифікована при цьому інертна Fc-область може використовуватися в біспецифічних або інших гуманізованих або химерних поліспецифічних антитілах до CD3.

Для розробки терапевтичних антитіл можна сконструювати кілька варіантів, щоб зробити Fc-область антитіла неактивною для взаємодії з Fc-гамма-рецепторами й з C1q. Приклади таких варіантів описані тут.

Так, в одному втіленні антитіло містить Fc-область, яка була модифікована так, щоб дане антитіло викликало зниження Fc-опосередкованої проліферації T-клітин у порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або на 100 % при вимірюванні такої проліферації T-клітин методом функціонального аналізу на основі моноклеарів периферичної крові (PBMC).

Термін "зниження" у даному винаході означає зниження активності або експресії в порівнянні з контрольним білком типу антитіла. Зокрема, термін "зниження" відносно проліферації T-клітин означає здатність антитіла за винаходом зменшувати, мінімізувати або навіть повністю інгібувати проліферацію T-клітин у порівнянні з антитілом дикого типу. Здатність антитіла знижувати проліферацію T-клітин може бути оцінена методом функціонального аналізу на основі PBMC, як описано в прикладі 4 і прикладі 8. В одному втіленні аналіз проводиться на PBMC людини. В іншому втіленні аналіз проводиться на PBMC макаки-крабоїда. У ще одному втіленні аналіз проводиться на PBMC макаки-резус. Оскільки антитіла за даним винаходом мають перехресну реактивність, то описаний тут аналіз на основі PBMC може виконуватися на PBMC будь-якого виду, що проявляє зниження проліферації T-клітин, якщо тільки PBMC використовуваного виду перебувають у межах спектра перехресної реактивності антитіл, наприклад, людини, макаки-крабоїда або макаки-резус.

Термін "функціональний аналіз на основі моноклеарів периферичної крові (PBMC)" у даному винаході відноситься до методу, який застосовується для оцінки такої функціональної ознаки антитіла за даним винаходом, як здатність даного антитіла впливати на проліферацію T-клітин або експресію CD69, при якому присутні тільки клітини – моноклеари периферичної крові. Так, в одному втіленні проліферація T-клітин вимірюється способом, який включає стадії інкубації PBMC з антитілом у діапазоні 1-1000 нг/мл при 37 °C у зволожувальному інкубаторі з 5 % (об/об) CO<sub>2</sub> протягом трьох днів, додавання хімічної сполуки типу BrdU, яка вбудовується в ДНК проліферуючих клітин, інкубування протягом 5 годин, осадження клітин, висушування клітин, необов'язкове зберігання клітин при 4 °C, нанесення клітин на планшет для ELISA, інкубування з антитілом проти BrdU з пероксидазою протягом 90 хв. за кімнатної температури, розвиток фарбування протягом 30 хв. із 1 мг/мл 2,2'-азіно-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти), додавання 100 мкл 2 % щавелевої кислоти для зупинки реакції й вимірювання оптичної щільності при 405 нм на придатному зчитувальному обладнанні.

Термін "проліферація" у даному винаході позначає ріст клітин у контексті поділу клітин.

Термін "BrdU" у даному винаході означає 5-бром-2'-дезоксидуридин, який є гомологом тимідина. При додаванні BrdU у культуру клітин на обмежений період часу (наприклад, 4 години) він буде вбудовуватися в ДНК проліферуючих клітин. Детектування включеного BrdU може проводитися після фіксації клітин методом ELISA за допомогою антитіла проти BrdU з пероксидазою. Таким чином, включення BrdU є заходом проліферації.

В одному втіленні антитіло містить Fc-область, яка була модифікована так, щоб дане антитіло знижувало Fc-опосередковану експресію CD69 щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або на 100 % у порівнянні з антитілом дикого типу при визначенні Fc-опосередкованої експресії CD69 методом функціонального аналізу на основі PBMC.

Термін "зниження" у даному винаході означає зниження активності або експресії в порівнянні з контрольним білком типу антитіла. Зокрема, термін "зниження" відносно рівня експресії маркера активації T-клітин CD69 означає зниження рівня експресії CD69 у порівнянні з рівнем експресії CD69 при зв'язуванні T-клітин з антитілом дикого типу, за умови, що єдальні ділянки обох антитіл зв'язуються з CD3. Здатність антитіла знижувати експресію CD69 може бути оцінена методом функціонального аналізу на основі PBMC, як описано в прикладі 3 і прикладі 7. Так, в одному втіленні експресія CD69 вимірюється способом, який включає стадії інкубації PBMC з антитілом у діапазоні 1-1000 нг/мл при 37 °C у зволожувальному інкубаторі з 5 %

(об/об) CO<sub>2</sub> протягом 16-24 годин, відмивання клітин, фарбування клітин при 4 °C за допомогою мишачого антитіла проти CD28 людини з PE і мишачого антитіла проти CD69 людини з APC і визначення експресії CD69 на CD 28-позитивних клітинах методом проточної цитометрії.

Термін "CD69" у даному винаході відноситься до кластера диференціювання 69, який є трансмембранним білком людини типу лектина C, кодований геном CD69. Активація Т-лімфоцитів і клітин нормальних кілерів (NK), як *in vivo*, так і *in vitro*, індукуює експресію CD69. CD69 функціонує в якості рецептора, який передає сигнал, бере участь у явищах активації клітин, включаючи проліферацію, функціонує в якості рецептора, який передає сигнал у лімфоцитах, включаючи клітини нормальних кілерів, і в тромбоцитах, і індукції певних генів.

Термін "функціональний аналіз на основі моноклеарів периферичної крові (PBMC)" у даному винаході відноситься до методу, який застосовується для оцінки такої функціональної ознаки антитіла за даним винаходом, як здатність даного антитіла впливати на проліферацію Т-клітин або експресію CD69, при якому присутні тільки клітини – моноклеари периферичної крові. Функціональний аналіз на основі PBMC, який описано в прикладах 3, 4, 5 і 7, включає стадії: (i) інкубації PBMC з антитілом при 37 °C в зволожувальному інкубаторі з 5 % (об/об) CO<sub>2</sub> протягом 16-24 годин, (ii) відмивання клітин, (iii) фарбування клітин при 4 °C за допомогою мишачого антитіла проти CD28 людини з PE і мишачого антитіла проти CD69 людини з APC і (iv) визначення експресії CD69 на CD 28-позитивних клітинах методом проточної цитометрії, коли визначається експресія CD69. Так, в одному втіленні експресія CD69 визначається, як описано в прикладі 3, 4, 5 або 7.

Отже, можна модифікувати ті амінокислоти в Fc-області, які відіграють головну роль у взаємодії з C1q і Fc-гамма-рецепторами. Приклади положень амінокислот, які можна модифікувати, включають положення L234, L235 і P331. Їхні комбінації типу L234F/L235E/P331S можуть викликати сильне зниження зв'язування з CD64, CD32A, CD16 і C1q людини.

Тому в одному втіленні, щонайменше в одному положенні, що відповідає L234, L235 і P331, може бути амінокислота A, A і S, відповідно ([1], [28]). Крім того, амінокислотні заміни L234F і L235E можуть привести до усунення взаємодії Fc-області з Fc-гамма-рецепторами й C1q ([29]-[30]). Тому в одному втіленні, у положеннях, що відповідають L234 і L235, можуть бути амінокислоти F і E, відповідно. Амінокислотна заміна D265A може знижувати зв'язування з усіма Fc-гамма-рецепторами й запобігати ADCC ([31]). Тому в одному втіленні, у положенні, що відповідає D265, може бути амінокислота A. Зв'язування з C1q може усуватися при мутаціях у положеннях D270, K322, P329 і P331. Мутації в цих положеннях на D270A, на K322A або на P329A або на P331A можуть зробити антитіло дефектним за активністю CDC ([32]). Тому в одному втіленні, щонайменше в одному положенні, що відповідає D270, K322, P329 і P331, можуть бути амінокислоти A, A, A і A, відповідно.

Альтернативний підхід до мінімізації взаємодії Fc-області з Fc-гамма-рецепторами й C1q полягає у видаленні сайту глікозилювання у антитіла. Мутації в положенні N297, наприклад, на Q, A або E, усувають сайт глікозилювання, який відіграє вирішальну роль у взаємодіях IgG-Fcγ-рецептор. Тому в одному втіленні, у положенні, що відповідає N297, може бути амінокислота G, Q, A або E ([33]). В іншому альтернативному підході мінімізація взаємодії Fc-області з Fc-гамма-рецепторами досягається при наступних мутаціях: P238A, A327Q, P329A або E233P/L234V/L235A/G236del ([31]).

З іншого боку, підкласи IgG2 і IgG4 людини вважаються природно дефектними за взаємодіями з C1q і Fc-гамма-рецепторами, хоча й були повідомлення про взаємодії з Fcγ-рецепторами (Fc-гамма-рецепторами) ([34]-[35]). В обох ізотипів можуть бути отримані мутації, що усувають ці залишкові взаємодії, що веде до зменшення небажаних побічних ефектів, пов'язаних зі зв'язуванням з FcR. Для IgG2 вони включають L234A і G237A, а для IgG4 – L235E. Тому в одному втіленні, у положеннях, що відповідають L234 і G237 у важкому ланцюзі IgG2 людини, можуть бути амінокислоти A і A, відповідно. В одному втіленні, у положенні, що відповідає L235 у важкому ланцюзі IgG4 людини, може бути амінокислота E.

Інші підходи до подальшої мінімізації взаємодії з Fc-гамма-рецепторами й C1q в антитіл IgG2 включають ті, що описані в [36] і [37].

Шарнірна область антитіла також може мати важливе значення відносно взаємодій з Fc-гамма-рецепторами й комплементом ([38]-[39]). Відповідно, мутації або делеції в шарнірній області можуть впливати на ефекторні функції антитіла.

Термін "перехресна зшивка" у даному винаході відноситься до непрямої перемички між Fab-плечима антитіла (моновалентно або бівалентно), пов'язаного із цільовим антигеном в FcR-несучої клітини за допомогою зв'язування з Fc-областю антитіла. Таким чином, антитіло, яке зв'язується зі своїм цільовим антигеном на цільових клітинах, що несуть антиген, може утворювати перехресну зшивку з іншою клітиною, яка експресує FcR.

Термін "неспецифічна загибель" у даному винаході відноситься до загибелі клітин під дією цитотоксичної функції Т-клітин або інших ефекторних клітин, через незалежну від цільового пухлинного антигену активацію даних клітин. Таким чином, під неспецифічною загибеллю мають на увазі, що клітини, які несуть мішені пухлини, можуть бути знищені, наприклад, цитотоксичними Т-клітинами, а не антитілами, що зв'язують мішені пухлини, наприклад, при індукції CDC.

Автори даного винаходу показали (див. приклад 3-5, 7-10), що неактивуючу Fc-область можна отримати шляхом модифікації однієї або декількох з, щонайменше, п'яти визначених положень амінокислот в Fc-області.

Так, в одному втіленні антитіло містить перший і другий важкий ланцюг імуноглобуліну, причому щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів імуноглобуліну одна або кілька амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені не L, L, D, N і P, відповідно.

В одному втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів одна або кілька амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені не L, L, D, N і P, відповідно.

В іншому втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів одна або декількох амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені не L, L і D, відповідно, а амінокислоти в положеннях, що відповідають N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені N і P, відповідно.

Термін "амінокислота, яка відповідає положенню" у даному винаході відноситься до номера положення амінокислоти у важкому ланцюзі IgG1 людини. Якщо не зазначено інакше або не суперечить контексту, амінокислоти в послідовностях константної області пронумеровані тут відповідно до індексу нумерації Eu (описаним в [27]). Так, амінокислоти або сегменту в одній послідовності "відповідає" така амінокислота або сегмент в іншій послідовності, яка сполучається з іншою амінокислотою або сегментом при використанні стандартної програми суміщення послідовностей типу ALIGN, ClustalW або аналогічної, як правило, при налаштуваннях за замовчуванням, і ідентична щонайменше на 50 %, на 80 %, на 90 % або на 95 % важкому ланцюгу IgG1 людини. Уважається, що в даній області добре відомо, як сумістити послідовність або сегмент у послідовності й тим самим визначити положення в послідовності, відповідно до положення амінокислоти за даним винаходом.

У контексті даного винаходу амінокислота може бути визначена так, як описано вище.

Термін "амінокислота представлена не" або аналогічні вирази відносно амінокислот у важкому ланцюзі слід розуміти як те, що амінокислота представлена будь-якою іншою амінокислотою, ніж дана зазначена амінокислота. Наприклад, те, що амінокислота в положенні, що відповідає L234 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не L, означає, що амінокислота може бути представлена будь-якою іншою, що зустрічаються або не зустрічаються в природі амінокислотою, крім L.

В одному втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не D.

В одному втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не D, а амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені N і P, відповідно.

В одному втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена гідрофобною або полярною амінокислотою.

Термін "гідрофобні" у даному винаході відносно амінокислотних залишків означає амінокислотні залишки, обрані із групи, яка складається з: A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, Y. Так, в одному втіленні, щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із групи амінокислот, яка складається з: A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W і Y.

Термін "полярні" у даному винаході відносно амінокислотних залишків означає амінокислотні залишки, обрані із групи, яка складається з: C, D, E, H, K, N, Q, R, S і T. Так, в одному втіленні, щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із групи, яка складається з: C, E, H, K, N, Q, R, S і T.

В іншому втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини,



В одному втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню N297 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не N, а амінокислота в положенні, яке відповідає положенню P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена P.

5 В одному втіленні в обох з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню N297 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не N.

В одному втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислота в положенні, яке відповідає положенню N297 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не N, а амінокислота в положенні, яке відповідає положенню P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена P.

У наступному втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені не L і L, відповідно.

В одному втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені не L і L, відповідно, а амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені N і P, відповідно.

В одному втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислоти, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрані із групи, яка складається з: A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, Y, V.

В одному втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені гідрофобними або полярними амінокислотами.

25 Термін "гідрофобні" у даному винаході відносно амінокислотних залишків означає амінокислотні залишки, обрані із групи, яка складається з: A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W і Y. Так, в одному втіленні, щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів кожна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із групи, яка складається з: A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W і Y.

Термін "полярні" у даному винаході відносно амінокислотних залишків означає амінокислотні залишки, обрані із групи, яка складається з: C, D, E, H, K, N, Q, R, S і T. Так, в одному втіленні, щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів кожна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із групи, яка складається з: C, D, E, H, K, N, Q, R, S і T.

У кращому втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів  
35 кожна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі  
Ig $\gamma$ 1 людини, обрана із групи, яка складається з: A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W і  
Y.

В одному втіленні в обох з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в  
положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини,  
представлені не L і L, відповідно.

В одному втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені не L і L, відповідно, а амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені N і P, відповідно.

45 В одному втіленні в обох з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені гідрофобними або полярними амінокислотами.

В одному втіленні в обох з даних першого й другого важких ланцюгів кожна з амінокислот у  
положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із  
50 групи, яка складається з: A, C, F, G, H, I, M, R, T, V, W і Y.

В одному втіленні в обох з даних першого й другого важких ланцюгів кожна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із групи, яка складається з: C, D, E, H, K, N, Q, R, S і T.

У кращому втіленні в обох з даних першого й другого важких ланцюгів кожна з амінокислот у  
55 положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, обрана із  
групи, яка складається з: A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, Q, R, S, T, V, W і Y.

В іншому втіленні щонайменше в одному з даних першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234 і L235 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені аліфатичними незарядженими, ароматичними або кислими амінокислотами.









амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі Igg1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В іншому втіленні антитіло за винаходом містить послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:6, послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10, і щонайменше в одному з важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі Igg1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В іншому втіленні антитіло за винаходом містить послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:6, послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:12, і щонайменше в одному з важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі Igg1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В іншому втіленні антитіло за винаходом містить послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:9, послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10, і щонайменше в одному з важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі Igg1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В іншому втіленні антитіло за винаходом містить послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:9, послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:12, і щонайменше в одному з важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі Igg1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В одному аспекті даний винахід стосується мультиспецифічних антитіл, що містять щонайменше першу єднальну область антитіла за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень і одну або кілька єднальних областей, які зв'язують одну або декілька інших мішеней, ніж перша єднальна область. Такі мультиспецифічні антитіла можуть бути біспецифічними антитілами.

Так, в одному аспекті даний винахід стосується біспецифічних антитіл, що містять першу єднальну область антитіла за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень і другу єднальну область, яка зв'язується з іншою мішенню, ніж перша єднальна область.

Термін "мультиспецифічне антитіло" відноситься до антитіл, що володіють специфічністю щонайменше до двох різних, як от щонайменше до трьох епітопів, які, як правило, не перекриваються. Такі епітопи можуть перебувати на одній і тій же або на різних мішенях. Якщо епітопи перебувають на різних мішенях, то такі мішені можуть перебувати на одній і тій же клітині або на різних клітинах або типах клітин.

Термін "біспецифічне антитіло" відноситься до антитіл, що володіють специфічністю щонайменше до двох різних епітопів, що як правило, не перекриваються. Такі епітопи можуть перебувати на одній і тій же або на різних мішенях. Якщо епітопи перебувають на різних мішенях, то такі мішені можуть перебувати на одній і тій же клітині або на різних клітинах або типах клітин.

В одному втіленні біспецифічне антитіло містить перший і другий важкі ланцюги.

Втілення, пов'язані з модифікацією Fc-області, і втілення, пов'язані з певними амінокислотними замінами, розглядаються в складі будь-яких біспецифічних антитіл за винаходом. Так, в одному втіленні, щонайменше один із цих першого й другого важких ланцюгів містить одну або кілька амінокислот, модифікованих так, як визначено в будь-якому з описаних тут втілень, як ті, що описані у зв'язку з одержанням інертної Fc-області. В одному втіленні обидва з даних першого й другого важких ланцюгів містять одну або кілька амінокислот, модифікованих так, як визначено в кожному з описаних тут втілень, як ті, що описані у зв'язку з одержанням інертної Fc-області. Відповідно, біспецифічне антитіло містить Fc-область, модифіковану відповідно до кожного з описаних тут аспектів або втілень; або ж принаймні один з даних першого й другого важких ланцюгів містить одну або кілька амінокислот, модифікованих так, як визначено в будь-якому з описаних тут аспектів або втілень.

Так, в одному втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10, причому Fc-область була модифікована так, щоб зв'язування C1q з даним антитілом зменшувалося в порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 100 % при визначенні зв'язування з C1q методом ELISA.

В одному втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:12, причому Fc-область була модифікована так, щоб зв'язування C1q з даним антитілом зменшувалося в порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, на 97 % або на 100 % при визначенні зв'язування з C1q методом ELISA.

В одному втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:6, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10,





представлені F, E і A, відповідно.

В іншому втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:9, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:12, причому щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

Приклади молекул біспецифічних антитіл, які можна використовувати в даному винаході, включають: (i) цільні антитіла, які мають два плеча, які містять різні антигензв'язуючі області, (ii) однокланцеві антитіла, які мають специфічність до двох різних епітопів, наприклад, у вигляді двох scFvs, з'єднаних між собою через додатковий пептидний лінкер; (iii) антитіла з подвійними варіабельними доменами (DVD-Ig<sup>TM</sup>), у яких кожний легкий ланцюг і важкий ланцюг містить по два варіабельні домени, з'єднаних між собою через короткий пептидний лінкер ([40]); (iv) хімічно зв'язані біспецифічні (Fab')<sub>2</sub>-фрагменти; (v) TandAb<sup>®</sup>, що представляють собою злиття двох однокланцевих діатіл, при цьому утворюється тетравалентне біспецифічне антитіло, що має по два сайти зв'язування для кожного із цільових антигенів; (vi) флекситіла, що представляють собою комбінацію scFvs з діатілом, у результаті чого виходить мультівалентна молекула; (vii) так звані молекули "док-і-лок" (Dock-and-Lock<sup>®</sup>) на основі "домена димеризації й стикування" у протеїнази A, який у застосуванні до Fabs може утворювати тривалентний біспецифічний єднальний білок, який складається із двох однакових Fab-фрагментів, з'єднаних з іншим Fab-фрагментом; (viii) так звані молекули-скорпіони, які містять, наприклад, два scFvs, злитих з обома кінцями Fab-плеча людини; і (ix) діатіла.

В одному втіленні біспецифічними антитілами за даним винаходом є діатіла, зшиті антитіла або ж біспецифічні антитіла, отримані шляхом контрольованого обміну Fab-плеча, наприклад, DuoBody<sup>®</sup> (як типи описані в [41]), як описано в даному винаході.

Приклади різних класів біспецифічних антитіл включають, без обмеження: (i) IgG-подібні молекули з комплементарними доменами C<sub>H</sub>3, що викликає гетеродимеризацію; (ii) рекомбінантні IgG-подібні молекули подвійного таргетинга, у яких кожна із двох сторін молекули містить Fab-фрагмент або частину Fab-фрагмента щонайменше із двох різних антитіл; (iii) злиті молекули IgG, у яких повнорозмірні антитіла типу IgG злиті з додатковим Fab-фрагментом або частиною Fab-фрагмента; (iv) злиті з Fc молекули, у яких однокланцеві молекули Fv або стабілізовані діатіла злиті з константними доменами важкого ланцюга, Fc-областями або їх частинами; (v) злиті молекули Fab, у яких злиті разом різні Fab-фрагменти, злиті з константними доменами важкого ланцюга, Fc-областями або їх частинами; і (vi) антитіла на основі scFv або діатіл або важких ланцюгів (наприклад, доменних антитіл, Nanobodies<sup>®</sup>), у яких різні однокланцеві молекули Fv або різні діатіла або різні антитіла на основі важких ланцюгів (наприклад, доменні антитіла, Nanobodies<sup>®</sup>) злиті один з одним або з іншим білком або молекулою носія, злитію з константними доменами важкого ланцюга, Fc-областями або їх частинами.

Приклади IgG-подібних молекул з комплементарними доменами C<sub>H</sub>3 включають, без обмеження: Triomab<sup>®</sup> (Trion Pharma/Fresenius Biotech, [42]), Knobs-into-Holes (Genentech, [43]), Crossmabs (Roche, [44]) і електростатично спарені (Amgen, [45]-[46]; Chugai, [47]; Oncomed, [48]), молекули LUZ-Y (Genentech), Dig-body і Pig-body (Pharmabcine), доменні антитіла із заміною ниток (Strand Exchange Engineered Domain body, Seedbody) (EMD Serono, [49]), молекули Biclonics (Merus), FcΔadp (Regeneron, [50]), біспецифічні IgG1 і IgG2 (Pfizer/Rinat, [51]), Azymetric scaffold (Zymeworks/Merck, [52]), mAb-Fv (Xencor, [53]), бівалентні біспецифічні антитіла (Roche) і молекули DuoBody<sup>®</sup> (Genmab A/S, [41]).

Приклади рекомбінантних IgG-подібних молекул подвійного таргетинга включають, без обмеження: Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis), антитіла два-в-одному (Two-in-one Antibody, Genentech), зшиті mAbs (Karmanos Cancer Center), mAb2 (F-Star, [54]), Zybodies<sup>TM</sup> (Zyngenia), підходи із загальним легким ланцюгом (Crucell/Merus, [55]), κLBodies (NovImmune) і CovX-body<sup>®</sup> (CovX/Pfizer).

Приклади злитих молекул IgG включають, без обмеження: подвійні варіабельні домени (DVD)-Ig<sup>TM</sup> (Abbott, [56]), антитіла типу два домени, дві голівки (Unilever; Sanofi Aventis, [57]), IgG-подібні біспецифічні (Imclone/Eli Lilly), Ts2Ab (MedImmune/AZ) і BsAb (Zymogenetics), Hercules<sup>TM</sup> (Biogen Idec, [58]), злиті scFv (Novartis), злиті scFv (Changzhou Adam Biotech Inc, [59]) і TvAb (Roche, [59], [60]).

Приклади злитих з Fc молекул включають, без обмеження: злиття типу scFv/Fc (Academic Institution), Scorpion<sup>TM</sup> (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS), технологію ретаргетинга з подвійною спорідненістю (Dual Affinity Retargeting Technology, Fc-DART<sup>TM</sup>) (MacroGenics, [62], [63]) і Dual(scFv)<sub>2</sub>-fab (National Research Center for Antibody Medicine –

Китай).

Приклади злитих з Fab біспецифічних антитіл включають, без обмеження: F(ab)<sub>2</sub> (Medarex/AMGEN), подвійної дії або Bis-Fab (Genentech), Dock-and-Lock® (DNL) (ImmunoMedics), бівалентні біспецифічні (Biotecno) і Fab-Fv (UCB-Celltech).

Приклади антитіл на основі scFv, діатіл і доменних антитіл включають, без обмеження: біспецифічні Т-клітинні захвати (Bispecific T Cell Engager, Bite®) (Micromet), тандемні діатіла (Tandab) (Affimed), технологію ретаргетинга з подвійною спорідненістю (Dual Affinity Retargeting Technology, Fc-DART™) (MacroGenics), однокланові діатіла (Academic), TCR-подібні антитіла (AIT, ReceptorLogics), злиті із сироватковим альбуміном людини scFv (Merrimack) і Combody™ (Epigen Biotech), нанотіла подвійного таргетинга (Ablynx), доменні антитіла подвійного таргетинга на основі важких ланцюгів.

Крім того, передбачається, що будь-яке моноспецифічне антитіло, що відповідає описанню тут умовам аналізу, може скласти основу біспецифічного антитіла. Тобто біспецифічне антитіло, у якого одна з областей зв'язування зв'язує CD3, може походити з будь-якого моноспецифічного антитіла до CD3, перевіреного в методах функціонального аналізу, що й відповідає викладеним тут вимогам. Таке біспецифічне антитіло може бути отримане способами, описаними в [41], яка включена сюди шляхом посилання.

Отже, у кращому втіленні кожен з даних першого й другого важких ланцюгів містить принаймні шарнірну область і області C<sub>H</sub>2 і C<sub>H</sub>3, причому в даному першому важкому ланцюзі щонайменше одна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням, обраним із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, була замінена, і в даного другого важкого ланцюга щонайменше одна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням, обраним із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, була замінена, причому даний перший й даний другий важкі ланцюги замінені не в тих самих положеннях. При цьому термін "замінена" означає те, що амінокислота в певному положенні була замінена на іншу амінокислоту, яка зустрічається або не зустрічається в природі. Таким чином, "замінена" амінокислота в положенні, яке відповідає цьому положенню у важкому ланцюзі IgG1 людини, означає те, що амінокислота в даному положенні відрізняється від природної амінокислоти у важкому ланцюзі IgG1.

В одному втіленні в даному першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не K, L або M, і необов'язково амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена F, а в даному другому важкому ланцюзі щонайменше одна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням, обраним із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405 і Y407 у важкому ланцюзі IgG1 людини, була замінена.

В одному втіленні в даному першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не K, L або M, а в даного другого важкого ланцюга амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не F, і необов'язково амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена K.

В одному втіленні в даному першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не F, R або G, а в даному другому важкому ланцюзі амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням, обраним із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, Y407 і K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, були замінені.

В одному втіленні в даному першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не K, L або M, а амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена не F.

В іншому втіленні в даному першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в даному другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, або ж навпаки.

Так, в одному втіленні в першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L.

У наступному втіленні гуманізоване або химерне антитіло до CD3 за винаходом щонайменше в одному із першого й другого важких ланцюгів містить одну або декілька інактивуючих замінів, викладених у будь-якому з наведених вище втілень, типу L234F, L235E і D265A; а амінокислота в положенні, що відповідає F405, представлена не F. В одному втіленні

гуманізоване або химерне антитіло до CD3 за винаходом щонайменше в одному із першого й другого важких ланцюгів містить одну або декілька інактивуючих заміни, викладених у будь-якому з наведених вище втілень, типу L234F, L235E і D265A; а також заміну в положенні K409 типу K409R. Зокрема, в одному втіленні гуманізоване або химерне антитіло до CD3 за винаходом в обох з першого й другого важких ланцюгів містить одну або декілька інактивуючих заміни, викладених у будь-якому з наведених вище втілень, типу L234F, L235E і D265A; а також заміну в положенні F405 типу F405L. В одному втіленні гуманізоване або химерне антитіло до CD3 за винаходом в обох з першого й другого важких ланцюгів містить одну або декілька інактивуючих заміни, викладених у будь-якому з наведених вище втілень, типу L234F, L235E і D265A; а також заміну в положенні K409 типу K409R. Такі антитіла застосовні для одержання біспецифічних антитіл.

Відповідно, в іншому втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В одному втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E, A, N і P, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В альтернативному втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L.

В одному втіленні щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E, A, N і P, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L.

В іншому втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В одному втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E, A, N і P, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В альтернативному втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L.

В одному втіленні в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають L234, L235, D265, N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E, A, N і P, відповідно, у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L.

Як описано тут, залучення Т-клітин на конкретні клітини мішені, як ракові або пухлинні клітини, забезпечує спосіб знищення клітин мішені. Автори даного винаходу показали, що біспецифічне антитіло CD3хHER2, що містить конкретні амінокислотні заміни L234F, L235E і



D265A в обох важких ланцюгах, здатне індукувати знищення клітин AU565, як описано в прикладі 5. Опосередковане Т-клітинами знищення може здійснюватися біспецифічним антитілом, націленим на CD3 першою єднальною областю й на іншу мішень – другою єднальною областю. Так, в одному втіленні перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут втілень для гуманізованого або химерного антитіла до CD3, а друга єднальна область зв'язується з іншою мішенню, ніж перша єднальна область. Слід мати на увазі, що, коли антитілом є біспецифічне антитіло, то щонайменше одна половина антитіла, тобто один з пари важких і легких ланцюгів антитіла, є гуманізованим або химерним антитілом, як описано тут. Таким чином, одна половина біспецифічного антитіла є гуманізованим або химерним антитілом, що зв'язується з CD3 відповідно до даного винаходу, а друга половина може бути гуманізованою, химерною, повністю не людською або повністю людською, що зв'язується із другою мішенню. Так, в одному втіленні антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, перший і другий легкий ланцюг, причому даний перший важкий і даний перший легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи першу єднальну область; а дані другі важкий і легкий ланцюги є повністю людськими й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи другу єднальну область, причому дана перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут аспектів або втілень, а дана друга єднальна область зв'язується з іншою мішенню. В одному втіленні антитіло містить перший і другий важкий ланцюг, перший і другий легкий ланцюг, причому даний перший важкий і даний перший легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи першу єднальну область; а дані другі важкий і легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи другу єднальну область, причому дана перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут аспектів або втілень, а дана друга єднальна область зв'язується з іншим епітопом CD3, ніж перша єднальна область.

Так, в одному втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10; другу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:19, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:20; причому щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно; у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В одному втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10; другу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:29, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:30; причому щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, що відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно; у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В іншому втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10; другу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:19, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:20; причому в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно; у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

В іншому втіленні біспецифічне антитіло містить першу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:10; другу єднальну область, що включає послідовність  $V_H$ , наведену в SEQ ID NO:29, і послідовність  $V_L$ , наведену в SEQ ID NO:30; причому в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно; у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, яке відповідає положенню K409 у важкому







ланцюзі IgG1 людини, представлена R.

Термін "дисульфідний місток" у даному винаході відноситься до ковалентного зв'язку між двома залишками цистеїну, тобто дана взаємодія також може позначатися як взаємодію Cys-Cys.

5 Термін "мішень" у даному винаході відноситься до молекули, з якою зв'язується єднальна область антитіла за винаходом. При використанні в контексті зв'язування антитіла цей термін включає будь-які антигени, на які спрямовано отримане антитіло.

В одному кращому втіленні перший важкий і перший легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи першу єднальну область; а другі важкий і легкий ланцюги є повністю людськими й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи другу єднальну область, причому перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут аспектів або втілень, а друга єднальна область зв'язується з іншою мішенню; при цьому щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В одному кращому втіленні перший важкий і перший легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи першу єднальну область; а другі важкий і легкий ланцюги є повністю людськими й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи другу єднальну область, причому перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут аспектів або втілень, а друга єднальна область зв'язується з іншим епітопом CD3, ніж перша єднальна область; при цьому щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В одному кращому втіленні перший важкий і перший легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи першу єднальну область; а другі важкий і легкий ланцюги є повністю людськими й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи другу єднальну область, причому перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут аспектів або втілень, а друга єднальна область зв'язується з іншою мішенню; при цьому в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

В одному кращому втіленні перший важкий і перший легкий ланцюги є гуманізованими або химерними й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи першу єднальну область; а другі важкий і легкий ланцюги є повністю людськими й з'єднуються через дисульфідні містки, утворюючи другу єднальну область, причому перша єднальна область відповідає будь-якому з описаних тут аспектів або втілень, а друга єднальна область зв'язується з іншим епітопом CD3, ніж перша єднальна область; при цьому в обох із цих першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.

40 Конструкції з нуклеїнових кислот, експресуючі вектори й клітини хазяїна

В одному аспекті даний винахід стосується конструкцій з нуклеїнових кислот, що кодують одну або кілька послідовностей, наведених у табл. 1. Так, даний винахід стосується конструкцій з нуклеїнових кислот, що кодують одну або кілька послідовностей, наведених в SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 і 26.

45 В іншому аспекті винахід стосується конструкцій з нуклеїнових кислот, що кодують послідовності гуманізованих або химерних антитіл до CD3 за даним винаходом, експресуючих векторів, що містять конструкції з нуклеїнових кислот за даним винаходом, клітин хазяїна, що містять такі експресуючі вектори, і способів одержання таких антитіл шляхом культивування таких клітин хазяїна у відповідних умовах, при яких антитіла виробляються й необов'язково виділяються. Гуманізовані антитіла до CD3 також можуть позначатися як "huCD3".

В одному втіленні, винаходом передбачений експресуючий вектор, що містить: (i) послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність важкого ланцюга гуманізованого або химерного антитіла за винаходом, (ii) послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність легкого ланцюга гуманізованого або химерного антитіла за винаходом, або (iii) і те (i), і інше (ii). Таким чином, експресуючий вектор містить одну або кілька конструкцій з нуклеїнової кислоти або послідовностей нуклеїнової кислоти відповідно до будь-якого з описаних тут аспектів або втілень.

В одному втіленні експресуючий вектор за винаходом містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або кілька послідовностей CDR важкого ланцюга й легкого ланцюга, обраних із групи, яка складається з: SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 і 5; і послідовність GTN.

В одному втіленні, винаходом передбачений експресуючий вектор, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує одну або кілька амінокислотних послідовностей, обраних із групи, яка складається з SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 19, 20, 27, 28, 29 і 30, або будь-які їхні комбінації. В іншому втіленні експресуючий вектор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислотну послідовність CDR3 V<sub>H</sub>, наведену в SEQ ID NO: 3. В іншому втіленні експресуючий вектор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислотну послідовність V<sub>H</sub>, обрану з SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 19, 27 і 29. В іншому втіленні експресуючий вектор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислотну послідовність V<sub>L</sub>, обрану з SEQ ID NO: 10, 11, 12, 20, 28 і 30. В іншому втіленні експресуючий вектор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує константну область легкого ланцюга антитіла людини, важкого ланцюга антитіла людини або те й інше. В іншому втіленні, винаходом передбачений експресуючий вектор, що містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує амінокислотну послідовність згідно SEQ ID NO: 15, 16, 23, 24, 25 або 26.

У кращому втіленні експресуючий вектор містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує варіант однієї або декількох з вищенаведених амінокислотних послідовностей, причому даний варіант містить не більше 25 амінокислотних модифікацій, як от не більш 20, не більш 15, 14, 13, 12 або 11 амінокислотних модифікацій, як от 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 або 1 амінокислотних модифікацій типу делецій або вставок, а переважно замін типу консервативних або не консервативних замін, або ж він щонайменше на 80 % ідентичний якій-небудь із даних послідовностей, як от щонайменше на 85 % ідентичний або на 90 % ідентичний або на 95 % ідентичний, як от на 96 % ідентичний або на 97 % ідентичний або на 98 % ідентичний або на 99 % ідентичний кожній з вищенаведених амінокислотних послідовностей. Даний винахід також стосується послідовностей нуклеїнових кислот, що відрізняються від вищенаведених послідовностей нуклеїнових кислот, але внаслідок мінливості генетичного коду, що кодують таку ж амінокислотну послідовність, як у антитіла за даним винаходом. Наприклад, послідовність нуклеїнової кислоти може варіюватися, але буде давати амінокислотні послідовності, ідентичні яким-небудь із описаних тут амінокислотних послідовностей. Фахівцям у даній області добре відомо, як визначити такі додаткові послідовності нуклеїнових кислот на підставі генетичного коду.

В іншому втіленні експресуючий вектор додатково містить послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує константну область легкого ланцюга, важкого ланцюга або ж і легкого, і важкого ланцюга антитіла, наприклад, людського антитіла.

Такі експресуючі вектори, як описано вище, можуть застосовуватися для рекомбінантного одержання антитіл за винаходом.

Експресуючим вектором у контексті даного винаходу може бути будь-який придатний вектор, включаючи хромосомні, нехромосомні й вектори із синтетичної нуклеїнової кислоти (послідовності нуклеїнової кислоти, що містить придатний набір контролюючих експресію елементів). Приклади таких векторів включають похідні SV40, бактеріальні плазмідні, фагові ДНК, бакуловіруси, дріжджові плазмідні, вектори, отримані з комбінацій плазмід і фагових ДНК, і вектори з вірусної нуклеїнової кислоти (РНК або ДНК). В одному втіленні нуклеїнова кислота, яка кодує гуманізоване або химерне антитіло до CD3, уміщена у вектор з голої ДНК або РНК, включаючи, приміром, лінійні експресуючі елементи (описані, приміром, в [64]), вектори із щільно упакованої нуклеїнової кислоти (описані, приміром, в [65] і/або [66]), плазмідні вектори типу pBR322, pUC19/18 або pUC118/119, вектори-крихітки ("midge") з нуклеїнової кислоти мінімального розміру (описані, приміром, в [67]), або у вигляді осадженої векторної конструкції з нуклеїнової кислоти типу СаРО<sub>4</sub>-осаджених конструкцій (описаних, приміром, в [68], [69], [70] і [71]). Такі вектори з нуклеїнової кислоти і їх застосування гарно відомі в даній області (приміром, див. [72] і [73]).

В одному втіленні вектор підходить для експресії гуманізованого або химерного антитіла до CD3 у бактеріальних клітинах. Приклади таких векторів включають такі експресуючі вектори, як BlueScript (Stratagene), вектори pIN ([74]), вектори pET (Novagen, Madison WI) і ін.

Експресуючим вектором також або альтернативно може бути вектор, що підходить для експресії в дріжджовій системі. Можна використовувати будь-який вектор, придатний для експресії в дріжджовій системі. Придатні вектори включають, приміром, вектори, що містять конститутивні або індукційні промотори типу альфа-фактора, алкоголь-оксидази й PGH (див. огляди [75] і [76]).

Конструкція й/або вектор з нуклеїнової кислоти також може містити послідовність нуклеїнової кислоти, яка кодує послідовність секреції/локалізації, яка може направляти поліпептид типу зростаючого поліпептидного ланцюга в периплазматичний простір або в культуральне середовище. Такі послідовності відомі в даній області й включають лідери

секреції або сигнальні пептиди, послідовності, націлені на органели (наприклад, послідовності ядерної локалізації, сигнали утримання в ER, мітохондріальні транзитні послідовності, хлоропластні транзитні послідовності), послідовності мембранної локалізації/якірні (наприклад, послідовності зупинки транслокації, якірні послідовності GPI) і ін., які добре відомі в даній області.

В експресуючому векторі за винаходом нуклеїнові кислоти, що кодують гуманізовані або химерні антитіла до CD3, можуть містити або бути пов'язаними з будь-яким придатним промотором, енхансером і іншими сприятливими для експресії елементами. Приклади таких елементів включають сильні промотори експресії (наприклад, промотор/енхансер CMV IE людини, а також промотори RSV, SV40, SL3-3, MMTV і HIV LTR), ефективні полі(A)-послідовності термінації, початок реплікації для плазмідних продуктів в *E. coli*, гени стійкості до антибіотиків у якості селективного маркера й/або зручні сайти для клонування (наприклад, полілінкери). Конструкції й/або вектори з нуклеїнових кислот також можуть містити індукційні промотори на відміну від конститутивних промоторів типу CMV IE (фахівцям повинно бути відомо, що такі терміни насправді служать для опису ступеня експресії генів за певних умов).

В одному втіленні експресуючий вектор, що кодує гуманізоване або химерне антитіло до CD3, поставляється в й/або доставляється до клітин хазяїна або в організм тварини за допомогою вірусного вектора.

Такі експресуючі вектори можуть застосовуватися для рекомбінантного одержання гуманізованих або химерних антитіл до CD3.

В одному аспекті винаходом передбачені клітини хазяїна, які містять експресуючий вектор за винаходом.

В одному аспекті гуманізовані або химерні антитіла до CD3 за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень одержують за допомогою рекомбінантних еукаріотичних, рекомбінантних прокаріотичних або рекомбінантних мікробних клітин хазяїна, які виробляють антитіла. Відповідно, винаходом передбачені рекомбінантні еукаріотичні, рекомбінантні прокаріотичні або рекомбінантні мікробні клітини хазяїна, які виробляють гуманізоване або химерне антитіло до CD3 або імуноглобулін, як визначено тут. Приклади клітин хазяїна включають дріжджові, бактеріальні й клітини ссавців типу клітин CHO або HEK-294. Наприклад, в одному втіленні клітини хазяїна містять послідовність нуклеїнової кислоти, стабільно вбудовану в клітинний геном, яка включає послідовність, що кодує експресію описаного тут гуманізованого або химерного антитіла до CD3. В іншому втіленні клітини хазяїна містять не вбудовану послідовність нуклеїнової кислоти типу плазміди, косміди, фагеміди або лінійного експресуючого елемента, яка включає послідовність, що кодує експресію описаного тут гуманізованого або химерного антитіла до CD3.

Термін "рекомбінантна клітина хазяїна" (або просто "клітина хазяїна") у даному винаході служить для позначення клітин, у які був уведений експресуючий вектор або конструкція або послідовність нуклеїнової кислоти. Слід мати на увазі, що такі терміни служать не тільки для позначення даних конкретних клітин, але також і потомства таких клітин. Оскільки в наступних поколіннях можуть мати місце деякі модифікації внаслідок мутації або впливу навколишнього середовища, то таке потомство може насправді й не бути ідентичним батьківській клітині, але все таки вони входять у рамки використовуваного тут терміна "клітина-хазяїн". Рекомбінантні клітини хазяїна включають, приміром, еукаріотичні клітини хазяїна типу клітин CHO, клітин HEK-293, клітин PER.C6, клітин NS0 і клітин лімфоцитів, а також прокаріотичні клітини типу *E. coli* і інші еукаріотичні організми типу клітин рослин і грибів.

У наступному аспекті винахід стосується способу одержання гуманізованих або химерних антитіл до CD3 за винаходом, який містить у собі стадії:

- a) культивування клітин хазяїна за винаходом, як описано вище, і
- b) виділення й/або очищення антитіл за винаходом з культурального середовища.

У наступному аспекті послідовність нуклеотидів, що кодує послідовність гуманізованого або химерного антитіла до CD3, додатково кодує другу молекулу типу терапевтичного поліпептиду. Приклади терапевтичних поліпептидів описані тут в іншому місці. В одному втіленні винахід стосується способу одержання злитого з гуманізованим або химерним антитілом до CD3 білка, який містить у собі стадії:

- a) культивування клітин хазяїна, що містять експресуючий вектор, який містить таку послідовність нуклеотидів, і
- b) виділення й/або очищення злитого з гуманізованим або химерним антитілом до CD3 білка з культурального середовища.

Композиції

В одному аспекті винаходом передбачені композиції, що містять антитіло або біспецифічне

антитіло за будь-яким з описаних тут аспектів і втілень.

В одному аспекті винаходом передбачені фармацевтичні композиції, що містять антитіло або біспецифічне антитіло за будь-яким з описаних тут аспектів і втілень і фармацевтично прийнятний носій.

5 Фармацевтичні композиції можуть бути складені з фармацевтично прийнятними носіями або розріджувачами, а також з будь-якими іншими відомими ад'ювантами й наповнювачами відповідно до звичайних методів типу тих, що описані в [77].

10 Фармацевтично прийнятні носії або розріджувачі, а також будь-які інші відомі ад'юванти й наповнювачі повинні бути придатними для гуманізованих або химерних антитіл даного винаходу й обраного способу введення. Придатність для носіїв і інших компонентів фармацевтичних композицій визначається на підставі відсутності істотного негативного впливу на бажані біологічні властивості обраної сполуки або фармацевтичної композиції даного винаходу (наприклад, менш ніж істотний вплив на зв'язування антигену, тобто відносне інгібування на 10 % або менше, відносне інгібування на 5 % або менше і т.д.).

15 Фармацевтичні композиції за даним винаходом також можуть містити в собі розріджувачі, заповнювачі, солі, буфери, детергенти (наприклад, неіонні детергенти типу Tween-20 або Tween-80), стабілізатори (наприклад, цукри або безбілкові амінокислоти), консерванти, тканеві фіксатори, солюбілізатори й/або інші матеріали, придатні для введення у фармацевтичні композиції.

20 Фактичний рівень дози активного інгредієнта у фармацевтичних композиціях даного винаходу може варіюватися для того, щоб одержати таку кількість активного інгредієнта, яка ефективна для досягнення необхідної терапевтичної відповіді для даного пацієнта, композиції й способу введення, без токсичності для пацієнта. Обраний рівень дозування буде залежати від різних фармакокінетичних факторів, у тому числі активності даної конкретної композиції даного винаходу, способу введення, часу введення, швидкості виведення даної конкретної сполуки, тривалості лікування, інших лікарських засобів, сполук і/або матеріалів, використовуваних у комбінації з даною композицією, віку, статі, ваги, захворювання, загального стану здоров'я й попередньої історії хвороби пацієнта, що підлягає лікуванню, і інших подібних факторів, добре відомих в області медицини.

30 Фармацевтичні композиції можна вводити будь-яким придатним способом за будь-якою схемою. Придатні способи введення гуманізованих або химерних антитіл даного винаходу *in vivo* і *in vitro* добре відомі в даній області й можуть бути обрані рядовими фахівцями.

В одному втіленні фармацевтичні композиції даного винаходу вводяться парентерально.

35 Вираження "парентеральне введення" і "уводиться парентерально" у даному винаході означають інші способи введення, ніж ентеральне й місцеве введення, зазвичай шляхом ін'єкції, і включають епідермальне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньосуглобне, внутрішньоартеріальне, інтратекальне, інтраорбітальне, внутрішньосерцеве, внутрішньошкірне, внутрішньоочеревинне, внутрішньосухожилльне, транстрахеальне, підшкірне, підепідермальне, субкапсулярне, субарахноїдальне, інтраспинальне, внутрічерепне, внутрішньогрудне, епідуральне й внутрішньогрудинне введення й уливання.

40 В одному втіленні дані фармацевтичні композиції вводяться шляхом внутрішньовенного або підшкірного введення або уливання.

45 Фармацевтично прийнятні носії включають усілякі придатні розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні й протигрибкові засоби, засоби для ізотонічності, антиоксиданти й сповільнючі усмоктування засоби та ін., які фізіологічно сумісні з гуманізованими або химерними антитілами даного винаходу.

50 Приклади придатних водних і неводних носіїв, які можна використовувати у фармацевтичних композиціях даного винаходу, включають воду, фізрозчин, фізрозчин з фосфатним буфером, етанол, декстрозу, поліюлі (як от гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь та ін.) і їхні придатні суміші, рослинні олії, такі як маслинова олія, кукурудзяна олія, арахісова олія, бавовняна олія й кунжутна олія, колоїдні розчини карбоксиметилцелюлози, трагакантову камедь і органічні складні ефіри для ін'єкцій типу етилолеату й/або різні буфери. Інші носії добре відомі в області фармацевтики.

55 Фармацевтично прийнятні носії включають стерильні водні розчини або дисперсії й стерильні порошки для приготування стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій *ex tempore*. Застосування таких середовищ і засобів для фармацевтично активних субстанцій відоме в даній області. За винятком тих випадків, коли звичайний носій або речовина несумісна з активною сполукою, передбачається їхнє застосування у фармацевтичних композиціях даного винаходу. Передбачається, що вираз "активна сполука" також відноситься до гуманізованих або химерних антитіл за даним винаходом.



Належна плинність може підтримуватися, приміром, за допомогою таких покриваючих матеріалів, як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру часток у випадку дисперсій і за допомогою поверхнево-активних речовин.

Фармацевтичні композиції даного винаходу також можуть містити фармацевтично прийнятні антиоксиданти, наприклад: (1) водорозчинні антиоксиданти, такі як аскорбінова кислота, цистеїн гідрохлорид, бісульфат натрію, метабісульфіт натрію, сульфід натрію й ін.; (2) жиророзчинні антиоксиданти, такі як аскорбілпальмітат, бутильований гідроксианізол (BHA), бутильований гідрокситолуол (BHT), лецитин, пропілгалат, альфа-токоферол і ін.; і (3) хелатуючі метали речовини, такі як лимонна кислота, етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA), сорбіт, винна кислота, фосфорна кислота й ін.

Фармацевтичні композиції даного винаходу також можуть містити засоби підтримки ізотонічності, як от цукри, багатоатомні спирти типу маніту, сорбіту, гліцерину або хлорид натрію в композиціях.

Фармацевтичні композиції даного винаходу також можуть містити одну або кілька допоміжних речовин, що придатні для обраного способу введення, як от консерванти, змочуючі засоби, емульгатори, диспергуючі речовини, консерванти або буфери, які можуть підвищити строки зберігання або ефективність фармацевтичної композиції. Гуманізовані або химерні антитіла даного винаходу можуть бути складені з носіями, які будуть захищати сполуку від швидкого вивільнення, типу складів з контрольованим вивільненням, включаючи імпланти, трансдермальні пластирі й мікрокапсульовані системи доставки. Такі носії можуть включати желатин, гліцерилмоностеарат, гліцерилдістеарат, біорозкладані й біосумісні полімери, такі як етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоєфіри й полімолочна кислота, самі по собі або разом з воском або іншими матеріалами, добре відомими в даній області. Способи одержання таких складів загалом відомі фахівцям у даній області (наприклад, див. [78]).

В одному втіленні гуманізовані або химерні антитіла даного винаходу складаються таким чином, щоб забезпечити належний розподіл *in vivo*. Фармацевтично прийнятні носії для парентерального введення включають стерильні водні розчини або дисперсії й стерильні порошки для приготування стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій *ex tempore*. Застосування таких середовищ і речовин для фармацевтично активних субстанцій відоме в даній області. За винятком тих випадків, коли звичайний носій або речовина несумісна з активною сполукою, передбачається їхнє застосування у фармацевтичних композиціях даного винаходу. У композиції можуть входити й інші активні або лікувальні сполуки.

Фармацевтичні композиції для ін'єкцій, як правило, повинні бути стерильними й стабільними в умовах виробництва й зберігання. Композиції можуть бути складені у вигляді розчину, мікроемульсії, ліпосом або інших упорядкованих структур, що підходять для високої концентрації препарату. Носієм може бути водний або неводний розчинник або дисперсійне середовище, що містить, приміром, воду, етанол, поліоли (як от гліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь і ін.) і їхні придатні суміші, рослинні олії типу маслинової олії й органічні складні ефіри для ін'єкцій типу етилолеата. Належна плинність може підтримуватися, приміром, за допомогою таких покриваючих матеріалів, як лецитин, шляхом підтримки необхідного розміру часток у випадку дисперсій і за допомогою поверхнево-активних речовин. У багатьох випадках переважно слід включати в композиції засоби підтримки ізотонічності, приміром, цукри, багатоатомні спирти типу гліцерину, маніту, сорбіту або хлорид натрію. Пролонговане усмоктування композицій для ін'єкцій може здійснюватися шляхом включення в композицію засобу, що сповільнює усмоктування, приміром, солей моностеарата й желатину. Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути приготовлені введенням активної сполуки в необхідній кількості у відповідному розчиннику з одним або комбінацією інгредієнтів, наприклад, із числа перерахованих вище, як буде потрібно, з наступною стерилізацією мікрофільтруванням. Загалом, дисперсії одержують введенням активної сполуки в стерильний носій, що містить основу дисперсійного середовища й інші необхідні інгредієнти, наприклад, із числа перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для приготування стерильних розчинів для ін'єкцій приклади способів одержання – вакуумне сушіння й заморожування-висушування (ліофілізація), які дають порошок активного інгредієнта плюс будь-яких додаткових потрібних інгредієнтів з попередньо стерилізованого фільтруванням розчину.

Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути приготовлені шляхом введення активної сполуки в необхідній кількості у відповідному розчиннику з одним або комбінацією перерахованих вище інгредієнтів, як буде потрібно, з наступною стерилізацією мікрофільтруванням. Загалом, дисперсії одержують введенням активної сполуки в стерильний носій, що містить основу дисперсійного середовища й інші необхідні інгредієнти із числа перерахованих вище. У випадку

стерильних порошків для приготування стерильних розчинів для ін'єкцій прикладами способів одержання служать вакуумне сушіння й заморожування-висушування (ліофілізація), які дають порошок активного інгредієнта плюс будь-яких додаткових потрібних інгредієнтів з попередньо стерилізованого фільтруванням розчину.

5 Терапевтичне застосування

В іншому аспекті даний винахід стосується гуманізованих або химерних антитіл або фармацевтичних композицій винаходу за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень для застосування як лікарських засобів.

10 В іншому аспекті даний винахід стосується гуманізованих або химерних антитіл або фармацевтичних композицій винаходу за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень для застосування у лікуванні захворювань.

Гуманізовані або химерні антитіла або фармацевтичні композиції за винаходом можуть застосовуватися у лікуванні будь-яких ракових захворювань, при яких бажані ефекторні механізми цитотоксичних Т-клітин. Наприклад, гуманізовані або химерні антитіла можна вводити в культури клітин, наприклад, *in vitro* або *ex vivo*, або ж людям, наприклад, *in vivo*, для лікування або профілактики таких захворювань, як ракові, запальні або аутоімунні захворювання. У даному винаході термін "суб'єкт", як правило, означає людину, яка реагує на гуманізоване або химерне антитіло або фармацевтичну композицію. Суб'єктами, приміром, можуть бути хворі люди з такими захворюваннями, які можуть бути виправлені або полегшені шляхом модуляції функції мішені або шляхом знищення клітин, прямо або побічно.

20 В іншому аспекті даним винаходом передбачені способи лікування або профілактики захворювань типу раку, при яких рекрутування Т-клітин буде сприяти лікуванню або профілактиці, які включають введення суб'єктові, який цього потребує, терапевтично ефективної кількості гуманізованого або химерного антитіла або фармацевтичної композиції даного винаходу. Спосіб зазвичай включає введення суб'єктові гуманізованого або химерного антитіла у кількості, ефективній для лікування або профілактики захворювання.

25 В одному кращому аспекті даний винахід стосується способу лікування раку, що включає введення суб'єктові, який цього потребує, гуманізованого або химерного антитіла або фармацевтичної композиції за винаходом, як це визначено в будь-якому з описаних тут аспектів і втілень.

В іншому аспекті даний винахід стосується застосування або способу за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень, у якому гуманізоване або химерне антитіло є біспецифічним антитілом, що специфічно зв'язуються й з CD3, і зі специфічною для раку мішенню, або ж з мішенню, яка надлишково експресується при раку або асоційована з раком, як от HER2, CD19, EpCAM, EGFR, CD66e (або CEA, CEACAM5), CD33, EphA2 або MCSP (або HMW-MAA), причому захворювання представлене таким раком, як рак молочної залози, рак простати залози, недрібноклітинний рак легенів, рак сечового міхура, рак яєчників, рак шлунка, колоректальний рак, рак стравоходу й плоскоклітинна карцинома голови й шиї, рак шийки матки, рак підшлункової залози, рак яєчок, злоякісна меланома, рак м'яких тканин (наприклад, сировіральна саркома), в'ялотекуча або агресивна форма В-клітинної лімфоми, хронічна лімфоцитарна лейкемія або гострий лімфолейкоз.

Ефективні дози й схеми дозування для гуманізованих або химерних антитіл залежать від захворювання або стану, які підлягають лікуванню й можуть бути визначені фахівцями в даній області.

45 Рядовий лікар може легко визначити й призначити ефективну кількість потрібної фармацевтичної композиції.

Наприклад, лікар може почати з доз гуманізованого або химерного антитіла, використовуюваного у фармацевтичній композиції, на меншому рівні, ніж це потрібно для досягнення необхідного терапевтичного ефекту, і поступово збільшувати дозу до досягнення необхідного ефекту. Загалом придатною дозою композиції даного винаходу буде така кількість гуманізованого або химерного антитіла, яка складе найменшу дозу для ефективного одержання терапевтичного ефекту за певною схемою дозування. Така ефективна доза зазвичай залежить від факторів, описаних вище.

55 Так, "ефективна кількість" для терапевтичного застосування може вимірюватися за її здатністю стабілізувати розвиток хвороби. Здатність сполуки інгібувати рак, приміром, можна оцінювати на тваринах з модельної системи, здатної прогнозувати ефективність на пухлинах людини. З іншого боку, цю властивість композиції можна оцінювати за здатністю гуманізованого або химерного антитіла інгібувати ріст клітин або індукувати цитотоксичність методами аналізу *in vitro*, відомими лікарям-фахівцям. Терапевтично ефективна кількість терапевтичної сполуки, тобто терапевтичного гуманізованого або химерного антитіла або фармацевтичної композиції

за винаходом може зменшувати розміри пухлин або іншим способом полегшувати симптоми у суб'єкта. Рядові фахівці зможуть визначити такі кількості, виходячи з таких факторів, як розмір суб'єкта, тяжкість симптомів у суб'єкта й конкретна композиція або обраний спосіб введення.

Типовий необмежувальний діапазон терапевтично ефективних кількостей гуманізованих або химерних антитіл за винаходом становить 0,001-30 мг/кг, як от 0,001-20 мг/кг, як от 0,001-10 мг/кг, як от 0,001-5 мг/кг, приміром, 0,001-2 мг/кг, як от 0,001-1 мг/кг, наприклад, близько 0,001, приблизно 0,01, приблизно 0,1, приблизно 1, приблизно 5, приблизно 8, приблизно 10, приблизно 12, приблизно 15, приблизно 18 мг/кг.

Уведення може проводитися, наприклад, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, внутрібрюшинно або підшкірно, наприклад, проксимально до сайту мішені.

Схеми дозування у вищенаведених способах лікування й застосування підбираються так, щоб забезпечити оптимальну бажану відповідь (наприклад, терапевтичну відповідь). Наприклад, можна вводити одним болюсом, можна вводити кілька дробових доз за часом або ж можна пропорційно зменшувати або збільшувати дозу, як того вимагатиме терапевтична ситуація.

В одному втіленні ефективність лікування відслідковується в процесі терапії, наприклад, у заданих точках за часом.

Якщо потрібно, ефективна добова доза фармацевтичної композиції може вводитися у вигляді двох, трьох, чотирьох, п'яти, шести або більше менших доз, що вводяться окремо через відповідні проміжки протягом доби, необов'язково у вигляді стандартних дозових форм. В іншому втіленні гуманізоване або химерне антитіло або фармацевтична композиція вводиться шляхом повільного безперервного уливання протягом тривалого часу типу більше 24 годин, щоб звести до мінімуму будь-які небажані побічні ефекти.

Хоча гуманізовані або химерні антитіла даного винаходу можна вводити й самі по собі, але переважно гуманізовані або химерні антитіла вводяться у вигляді фармацевтичної композиції, як описано вище.

Ефективна доза гуманізованого або химерного антитіла за винаходом також може вводитися за щотижневою, двотижневою або тритижневою схемою дозування. Період дозування може бути обмежений, наприклад, до 8 тижнів, 12 тижнів або до припинення клінічного прогресування. З іншого боку, ефективна доза гуманізованого або химерного антитіла за винаходом може вводитися через кожні два, три або чотири тижні.

В одному втіленні гуманізоване або химерне антитіло може вводитися шляхом інфузії за щотижневою схемою в перерахуванні на  $\text{мг/м}^2$ . Такі дозування можуть виходити, приміром, з наведених вище доз у  $\text{мг/кг}$  за наступною формулою: доза ( $\text{мг/кг}$ )  $\times 70:1,8$ . Таке введення можна повторювати, наприклад, від 1 до 8 разів, як от від 3 до 5 разів. Уведення може проводитися шляхом безперервного уливання протягом від 2 до 24 годин, як от від 2 до 12 годин. В одному втіленні гуманізоване або химерне антитіло може вводитися шляхом повільного безперервного уливання протягом тривалого часу, як от більш 24 годин, щоб зменшити токсичні побічні ефекти.

В одному втіленні гуманізоване або химерне антитіло може вводитися за щотижневою схемою в перерахуванні на фіксовану дозу аж до 8 разів, як от від 4 до 6 разів при введенні раз на тиждень. Така схема може повторюватися один або кілька разів, як буде потрібно, наприклад, через 6 місяців або 12 місяців. Такі фіксовані дози, приміром, можуть ґрунтуватися на наведених вище дозах у  $\text{мг/кг}$ , враховуючи масу тіла в 70 кг. Дозування може визначатися або підбиратися шляхом вимірювання кількості гуманізованого або химерного антитіла даного винаходу в крові після введення, приміром, у біологічних зразках з використанням антиідіотипічних антитіл, націлених на область зв'язування в гуманізованих або химерних антитіл даного винаходу.

В одному втіленні гуманізовані або химерні антитіла можуть уводитися при підтримуючій терапії, як от, наприклад, один раз на тиждень протягом 6 місяців або більше.

Гуманізовані або химерні антитіла також можуть уводитися профілактично для того, щоб зменшити ризик виникнення раку, сповільнити настання подій при прогресуванні раку й/або зменшити ризик виникнення рецидиву при ремісії раку.

Парентеральні композиції можуть бути складені у вигляді стандартної дозової форми для простоти введення й однорідності дозування. Стандартна дозова форма в даному винаході означає фізично дискретні одиниці, придатні в якості одиничних доз для суб'єктів, що підлягають лікуванню; кожна одиниця містить заздалегідь визначену кількість активної сполуки, розраховану на одержання необхідного терапевтичного ефекту, у комбінації з потрібним фармацевтичним носієм. Специфікації для стандартних дозових форм за даним винаходом диктуються й безпосередньо залежать від (а) унікальних характеристик активної сполуки та

конкретного терапевтичного ефекту, що досягається, і (b) обмежень, властивих області складання таких активних сполук для лікування пацієнтів.

Гуманізовані або химерні антитіла також можуть вводитися профілактично для того, щоб зменшити ризик виникнення раку, сповільнити настання подій при прогресуванні раку й/або зменшити ризик виникнення рецидиву при ремісії раку. Це може бути особливо корисно для тих пацієнтів, у яких важко локалізувати пухлину, яка повинна в них бути, через інші біологічні фактори.

#### Діагностичне застосування

Гуманізовані або химерні антитіла за винаходом також можуть застосовуватися в діагностичних цілях з використанням композицій, що містять гуманізовані або химерні антитіла, як описано тут. Відповідно, винаходом передбачені способи діагностики й композиції, у яких застосовуються описані тут гуманізовані або химерні антитіла, . Такі способи й композиції можуть застосовуватися в чисто діагностичних цілях типу виявлення або ідентифікації захворювання, а також для моніторингу прогресу при терапевтичному лікуванні, відстеження прогресування захворювання, оцінки стану після лікування, моніторингу на предмет рецидиву захворювання, оцінки ризику виникнення хвороби й ін.

В одному аспекті даний винахід стосується способу діагностики захворювань, що характеризуються залученням або нагромадженням експресуючих CD3 клітин, який включає введення суб'єктові гуманізованого або химерного антитіла за винаходом, композиції за винаходом або фармацевтичної композиції за винаходом, при цьому необов'язково дане гуманізоване або химерне антитіло мітиться детектованим агентом.

В одному аспекті гуманізоване або химерне антитіло даного винаходу застосовується *ex vivo*, як от у діагностиці захворювань, при яких клітини, експресуючі потрібну визначену мішень і з якими зв'язується гуманізоване або химерне антитіло, показові для захворювання або залучені в патогенез, шляхом виявлення рівня мішені або рівня клітин, експресуючих дану мішень, на поверхні цих клітин у зразку, узятому в пацієнта. Це здійснюється, приміром, шляхом контактування тестованого зразка, необов'язково разом з контрольним зразком, з гуманізованим або химерним антитілом за винаходом в умовах, що сприяють зв'язуванню антитіла з мішенню. Потім детектується утворення комплексу (наприклад, методом ELISA). При використанні контрольного зразка разом з тестованим зразком, в обох зразках аналізують рівень гуманізованого або химерного антитіла або комплексу антитіла з мішенню, і статистично значиме підвищення рівня гуманізованого або химерного антитіла або комплексу антитіла з мішенню в тестованому зразку означає, що рівень мішені в тестованому зразку підвищений у порівнянні з контрольним зразком.

Приклади стандартних методів імуноаналізу, у яких можна використовувати гуманізовані або химерні антитіла даного винаходу, включають, без обмеження, методи ELISA, RIA, FACS, метод плазмонного резонансу, хроматографічні методи, імуногістохімію тканин, вестерн-блот і/або імунопреципітацію.

Відповідно, в одному втіленні даний винахід стосується способу діагностики захворювань, що характеризуються залученням або нагромадженням експресуючих CD3 клітин, який включає введення суб'єктові антитіла, біспецифічного антитіла, композиції або фармацевтичної композиції за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень, при цьому необов'язково антитіло позначене детектованим агентом.

В одному втіленні винахід стосується способу виявлення присутності мішені або клітин, експресуючих мішень, у зразку, що включає:

- контактування зразка з гуманізованим або химерним антитілом за винаходом в умовах, що сприяють зв'язуванню гуманізованого або химерного антитіла з мішенню в зразку; і
- аналіз того, чи утворився комплекс.

Як правило, зразок є біологічним зразком.

В одному втіленні зразком є зразок тканини, який відомо або імовірно містить конкретну мішень і/або клітини, експресуючі мішень. Наприклад, виявлення експресії мішені *in situ* може здійснюватися шляхом узяття гістологічного зразка в пацієнта й доставки гуманізованого або химерного антитіла даного винаходу в такий зразок. Гуманізоване або химерне антитіло може бути надане шляхом нанесення або накладення гуманізованого або химерного антитіла на зразок, а потім детектування його придатним способом. Після цього можна визначити не тільки наявність мішені або клітин, експресуючих мішень, але також і розподіл мішені або клітин, експресуючих мішень, у досліджуваній тканині (наприклад, у контексті оцінки поширення ракових клітин). При використанні даного винаходу, рядовим фахівцям повинно бути добре відомо, що для такого детектування *in situ* можна модифікувати будь-які із цілого ряду гістологічних методів (як от процедури фарбування).

У вищенаведених методах гуманізоване або химерне антитіло може бути позначене детектованою речовиною, що дозволяє детектувати зв'язане антитіло. З іншого боку, зв'язане (первинне) специфічне гуманізоване або химерне антитіло можна детектувати за допомогою антитіла, позначеного детектованою речовиною, що зв'язується з первинним специфічним гуманізованим або химерним антитілом. Крім того, у наведені вище методах можна використовувати діагностичні композиції, що містять антитіло або біспецифічне антитіло за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень. Так, в одному аспекті даний винахід стосується діагностичних композицій, що містять антитіло або біспецифічне антитіло за будь-яким з описаних тут аспектів або втілень.

Рівень мішені в зразку також можна визначити методом конкурентного імуноаналізу з використанням стандартів мішені, позначених детектованою речовиною, і неміченого специфічного до мішені гуманізованого або химерного антитіла. У методах цього типу змішують біологічний зразок, позначений стандарти мішені й специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло й визначають кількість міченого стандарту мішені, що зв'язався з неміченим специфічним до мішені гуманізованим або химерним антитілом. Кількість мішені в біологічному зразку обернено пропорційна кількості міченого стандарту мішені, що зв'язався з неміченим специфічним до мішені гуманізованим або химерним антитілом.

Придатні мітки для специфічного до мішені гуманізованого або химерного антитіла, вторинного антитіла й/або стандарту мішені, використовуваних у методах діагностики *in vitro*, включають, без обмеження, різні ферменти, простетичні групи, флуоресцентні речовини, люмінесцентні речовини й радіоактивні речовини. Приклади придатних ферментів – пероксидаза хрину, лужна фосфатаза, бета-галактозидаза й ацетилхолінестераза; приклади придатних комплексів простетичних груп – стрептавідин/біотин і авідин/біотин; приклади придатних флуоресцентних речовин – умбеліферон, флуоресцеїн, флуоресцеїн ізотіоціанат, родамін, дихлортриазиніламін флуоресцеїн, дансилхлорид і фікоеритрин; приклад люмінесцентної речовини – люмінол; а приклади придатних радіоактивних речовин –  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  і  $^3\text{H}$ .

В одному аспекті специфічні до мішені гуманізовані або химерні антитіла за винаходом застосовуються при візуалізації *in vivo* експресуючих мішень тканин типу пухлин. Для методів *in vivo* особливо кращі фрагменти антитіл, такі, приміром, як (Fab')<sub>2</sub>, Fab- і Fab'-фрагменти, через їхню швидку кінетику розподілу.

Візуалізація *in vivo* може проводитися будь-яким придатним методом. Наприклад, для візуалізації нагромадження або розподілу специфічного до мішені антитіла в експресуючих мішенях тканинах типу пухлин за допомогою гамма-сцинтиляційної камери (наприклад, установки Elscint Apex 409 ECT) можна використовувати специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло (наприклад, антитіло або його фрагмент), позначене  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  або іншим гамма-випромінюючим ізотопом, як правило, з використанням низькоенергетичного коліматора високого дозволу або низькоенергетичного універсального коліматора. З іншого боку, для візуалізації розподілу специфічного до мішені гуманізованого або химерного антитіла або фрагмента антитіла в пухлинах методом позитронно-емісійної томографії (PET) можна використовувати мечені  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{18}\text{F}$  або іншим випромінюючим позитрони радіонуклідом. Отримані із застосуванням таких методів зображення можна використовувати для оцінки біорозподілу мішені в пацієнтів, ссавців або в тканинах, приміром, при використанні мішені в якості біомаркера на присутність ракових/пухлинних клітин. Варіанти цього методу можуть включати застосування магнітно-резонансної томографії (MRI) для поліпшення візуалізації в порівнянні з методами з використанням гамма-камери. Стандартні методи й принципи імуносцинтиграфії описані, наприклад, в [79], [80] і [81]. Крім того, такі зображення можуть послужити і як основа для хірургічних методів при видаленні пухлин. Більше того, такі методи візуалізації *in vivo* можуть застосовуватися для ідентифікації й локалізації пухлини в ситуації, коли в пацієнта встановлена наявність пухлини (за наявності інших біомаркерів, метастазів і т.д.), але пухлину неможливо ідентифікувати традиційними аналітичними методами. Усі ці способи входять у рамки даного винаходу.

Візуалізація *in vivo* і інші способи діагностики, передбачені даним винаходом, особливо застосовні при виявленні мікрометастазів у хворих людей (наприклад, у пацієнтів, яким раніше не ставився діагноз раку, або у хворих у період видужання/ремісії від раку).

В одному втіленні даним винаходом передбачений спосіб візуалізації *in vivo*, у якому специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло даного винаходу зазнає кон'югування з детектуючою рентгеноконтрастною речовиною, кон'юговане гуманізоване або химерне антитіло вводиться хазяїнові, у вигляді ін'єкції в кровоток, і проводиться аналіз на наявність і локалізацію міченого гуманізованого або химерного антитіла в хазяїна. За допомогою цього

способу й будь-яких інших представлених тут методів діагностики даний винахід забезпечує спосіб скринінгу на наявність пов'язаних із хворобою клітин у хворої людини або в біологічному зразку, узятому у хворої людини, і/або для оцінки розподілу специфічного до мішені гуманізованого або химерного антитіла перед початком специфічної до мішені ADC-терапії.

5 Для діагностичної візуалізації радіоізотопи можна зв'язувати зі специфічним до мішені гуманізованим або химерним антитілом прямо або побічно за допомогою проміжної функціональної групи. Корисними проміжними функціональними групами є такі хелатори, як етилендіамінтетраоцтова кислота й диетилентриамінпентаоцтова кислота (приміром, див. [82]).

10 Поряд з радіоізотопами й рентгеноконтрастними речовинами, діагностичні методи можуть виконуватися з використанням специфічних до мішені антитіл, які кон'юговані з барвниками (типу комплексу біотин-стрептавідин), контрастними речовинами, флуоресцентними сполуками або молекулами й підсилювачами (наприклад, парамагнітними іонами) для магнітно-резонансної томографії (MRI) (наприклад, див. [83], де описані методи MRI і одержання антитіл, кон'югованих з підсилювачами для MRI). Такі діагностичні/детектуючі речовини можуть бути  
15 обрані із призначених для MRI речовин і флуоресцентних сполук. Для того, щоб навантажити специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло радіоактивними металами або парамагнітними іонами, може знадобитися піддати їх реакції з реагентом, що мають довгий хвіст, до якого приєднано декілька хелатуючих груп для зв'язування іонів. Таким хвостом може бути полімер типу полілізину, полісахарид або інше похідне з функціоналізованим ланцюгом,  
20 що містить бічні групи, з якими можуть зв'язуватися хелатуючі групи, такі, наприклад, як порфірини, поліаміни, краун-ефіри, бітіосемікарбазони, поліоксими й подібні групи, які застосовні для цієї мети. Хелати можна кон'югувати зі специфічними до мішені гуманізованими або химерними антитілами за стандартними хімічними методиками.

25 Так, даним винаходом передбачені діагностичні специфічні до мішені гуманізовані або химерні антитіла, причому ці специфічні до мішені гуманізовані або химерні антитіла кон'юговані з контрастною речовиною (типу підсилювачів контрасту для магнітно-резонансної томографії, комп'ютерної томографії або УЗД) або радіонуклідом, яким може бути, приміром, гамма-, бета-, альфа-випромінюючий, випромінюючий електрони Оже або позитрони ізотоп.

30 В одному аспекті даний винахід стосується діагностичних композицій, які містять антитіло або біспецифічне антитіло за винаходом.

У наступному аспекті даний винахід стосується набору для детектування присутності антигену-мішені або клітин, експресуючих мішень, у зразку, який включає:

- специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло за винаходом; і
- інструкції із застосування набору.

35 Так, в одному аспекті даним винаходом передбачений набір для детектування присутності антигену CD3 або клітин, експресуючих CD3, у зразку, яке включає стадії:

- a) контактування зразка з антитілом або біспецифічним антитілом за винаходом в умовах, що сприяють утворенню комплексу між антитілом або біспецифічним антитілом і CD3; і
- b) аналіз того, чи утворився комплекс.

40 В одному втіленні даним винаходом передбачений набір для діагностики раку, що включає контейнер, який містить специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло й один або кілька реагентів для детектування зв'язування специфічного до мішені гуманізованого або химерного антитіла з мішенню. Реагенти можуть включати, приміром, люмінесцентні мітки, ферментні мітки або інші детектовані мітки. Реагенти також можуть включати вторинні або  
45 третинні антитіла або реагенти для ферментативних реакцій, причому ферментативні реакції дають продукт, який можна візуалізувати. В одному втіленні даним винаходом передбачений діагностичний набір, що містить одне або декілька специфічних до мішені гуманізованих або химерних антитіл даного винаходу в міченому або неміченому виді в придатних контейнерах, реагенти для інкубації при непрямому методі й субстрати або функціоналізуючі реагенти для  
50 детектування в такому методі, залежно від характеру мітки. Також можуть бути включені контрольні реагенти й інструкції із застосування.

Діагностичні набори також можуть призначатися для застосування зі специфічним до мішені гуманізованим або химерним антитілом типу мічених специфічних до мішені антитіл для детектування присутності мішені в зразку тканини або в організмі. У таких діагностичних  
55 наборах, а також у наборах для терапевтичного застосування, описаних тут в іншому місці, специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло зазвичай презентоване в ліофілізованому вигляді в контейнері, або саме по собі, або в комбінації з додатковими антитілами, специфічними до клітин або пептидів мішені. Як правило, також включають (зазвичай в окремому контейнері для змішування) фармацевтично прийнятний носій  
60 (наприклад, інертний розріджувач) і/або його компоненти, такі як трис, фосфатний або

карбонатний буфер, стабілізатори, консерванти, біоциди, інертні білки, наприклад, сироватковий альбумін або такого типу й додаткові реагенти (зазвичай також в окремому контейнері). У деякі набори також входить вторинне антитіло, здатне зв'язуватися зі специфічним до мішені гуманізованим або химерним антитілом, яке зазвичай перебуває в окремому контейнері. Друге антитіло зазвичай кон'юговане з міткою й складене в такий же спосіб, як і специфічне до мішені гуманізоване або химерне антитіло даного винаходу. Використовуючи методи, описані тут вище й в інших місцях, специфічні до мішені гуманізовані або химерні антитіла можна використовувати для визначення підмножин ракових/пухлинних клітин і характеристики таких клітин і пов'язаних з ними тканин пухлин.

#### Антиідіотипічні антитіла

У наступному аспекті винахід стосується антиідіотипічних антитіл, які зв'язуються з гуманізованими або химерними антитілами за винаходом, як описано тут.

Антиідіотипічним (Id) антитілом є таке антитіло, яке розпізнає унікальні детермінанти, у загальному пов'язані з антигензв'язуючим сайтом антитіла. Анти-Id антитіло може бути отримане шляхом імунізації тварини того ж виду й генетичного типу, що й джерело моноклонального антитіла до CD3, тим моноклональним антитілом, проти якого й одержують анти-Id антитіло. Імунізована тварина, як правило, може розпізнавати й реагувати на ідіотипічні детермінанти імунізуючого антитіла, виробляючи антитіла до цих ідіотипічних детермінантів (антитіла проти Id). Такі антитіла описані, приміром, в US 4,699,880. Такі антитіла теж входять у рамки даного винаходу.

Анти-Id антитіла також можуть застосовуватися в якості "імуногена" для того, щоб викликати імунну реакцію в ще однієї тварини, яка буде виробляти так зване антитіло проти анти-Id. Антитіло проти анти-Id за епітопом може бути ідентичне вихідному моноклональному антитілу, яке індукувало анти-Id антитіло. Таким чином, за допомогою антитіл до ідіотипічних детермінантів моноклонального антитіла можна ідентифікувати інші клони, експресуючі антитіла з ідентичною специфічністю. Анти-Id антитіла можна модифікувати (одержуючи при цьому варіанти анти-Id антитіла) і/або функціоналізувати будь-яким придатним методом типу тих, що описані тут у відношенні специфічних до CD3 антитіл даного винаходу. Наприклад, моноклональне анти-Id антитіло можна кон'югувати із носієм типу гемоцианіну молюска блюдечко (KLH) і використовувати для імунізації мишей BALB/c. Сироватка цих мишей, як правило, буде містити антитіла проти анти-Id з характеристиками зв'язування, близькими, якщо не ідентичними вихідному антитілу до CD3.

Послідовності

Таблиця 1

SEQ ID NO:	Клон	Послідовність
SEQ ID NO:1	huCD3 VH CDR1	GFTFNTYA
SEQ ID NO:2	huCD3 VH CDR2	IRSKYNNYAT
SEQ ID NO:3	huCD3 VH CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY
SEQ ID NO:4	huCD3 VL CDR1	TGAVTTSNY
	huCD3 VL CDR2	GTN
SEQ ID NO:5	huCD3 VL CDR3	ALWYSNLWV
SEQ ID NO:6	huCD3 VH1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO:7	huCD3 VH2	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS
SEQ ID NO:8	huCD3 VH3	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLTVSS

SEQ ID NO:9	huCD3 VH4	EVKLVESGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKSILYLQMNSLKTEDTAMYYCV RHGNFGNSYVSWFAYWGQGTMTVTVSS
SEQ ID NO:10	huCD3 VL1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVF GGGTKLTVL
SEQ ID NO:11	huCD3 VL2	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGL GGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFG GGTKLTVL
SEQ ID NO:12	huCD3 VL3	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQTPGQAFRGL IGGTNKRAPGVPARFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCALWYSNLWV FGGTKLTVL
SEQ ID NO:13	зрілий CD3ε (епсилон) людини	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDED DKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCEN CMEMDVMSVATIVIVDICITGLLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGR QRGQNKERPPPVNPDPYPIRKQQRDLYSGLNQRRRI
SEQ ID NO:14	CD3δ (дельта) людини	FKIPIEELEDRVFNCSNTSITWVEGTGTLSDITRLDLGKRILDPRIYRC NGTDIYKDKSTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLLALGVFC FAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
SEQ ID NO:15	константна область важкого ланцюга Igg1m(f)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:16	константна область важкого ланцюга Igg1m(f)-LFLEDA	Astkgpsvflapsskstsggtaalgclvkdyppepvtvswnsgaltsgvhtfpav lqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdktht cppcpapefeggpsvflfppkpk Dtlmisrtpevtcvvavshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyr vsvltvlhqd Wlنگkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsreemtknqvsl tclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdk srwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispgk
SEQ ID NO:17	V <sub>H</sub> huCLB-t3/4	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMFWVRQAPGKGL EWVATISRYRYIYPDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRPLYGSSPDYWGQGTLLTVTVSS
SEQ ID NO:18	VL huCLB-t3/4	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVTYVHWYQQKPGQAPRLL IYDTSKLGASIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCFQSGGY PLTFGSGTKLEMR
SEQ ID NO:19	V <sub>H</sub> HER2 169	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQG LEWMGWLSAYSGNTIYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDRIIVRPDYFDYWGGQGTLLTVTVSS
SEQ ID NO:20	VL HER2 169	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRAIGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQR SNWPRTFGQGTKEIK
SEQ ID NO:21	зрілий CD3ε (епсилон) макаки-крабоїда	QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCQHLGSEAQWQHNGKN KEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSPEDASHHLYLKARV CENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVIYYWSKNRKAKAKPVTRG AGAGGRQRGQNKERPPPVNPDPYPIRKQQDLYSGLNQRRRI
SEQ ID NO:22	зрілий CD3ε (епсилон) макаки-резус	QDGNEEMGSITQTPYHVSISGTTVILTCQHLGSEVQWQHNGK NKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSPEDASHHLYLKA RVCENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLLVIYYWSKNRKAKAKPV TRGAGAGGRQRGQNKERPPPVNPDPYPIRKQQDLYSGLNQRRRI
SEQ ID NO:23	Igg1m(f)-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK



SEQ ID NO:24	Igg1m(f)-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSYRQVVSIVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:25	Igg1m(f)-LFLEDA-F405L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:26	Igg1m(f)-LFLEDA-K409R	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:27	вихідна V <sub>H</sub> миші	EVKLVESGGGLVQPGKSLKLSKAASGFTFTNYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDQSILYLQMNNLKTEDTAMY YCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLTVSA
SEQ ID NO:28	вихідна V <sub>L</sub> миші	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
SEQ ID NO:29	V <sub>H</sub> CD20 – 7D8	EVQLVESGGGLVQPDRLRLSCAASGFTFHDIYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGTIGYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRADETALY YCAKDIQYGNYYYGMD VWGQGTTTVTSS
SEQ ID NO:30	V <sub>L</sub> CD20 – 7D8	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQQRSNPITFGQGTRLEIK

## ПРИКЛАДИ

Приклад 1. Одержання гуманізованих антитіл до CD3 і не активуючих варіантів антитіл

Гуманізація антитіл до CD3

- 5 Гуманізація антитіл до CD3 миші (US 8,236,308, описані тут як Igg1-CD3) проводилася на фірмі Antitope (Cambridge, UK) з використанням поліпшеної версії їх технології гаметної гуманізації (пересадження CDR) (EP 0 629 240). За цією технологією було розроблено 4 різні V<sub>H</sub>-ланцюги (SEQ ID NO: 6, 7, 8 і 9) і 3 різні V<sub>L</sub>-ланцюги (SEQ ID NO: 10, 11 і 12). Комбінуючи ці 4 V<sub>H</sub>-ланцюги з 3 V<sub>L</sub>-ланцюгами, одержали 12 різних антитіл. Гуманізовані варіанти позначаються тут як huCD3. Так, гуманізовані варіанти, що містять V<sub>H</sub> і V<sub>L</sub> за винаходом, позначаються, наприклад, як Igg1-huCD3-H1L1, що означає, що даний конкретний варіант відноситься до ізо типу Igg1, є гуманізованим антитілом до CD3 і містить амінокислотну послідовність V<sub>H</sub>, яка іменується "H1" і відповідає SEQ ID NO: 6, і амінокислотну послідовність V<sub>L</sub>, яка іменується "L1" і відповідає SEQ ID NO: 10. Таким чином, H1 означає варіабельну область важкого ланцюга V<sub>H1</sub>, L1 означає варіабельну область легкого ланцюга V<sub>L1</sub> і т.д.

- 15 Зокрема, були отримані й перевірені в описаних тут прикладах варіанти Igg1-huCD3-H1L1 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність V<sub>H1</sub>, наведену в SEQ ID NO: 6, і послідовність V<sub>L1</sub>, наведену в SEQ ID NO: 10), Igg1-huCD3-H1L2 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність V<sub>H1</sub>, наведену в SEQ ID NO:6, і послідовність V<sub>L2</sub>, наведену в SEQ ID NO:11), Igg1-huCD3-H1L3 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність V<sub>H1</sub>, наведену в SEQ ID NO:6, і послідовність V<sub>L3</sub>, наведену в SEQ ID NO:12), Igg1-huCD3-H3L3 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність V<sub>H3</sub>, наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність V<sub>L3</sub>, наведену в SEQ ID NO:12), Igg1-huCD3-H4L1 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність V<sub>H4</sub>, наведену в SEQ ID NO:9, і послідовність V<sub>L1</sub>, наведену в SEQ ID NO:10), Igg1-huCD3-H3L1 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність V<sub>H3</sub>, наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність V<sub>L1</sub>, наведену в SEQ ID

NO:10), Igg1-huCD3-H3L3 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність  $V_H3$ , наведену в SEQ ID NO:8, і послідовність  $V_L3$ , наведену в SEQ ID NO:12), і Igg1-huCD3-H4L3 (гуманізоване до CD3, що включає послідовність  $V_H4$ , наведену в SEQ ID NO:9, і послідовність  $V_L3$ , наведену в SEQ ID NO:12).

У деяких прикладах у якості контрольного антитіла (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50) й для перевірки різних не активуючих комбінацій, мутацій в Fc-області (див. приклади 8-10) використовували антитіло, яке містить послідовності варіабельних областей важкого і легкого ланцюга huCLB-T3/4 (SEQ ID NO: 17 і 18, відповідно). HuCBL-T3/4 є гуманізованою версією мишачого антитіла CLB-T3/4 до CD3 (Parren et al., Res Immunol. 1991, 142(9):749-63). Обидві послідовності (SEQ ID NO: 17 і 18) клонували у відповідні експресуючі вектори pcDNA3.3 (Invitrogen) і піддавали експресії після котрансфекції в клітини HEK293F. Отримане контрольне антитіло позначене як Igg1-huCLB-T3/4.

У деяких прикладах у якості позитивного контролю використовували антитіло, що включає послідовності варіабельних областей важкого й легкого ланцюга антитіла 7D8 до CD20 (SEQ ID NO: 29, відповідає послідовності  $V_H$ , і SEQ ID NO: 30, відповідає послідовності  $V_L$ ). При використанні в якості позитивного контролю воно іменується "Igg1-CD20".

Ці антитіла IgG1-CD3 (тобто химерне вихідне антитіло до CD3), Igg1-huCD3 і Igg1-huCLB-T3/4 використовували в моноспецифічному і в біспецифічному форматі, причому біспецифічні антитіла одержували, як описано нижче.

#### Антитіло до HER2

У деяких прикладах використовували антитіло проти HER2. Послідовності  $V_H$  і  $V_L$  для цього специфічного до HER2 антитіла (антитіло 169, SEQ ID NO: 19 і 20, відповідно) були описані раніше (WO 2012/143524 [Genmab]; Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50). Антитіло використовували й у моноспецифічному, і в біспецифічному форматі, воно іменується "Igg1-HER2".

#### Антитіло b12

У деяких прикладах у якості негативного контролю використовували антитіло b12, специфічне до gp120 (Barbas CF. J. Mol. Biol. 1993 Apr 5, 230(3):812-23), яке іменується "Igg1-b12".

#### Експресія

Антитіла експресували у вигляді Igg1, до або Igg1, $\lambda$  з описаними нижче неактивуючими мутаціями або без них і з мутацією в домені  $C_H3$ , яка сприяє отриманню описаним нижче способом біспецифічних антитіл: Igg1-HER2-K409R, Igg1-b12-K409R, Igg1-CD3-F405L. Суміші плазмідних ДНК, які кодують важкі й легкі ланцюги антитіл, піддавали короточасній трансфекції в клітини Freestyle HEK293F (Invitrogen, США) за допомогою 293фектина (Invitrogen, США), в основному, як описано виробником.

#### Очищення антитіл

Супернатант культури фільтрували через заглушені фільтри на 0,2 мкм, наносили на стовпчики MabSelect SuRe в 5 мл (GE Health Care) і елюювали 0,1 М цитратом натрію з NaOH, pH 3. Елюат відразу ж нейтралізували 2М трис-HCl, pH 9 і діалізували протягом ночі проти 12,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). У якості альтернативи елюат після очищення наносили на знесолюючу колонку HiPrep і міняли буфер в антитіла на 12,6 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). Після діалізу або заміни буфера зразки стерилізували фільтруванням через глухі фільтри на 0,2 мкм. Визначали чистоту методом SDS-PAGE і вимірювали концентрацію за поглинанням при 280 нм. Очищені антитіла зберігали при 2-8 °C.

#### Одержання біспецифічних антитіл

Біспецифічні антитіла одержували *in vitro* за технологією на платформі DuoBody®, тобто індукованого 2-MEA обміну Fab-плечима, як описано в WO 2011/147986 і Labrijn et al. (Labrijn et al., PNAS 2013, 110: 5145-50; Gramer et al., Mabs 2013, 5: 962-973). Для одержання біспецифічних антитіл цим методом, створювали молекули Igg1, які несуть одиночні мутації у домені  $C_H3$ : в одного вихідного антитіла Igg1 – мутацію F405L (тобто це антитіло Igg1 до CD3), в іншого вихідного антитіла Igg1 – мутацію K409R (тобто це антитіло до HER2 або антитіло b12). Для одержання біспецифічних антитіл ці два вихідні антитіла, кожне в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл, інкубували з 25 або 75 mM 2-меркаптоетиламін-HCl (2-MEA) у загальному обсязі 500 мкл ТО при 31 °C протягом 5 год. Відновлювальну реакцію зупиняли шляхом видалення відновлювача 2-MEA на колонці PD-10 (GE-Healthcare, виріб #17-0851-01), урівноважений 25 мл PBS. Перед знесоленням у зразки додавали 2 мл PBS (B.Braun, виріб # 3623140) для доведення обсягу до 2,5 мл. Проводили елюювання в 3,5 мл PBS. Зразки збирали в центрифужні гнізда Amicon Ultra (межа відсікання 30 кД, Millipore, виріб #UFC803096) і концентрували центрифугуванням 8 хв. при 3000×g. Доводили об'єми до 500 мкл (за

необхідності) за допомогою PBS і зразки стерилізували фільтруванням через фільтр на 0,2 мкм (Millex-GV, виріб #SLGV004SL). Отримані біспецифічні продукти зберігали за температури 2-8 °C.

В альтернативному способі, що дає такі ж біспецифічні антитіла, для одержання біспецифічних антитіл змішували два вихідні антитіла по 100 мкг і інкубували з 75 мМ 2-меркаптоетиламін-HCl (2-MEA) у загальному об'ємі 400 мкл PBS (B.Braun, виріб #3623140) за 31 °C протягом 5 годин. Відновлювальну реакцію зупиняли шляхом видалення відновлювача 2-MEA за допомогою центрифужних гнізд Amicon Ultra на 0,5 мл (межа відсікання 30 кД, Millipore, виріб #UFC803096) і промивали 4 рази по 400 мкл PBS центрифугуванням 10 хв. при 13000×g. Зразки збирали в нові пробірки, перевертаючи фільтри й центрифугуючи 2 хв. при 1000×g. Доводили об'єми до 200 мкл (за необхідності) за допомогою PBS. Для визначення кінцевої концентрації вимірювали поглинання біспецифічних продуктів при 280 нм (A280). Для визначення кількості біспецифічного продукту проводили катіоно-обмінну хроматографію HPLC (HPLC-CEX) (як описано в WO 2013/060867). Зразки зберігали при 2-8 °C.

Отримані біспецифічні антитіла надалі іменуються "остов K409R Igg1" і "остов F405L Igg1". Неактивуючі мутації

Одержували кілька варіантів антитіл із заміною однієї або декількох амінокислот в Fc-області. Інактивація Fc-області запобігає взаємодії антитіл з Fc-рецепторами, які присутні на клітинах крові типу моноцитів, або з C1q при активації класичного шляху комплементу. У варіантів антитіл, що містять різні комбінації амінокислотних заміни в Fc-області, перевіряли зниження активності Fc. Уводили максимум п'ять амінокислотних заміни, які включають мутації N297Q, L234A, L235A, L234F, L235E, D265A і P331S. Заміни в одному або декількох із цих п'яти положень амінокислот уводили в остов K409R і/або F405L Igg1. Були отримані наступні варіанти Fc-області антитіла huCLB-T3/4: N297Q (що означає заміну N297Q, іменується Igg1-huCLB-T3/4-N297Q), LFLE (що означає заміни L234F/L235E, іменується Igg1-huCLB-T3/4-LFLE), LALA (що означає заміни L234A/L235A, іменується Igg1-huCLB-T3/4-LALA), LFLENQ (що означає заміни L234F/L235E/N297Q, іменується Igg1-huCLB-T3/4-LFLENQ), LFLEDA (що означає заміни L234F/L235E/D265A, іменується Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDA), DA (що означає заміну D265A, іменується Igg1-huCLB-T3/4-DA), DAPS (що означає заміни D265A/P331S, іменується Igg1-huCLB-T3/4-DAPS), DANQ (що означає заміни D265A/N297Q, іменується Igg1-huCLB-T3/4-DANQ), LFLEPS (що означає заміни L234F/L235E/P331S, іменується Igg1-huCLB-T3/4-LFLEPS) і LFLEDANQPS (що означає заміни L234F/L235E/D265A/N297Q/P331S, іменується Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS).

Зокрема, для одержання антитіл з неактивуючою Fc-областю варіантам антитіл Igg1-huCD3 в остови K409R і F405L Igg1 вводили комбінацію з трьох заміни амінокислот, яка включає мутації L234F, L235E і D265A і іменується LFLEDA. Отримані неактивуючі варіанти антитіл іменуються з суфіксом "-LFLEDA".

Приклад 2. Зв'язування гуманізованих антитіл до CD3 й їх неактивуючих варіантів з Т-клітинними лініями людини і макаки, які експресують CD3

Аналізували зв'язування очищених варіантів гуманізованих антитіл до CD3 (huCD3) і біспецифічних молекул (bs)Igg1-huCD3×HER2 з мутаціями LFLEDA в Fc-області (див. приклад 1) або без них з Т-клітинами лінії Jurkat людини (клон E6-1, ATCC® TIB-152™, LGC Standards GmbH, Wesel, Німеччина) або з Т-клітинами лінії HSC-F макаки-крабоді (кат. № JCRB1164; Health Science Research Resources Bank, Osaka, Japan) методом FACS. Поряд з неактивуючими мутаціями LFLEDA, варіанти антитіл містили мутації F405L або K409R, як описано в прикладі 1.

Клітини ( $1 \times 10^5$  клітин на лунку) інкубували в полістиролових 96-ямкових круглодонних планшетах (Greiner Bio-one 650101) із серійними розведеннями препаратів антитіл (у діапазоні від 5 до 10000 нг/мл у вигляді 3-кратних розведень) в 100 мкл PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду при 4 °C протягом 30 хв.

Після дворазового відмивання в PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду, клітини інкубували в об'ємі 100 мкл із вторинним антитілом при 4 °C протягом 30 хв. У якості вторинного антитіла у всіх експериментах використовували кон'юговане з R-фікоеритрином (PE) козяче F(ab')<sub>2</sub> проти IgG людини (109-116-098, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), розведене 1/100 в PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду. Потім клітини відмивали двічі в PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиді, ресуспендували в 150 мкл PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду й аналізували на приладі FACS Cantoll (BD Biosciences). Криві зв'язування аналізували методом нелінійної регресії (сигмоїдальна крива доза-відповідь зі змінним нахилом) за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism V5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

З Фіг. 1А видно, що зв'язування із клітинами Jurkat спостерігалось у всіх варіантів Igg1λ-huCD3 з Fc-областю дикого типу: Igg1-huCD3-H1L1 (SEQ ID NO: 6 і 10, відповідно), Igg1-huCD3-

H1L2 (SEQ ID NO: 6 і 11, відповідно), Igg1-huCD3-H1L3 (SEQ ID NO: 6 і 12, відповідно), Igg1-huCD3-H3L3 (SEQ ID NO: 8 і 12, відповідно) й Igg1-huCD3-H4L1 (SEQ ID NO: 9 і 10, відповідно), а єднальна здатність у Igg1-CD3-LFLEDA (вихідне антитіло до CD3, описане у прикладі 1, з неактивуючими мутаціями LFLEDA) і Igg1-huCD3-H3L1-LFLEDA з неактивуючими мутаціями LFLEDA була близька до варіантів huCD3 з Fc-областю дикого типу. В Igg1-huCLB-T3/4, включеного в якості позитивного контролю, зв'язування із клітинами Jurkat було сильніше в порівнянні з варіантами Igg1-huCD3. Ніякого зв'язування не спостерігалось в антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 6А видно, що зв'язування з клітинами Jurkat у Igg1-CD3-LFLEDA (вихідне антитіло до CD3, описане у прикладі 1, з неактивуючими мутаціями LFLEDA), Igg1-huCD3-H3L1-LFLEDA, Igg1-huCD3-H3L3-LFLEDA, Igg1-3huCD3-H1L1-LFLEDA, Igg1-huCD3-H1L3-LFLEDA, Igg1-huCD3-H4L1-LFLEDA і Igg1-huCD3-H4L3-LFLEDA з неактивуючими мутаціями LFLEDA було близьке з єднальною здатністю варіантів huCD3 з Fc-областю дикого типу. В Igg1-huCLB-T3/4, включеного в якості позитивного контролю, зв'язування із клітинами Jurkat було сильніше в порівнянні з варіантами Igg1-huCD3 при низьких концентраціях антитіла, але близьке при більш високих концентраціях антитіла. У цілому, гуманізовані CD3-варіанти зберігали таку ж здатність до зв'язування з CD3, як у антитіл Igg1-CD3. Ніякого зв'язування не спостерігалось в антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 1В видно, що варіанти біспецифічних антитіл bsIgg1-CD3×HER2, bsIgg1-CD3×b12-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA також зв'язуються із клітинами Jurkat. Максимальні значення зв'язування у цих біспецифічних антитіл були вищі, ніж максимальні значення зв'язування в моноспецифічних антитіл. Концентрації EC<sub>50</sub> у біспецифічних антитіл були в 6-10 разів вищі. Знову ж, ніякого зв'язування не спостерігалось в антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 6В видно, що варіанти біспецифічних антитіл з неактивуючою Fc-областю: bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDA також зв'язуються з клітинами Jurkat. Максимальні значення зв'язування у цих біспецифічних антитіл були вищі, ніж максимальні значення зв'язування в моноспецифічних антитіл. Концентрації EC<sub>50</sub> у біспецифічних антитіл були в 4-10 разів вищі. Знову ж, ніякого зв'язування не спостерігалось в антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 2А видно, що зв'язування з Т-клітинами лінії HSC-F макаки-крабоїда у варіантів Igg1-huCD3 з Fc-областю дикого типу: Igg1-huCD3-H1L1, Igg1-huCD3-H1L2, Igg1-huCD3-H1L3, Igg1-huCD3-H3L3 і Igg1-huCD3-H4L1, а також у Igg1-CD3-LFLEDA, Igg1-huCD3-H3L1-LFLEDA було однаковим. Ніякого зв'язування не спостерігалось у контрольного антитіла huCLB-T3/4, яке не дає перехресної реакції з CD3 макаки, і антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 7А видно, що зв'язування з Т-клітинами лінії макаки-крабоїда у варіантів Igg1-CD3-LFLEDA, Igg1-huCD3-H3L1-LFLEDA, Igg1-huCD3-H3L3-LFLEDA, Igg1-huCD3-H1L1-LFLEDA, Igg1-huCD3-H1L3-LFLEDA, Igg1-huCD3-H4L1-LFLEDA і Igg1-huCD3-H4L3-LFLEDA було однаковим. Ніякого зв'язування не спостерігалось у антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 2В видно, що варіанти біспецифічних антитіл bsIgg1-CD3×HER2 і bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA також зв'язуються із клітинами HSC-F. Максимальні значення зв'язування у цих біспецифічних антитіл були вищі, ніж максимальні значення зв'язування у варіантів моноспецифічних антитіл до CD3. Концентрації EC<sub>50</sub> у біспецифічних антитіл були в 10-12 разів вищі, ніж у варіантів моноспецифічних антитіл до CD3. Знову ж, ніякого зв'язування не спостерігалось у антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

З Фіг. 7В видно, що варіанти біспецифічних антитіл з неактивуючою Fc-областю: bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDA також зв'язуються з клітинами HSC-F. Максимальні значення зв'язування цих біспецифічних антитіл були вищі, ніж максимальні значення зв'язування у варіантів моноспецифічних антитіл до CD3. Концентрації EC<sub>50</sub> у біспецифічних антитіл були в 3-6 разів вищі, ніж у моноспецифічних антитіл до huCD3. Знову ж, ніякого зв'язування не спостерігалось в антитіла негативного контролю – Igg1-b12.

Приклад 3. Активація Т-клітин гуманізованими варіантами антитіл до CD3

Експресія CD69 є раннім маркером активації Т-клітин. Антитіла до CD3 можуть опосередковувати зшивання Т-клітин і імунних клітин за допомогою зв'язування CD3, експресованого Т-клітинами, і Fc-рецепторів, експресованих імунними клітинами, через Fc-область антитіла типу Fc-області Igg1. Це могло б привести до активації Т-клітин і індукції CD69. Варіанти антитіл, що містять неактивуючу Fc-область (мутації LFLEDA), не зв'язуються з Fc-

рецепторами. Тому слід очікувати, що неактивуючі антитіла до CD3 не будуть викликати активацію Т-клітин і експресію CD69, так як неактивуюча Fc-область не зв'язується з експресуючими Fc-рецептори імунними клітинами і тому не може зшивати Т-клітини та імунні клітини.

5 Для вивчення ранньої активації Т-клітин визначали експресію CD69 на Т-клітинах методом FACS після інкубації з гуманізованими варіантами антитіл до CD3 (huCD3) з мутаціями LFLEDA в Fc-області й без них. Поряд з неактивуючими мутаціями, варіанти LFLEDA містять мутації F405L або K409R, як описано в прикладі 1.

10 Виділяли клітини PBMC із цільної крові або лейкоцитарної плівки методом поділу в градієнті щільності, використовуючи пробірки Leucosep (#227290; Greiner Bio-one, Alphen a/d Rijn, Нідерланди), промивали в PBS і ресуспендували в культуральному середовищі.

15 Готовили серійні розведення варіантів антитіл до huCD3, негативного контролю (Igg1-b12) і позитивного контролю (IgE-huCD3 і вихідний Igg1-CD3) у культуральному середовищі (від 0,1 до 1000 нг/мл у вигляді 10-кратних розведень) і вносили в лунки 96-ямкового круглодонного планшета, що містять PBMC людини або макаки. Після 24-годинної інкубації клітини осаджували центрифугуванням, а супернатант (який містить цитокіни) збирали й зберігали при -20 °C. Потім клітини промивали PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду й фарбували 30 хвилин при 4 °C мишачим антитілом проти CD28 людини з PE (854.222.010; Sanquin, Amsterdam, Нідерланди; Т-клітинний маркер) і мишачим антитілом проти CD69 людини з APC (340560; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), які дають перехресні реакції з CD28 і CD69 макаки, відповідно. Антитіла, що не зв'язалися, видаляли шляхом двократного промивання в PBS/0,1 % BSA/0,02 азиду. Клітини ресуспендували при 150 мкл на лунку й вимірювали експресію CD69 в CD 28-позитивних клітинах на приладі FACS Canto II (BD Biosciences).

25 З Фіг. 3 видно, що антитіло IgG1-CD3 (описане в прикладі 1) і гуманізовані варіанти Igg1-huCD3 з Fc-областю Igg1 дикого типу індукували близькі рівні експресії CD69 в Т-клітинах людини (Фіг. 3A) і макаки (Фіг. 3B). Неактивуючі (LFLEDA) варіанти IgG1-CD3-LFLEDA і Igg1-huCD3-H3L1 індукували низькі рівні експресії CD69 в Т-клітинах людини. Неактивуючі варіанти Igg1-huCD3 не викликали ніякої експресії в Т-клітинах макаки. Контрольне антитіло Igg1-b12 також не викликало експресії CD69 в Т-клітинах людини або макаки.

30 З Фіг. 8 видно, що неактивуючі (LFLEDA) варіанти Igg1-huCD3-H3L1-LFLEDA, Igg1-huCD3-H3L3-LFLEDA, Igg1-3huCD3-H1L1-LFLEDA, Igg1-huCD3-H1L3-LFLEDA, Igg1-huCD3-H4L1-LFLEDA і Igg1-huCD3-H4L3-LFLEDA індукували низькі рівні експресії CD69 в Т-клітинах людини. На Фіг. 8A і 8B представлена індукція експресії CD69 в Т-клітинах макаки-крабоїда. Невелика активація, яка спостерігалася, неактивуючими варіантами може бути зумовлена зшиванням молекул CD3 при бівалентному зв'язуванні антитіл до CD3. Таке пояснення підтверджується тим, що активація знижується при найвищій концентрації, якщо зв'язування антитіла є моновалентним. Контрольне антитіло Igg1-b12 також не викликає експресії CD69 в Т-клітинах людини або макаки.

40 З Фіг. 8C й 8D видно, що неактивуючі варіанти біспецифічних антитіл bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H4L1 ×HER2-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDA не викликають експресії CD69 в Т-клітинах людини (Фіг. 8C) або макаки-крабоїда (Фіг. 8D). Проте, при більш високих концентраціях антитіл спостерігалася деяка індукція експресії CD69.

45 Приклад 4. Проліферація Т-клітин, викликана гуманізованими варіантами антитіл до CD3

Вивчали вплив гуманізованих варіантів антитіл до CD3 (huCD3) (описаних у прикладі 1) на проліферацію Т-клітин людини й макаки за допомогою набору Cell proliferation ELISA фірми Roche Applied Science (Cell Proliferation ELISA, BrdU kit, #11647229001; Roche Applied Science, Mannheim, Німеччина), яку визначали згідно з інструкціями виготовлювача.

50 Клітини PBMC, виділені із цільної крові або лейкоцитарної плівки, інкубували в 96-ямкових планшетах із серійними розведеннями (від 0,1 до 1000 нг/мл у вигляді 10-кратних розведень) варіантів антитіл Igg1 до huCD3. У якості позитивного контролю включали IgE-CD3 і Igg1-huCLB-T3/4, а в якості негативного контролю – Igg1-b12. Після 3 днів інкубації з антитілами в середовище додавали BrdU (Roche Applied Science, Mannheim, Німеччина) і інкубували планшети протягом 5 годин. Потім клітини осаджували центрифугуванням, а супернатант збирали й зберігали при -20 °C. Планшети сушили й зберігали при 4 °C аж до проведення ELISA.

60 Включення BrdU у ДНК визначали методом ELISA згідно з інструкціями виготовлювача (Roche Applied Science). Клітини фіксували на планшетах, після чого планшети інкубували 90 хвилин за кімнатної температури з антитілами проти BrdU, кон'югованими з пероксидазою.

Планшети відмивали PBST і визначали зв'язування за допомогою буфера ABTS (замість розчину TMB, що входить у набір). Через 30 хв. зупиняли розвиток фарбування додаванням у лунки 2 % щавлевої кислоти. Потім вимірювали OD<sub>405</sub> на зчитувальному обладнанні EL808 для ELISA.

З Фіг. 4 видно, що інкубація PMBCs з вихідним Igg1-CD3 і з гуманізованими варіантами Igg1-huCD3 з Fc-областю Igg1 дикого типу викликала сильну проліферацію Т-клітин людини (Фіг. 4А) і макаки (Фіг. 4В) навіть при дуже низьких концентраціях антитіл. Інкубація з неактивуючими варіантами LFLEDA антитіл Igg1-huCD3 не визивала проліферації Т-клітин людини (Фіг. 4А і 9А) або Т-клітин макаки (Фіг. 4В і 9В). Таким чином, хоча неактивуючі варіанти антитіл Igg1-huCD3 індукували низькі рівні експресії CD69 в Т-клітинах людини (як показано в прикладі 3), ці неактивуючі варіанти Igg1-huCD3 не викликали проліферації Т-клітин людини.

З Фіг. 9С й 9D видно, що неактивуючі варіанти біспецифічних антитіл bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDA не викликали проліферації Т-клітин, виділених з людини (Фіг. 9С) або макаки (Фіг. 9D).

Приклад 5. Опосередкована Т-клітинами цитотоксичність *in vitro*, викликана гуманізованими варіантами антитіл до CD3

Пухлиноспецифічна Т-клітинна цитотоксичність може бути опосередкована біспецифічними антитілами, що зв'язуються одним плечем з CD3, а іншим плечем – з пухлиноспецифічною мішенню типу HER2. Одночасне зв'язування біспецифічного антитіла й з Т-клітинами, і з клітинами пухлини буде призводити до активації Т-клітин і специфічної до пухлинних клітин цитотоксичності. У цьому прикладі вивчали опосередковану Т-клітинами цитотоксичність проти HER2-позитивних пухлинних клітин за допомогою біспецифічних антитіл проти CD3 (гуманізовані варіанти) і HER2.

Для цього клітини AU565 (карцинома молочної залози людини) культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % (об/об) інактивованої нагріванням CCS, 1,5 г/л бікарбонату натрію (Lonza), 1 мМ пірувата натрію, 4,5 г/л глюкози (Sigma), 50 МО/мл пеніциліну й 50 мкг/мл стрептоміцину. Клітинна лінія утримувалася при 37 °С в зволожувальному інкубаторі з 5 % (об/об) CO<sub>2</sub>. Клітини AU565 культивували майже до злиття, після чого клітини обробляли трипсином, ресуспендували в культуральному середовищі й пропускали через клітинний фільтр, щоб одержати суспензію одиночних клітин. У кожну лунку 96-ямкового планшета висівали по 5×10<sup>4</sup> клітин і інкубували їх щонайменше 3 год. при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub> до повного зчеплення із планшетом.

Виділяли PBMC людини або макаки із цільної крові або лейкоцитарної плівки. Виділені PBMC промивали PBS, ресуспендували в культуральному середовищі й додавали в співвідношенні 1:1 до пухлинних клітин AU565 в 96-ямкових планшетах. Вміст Т-клітин серед PBMC вимірювали методом FACS за допомогою мишачого антитіла проти CD3 людини з PerCP (BD, #345766) (для фарбування Т-клітин), яке дає перехресну реакцію з CD3 макаки. Вміст Т-клітин у популяціях PBMC, що використовувалися, зазвичай становило від 50 до 60 %.

Готували серійні розведення (кінцеві концентрації від 0,001 до 10000 нг/мл) варіантів біспецифічних антитіл bsIgg1-CD3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-CD3×b12-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDA у культуральному середовищі й вносили на планшети. У якості контролю включали Igg1-HER2-LFLEDA і Igg1-b12. Поряд з неактивуючими мутаціями LFLEDA-варіанти антитіл містять мутації F405L або K409R для отримання їх у біспецифічному форматі (див. приклад 1). Планшети інкубували протягом 3 днів при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. У якості контролю на 100 % загибель пухлинних клітин використовували інкубацію клітин з 1 мкМ стауроспорина (#S6942-200, Sigma). Планшети двічі промивали PBS і в кожну лунку додавали 150 мкл культурального середовища, що містить 10 % Alamar blue. Планшети інкубували протягом 4 годин при 37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>. Вимірювали поглинання при 590 нм (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Варіанти біспецифічних антитіл типу CD3×HER2-LFLEDA (bsIgg1-huCLB-T3/4×HER2-LFLEDA і bsIgg1-CD3×HER2-LFLEDA) викликали загибель клітин AU565 у низьких концентраціях при використанні ефекторних клітин людини (Фіг. 5А) або ефекторних клітин макаки (Фіг. 5В). Контрольне біспецифічне антитіло до CD3 huCLB-T3/4×HER2-LFLEDA, яке не дає перехресної реакції з CD3 макаки, викликало загибель клітин AU565 тільки при використанні PBMC людини (Фіг. 5А). Таким чином, загибель клітин мішені не спостерігалася при використанні ефекторних клітин макаки при аналізі (Фіг. 5В). Інкубація з моноспецифічними антитілами Igg1-b12 або Igg1-

HER2-LFLEDA або bsIgg1-CD3×b12-LFLEDA не викликала неспецифічної загибелі клітин мішені.

Варіанти біспецифічних антитіл bsIgg1-huCD3-H3L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H3L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L1×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H1L3×HER2-LFLEDA, bsIgg1-huCD3-H4L1×HER2-LFLEDA і bsIgg1-huCD3-H4L3×HER2-LFLEDA викликали загибель клітин AU565 у низьких концентраціях при використанні ефektorних клітин людини (Фіг. 10A) або ефektorних клітин макаки (Фіг. 10B). Інкубація з моноспецифічними антитілами Igg1-b12 або Igg1-HER2-LFLEDA не викликала неспецифічної загибелі клітин мішені (Фіг. 10A і B). Таким чином, гуманізовані варіанти антитіл до CD3, що містять неактивуючу Fc-область, не викликають неспецифічної загибелі клітин мішені, що вказує на те, що варіанти, які містять неактивуючу Fc-область, можна використовувати для отримання адресної активації Т-клітин і тим самим запобігти неадресній активації Т-клітин.

Приклад 6. Активация Т-клітин макаки-резус гуманізованими варіантами антитіл до CD3

Для вивчення ранньої активації Т-клітин визначали експресію CD69 в Т-клітинах макаки-резус після інкубації з гуманізованими варіантами антитіл до CD3 (huCD3) з Fc-областю Igg1 дикого типу. Виділення PBMC макаки-резус і визначення експресії CD69 методом проточної цитометрії проводили, як описано в прикладі 3.

З Фіг. 11 видно, що гуманізовані варіанти антитіл до CD3 Igg1-huCD3-H1L1, Igg1-huCD3-H1L2, Igg1-huCD3-H1L3, Igg1-huCD3-H3L3 і Igg1-huCD3-H4L1 викликали експресію CD69 в Т-клітинах з макаки-резус до такого ж рівня, що й Igg1-CD3 (як описано в прикладі 1). Антитіло негативного контролю Igg1-b12 не викликало експресії CD69 в Т-клітинах макаки. Таким чином, варіанти huCD3 за даним винаходом можна використовувати в експериментах по CD3 макаки-резус. Варіанти huCD3 дають перехресну реакцію з CD3 макаки-резус.

Приклад 7. Активация Т-клітин неактивуючими варіантами huCLB-T3/4

Для вивчення ранньої активації Т-клітин визначали експресію CD69 в Т-клітинах методом FACS після інкубації з варіантами Igg1-huCLB-T3/4 з мутаціями в Fc-області (див. приклад 1).

Виділяли клітини PBMC із цільної крові або лейкоцитарної плівки методом поділу в градієнті щільності, використовуючи пробірки Leucoseper (#227290; Greiner Bio-one, Alphen a/d Rijn, Нідерланди), промивали в PBS і ресуспендували в культуральному середовищі.

Готували серійні розведення варіантів Igg1-huCLB-T3/4, негативного контролю (Igg1-huCLB-T3/4-Fab) і позитивного контролю (IgE-huCLB-T3/4) у культуральному середовищі (від 0,1 до 1000 нг/мл у вигляді 3-кратних розведень) і вносили в лунки 96-ямкового круглодонного планшета, що містять PBMC. Після 24-годинної інкубації клітини осаджували центрифугуванням, а супернатант (що містить цитокіни) збирали й зберігали при -20 °С. Потім клітини промивали PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду й фарбували 30 хвилин при 4 °С мишачим антитілом проти CD28 людини з PE (854.222.010; Sanquin, Amsterdam, Нідерланди; Т-клітинний маркер) і мишачим антитілом проти CD69 людини з APC (340560; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Антитіла, які не зв'язалися, видаляли шляхом двократного промивання в PBS/0,1 % BSA/0,02 % азиду. Клітини ресуспендували при 150 мкл на лунку й вимірювали експресію CD69 в CD28-позитивних клітинах на приладі FACS Canto II (BD Biosciences).

З Фіг. 12A видно, що експресія CD69 була високою в тих клітинах, які інкубували з IgE-huCLB-T3/4, Igg1-huCLB-T3/4, Igg1-huCLB-T3/4-DA і Igg1-huCLB-T3/4-DAPS. Інкубація з Igg1-huCLB-T3/4-N297Q викликала трохи менший рівень експресії CD69 у порівнянні з Igg1-huCLB-T3/4 дикого типу, а інкубація з Igg1-huCLB-T3/4-LFLE і Igg1-huCLB-T3/4-LFLEPS індукувала експресію CD69 меншою мірою. Інкубація PBMC з антитілами IgG 1-CD3-Fab, Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDA, Igg1-huCLB-T3/4-LFLENQ, Igg1-huCLB-T3/4-DANQ і Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS не викликала якої-небудь експресії CD69 в Т-клітинах.

З Фіг. 12B видно, що експресія CD69 була високою в тих клітинах, які інкубували з IgE-huCLB-T3/4 і Igg1-huCLB-T3/4. Інкубація з Igg1-huCLB-T3/4-LALA викликала трохи менший рівень експресії CD69 у порівнянні з Igg1-huCLB-T3/4 дикого типу, а інкубація з Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDA і Igg1-b12 (негативний контроль) не викликала якої-небудь експресії CD69 в Т-клітинах.

Приклад 8. Проліферація Т-клітин неактивуючими варіантами huCLB-T3/4

Вивчали вплив варіантів huCLB-T3/4 (описаних у прикладі 1) на проліферацію Т-клітин за допомогою набору Cell proliferation ELISA фірми Roche Applied Science (Cell Proliferation ELISA, BrdU kit, #11647229001; Roche Applied Science, Mannheim, Німеччина), яку визначали згідно з інструкціями виготовлювача.

Клітини PBMC, виділені із цільної крові або лейкоцитарної плівки, інкубували в 96-ямкових планшетах із серійними розведеннями (від 0,1 до 1000 нг/мл) варіантів Igg1-CD3. У якості позитивного контролю включали IgE-CD3 і Igg1-CD3, а в якості негативного контролю – Igg1-b12 (з мутацією K409R для одержання біспецифічних антитіл). Після 3 днів інкубації з антитілами в середовище додавали BrdU (Roche Applied Science, Mannheim, Німеччина) і інкубували

планшети протягом 5 годин. Потім клітини осаджували центрифугуванням, а супернатант збирали й зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Планшети сушили й зберігали при  $4^{\circ}\text{C}$  аж до проведення ELISA.

Включення BrdU у ДНК визначали методом ELISA згідно з інструкціями виготовлювача (Cell Proliferation ELISA, BrdU kit, #11647229001; Roche Applied Science). Клітини фіксували на планшетах, після чого планшети інкубували 90 хвилин за кімнатної температури з антитілами проти BrdU, кон'югованими з пероксидазою. Планшети відмивали PBST і визначали зв'язування за допомогою буфера ABTS (замість розчину TMB, що входить у набір). Через 30 хв. зупиняли розвиток фарбування додаванням у лунки 2 % щавлевої кислоти. Потім вимірювали  $\text{OD}_{405}$  на зчитувальному обладнанні EL808 для ELISA.

З Фіг. 13A видно, що інкубація PBMC з Igg1-huCLB-T3/4, Igg1-huCLB-T3/4-DA і Igg1-huCLB-T3/4-DAPS викликала сильну проліферацію Т-клітин навіть при дуже низьких концентраціях антитіл. Інкубація з Igg1-huCLB-T3/4-N297Q викликала дозозалежну проліферацію, яка була порівнянна з позитивним контролем IgE-huCLB-T3/4. Інкубація PBMC з антитілами Igg1-huCLB-T3/4-fab, Igg1-b12-N297Q, Igg1-huCLB-T3/4-LFLE, Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDA, Igg1-huCLB-T3/4-LFLENQ, Igg1-huCLB-T3/4-LFLEPS, Igg1-huCLB-T3/4-DANQ і Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDANQPS не викликала проліферації Т-клітин.

З Фіг. 13B видно, що інкубація PBMC з Igg1-huCLB-T3/4 викликала сильну проліферацію Т-клітин навіть при дуже низьких концентраціях антитіла. Інкубація з IgE-huCLB-T3/4 (позитивний контроль) і Igg1-huCLB-T3/4-LALA викликала дозозависиму проліферацію. Інкубація PBMC з Igg1-huCLB-T3/4-LFLEDA не викликала проліферації Т-клітин.

Виходячи з результатів із прикладів 7 і 8, для подальшого аналізу була обрана підгрупа мутантів, які виявилися найменш активуючими.

Приклад 9. Опосередкована Т-клітинами цитотоксичність *in vitro*, викликана неактивуючими варіантами антитіл huCLB-T3/4

Клітини AU565 (карцинома молочної залози людини) культивували в середовищі RPMI 1640 з додаванням 10 % (об/об) інактивованої нагріванням CCS, 1,5 г/л бікарбонату натрію (Lonza), 1 мМ пірувата натрію, 4,5 г/л глюкози (Sigma), 50 МО/мл пеніциліну й 50 мкг/мл стрептоміцину. Клітинна лінія утримувалася при  $37^{\circ}\text{C}$  в зволожувальному інкубаторі з 5 % (об/об)  $\text{CO}_2$ . Клітини AU565 культивували майже до злиття. Потім клітини обробляли трипсином, ресуспендували в культуральному середовищі й пропускали через клітинний фільтр, щоб одержати суспензію одиночних клітин. У кожну лунку 96-ямкового планшета висівали по  $5 \times 10^4$  клітин і інкубували їх щонайменше 3 год. при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  до повного зчеплення із планшетом.

Виділяли мононуклеари периферичної крові (PBMC) із крові від здорових добровольців, використовуючи пробірки Leucoser на 30 мл за методикою виробника (Greiner Bio-one). Виділені PBMC промивали PBS, ресуспендували в культуральному середовищі й додавали в співвідношенні 1:1 до пухлинних клітин AU565 в 96-ямкових планшетах. Вміст Т-клітин серед PBMC вимірювали методом FACS за допомогою мишачого антитіла проти CD3 людини з PerCP (BD, #345766) (для фарбування Т-клітин). Вміст Т-клітин у популяціях PBMC, що використовувалися, зазвичай становило від 50 до 60 %.

Готували серійні розведення (кінцеві концентрації від 0,004 до 1000 нг/мл) антитіл Igg1-b12, Igg1-huCLB-T3/4, Igg1-HER2 і біспецифічних антитіл huCLB-T3/4**×**b12 і huCLB-T3/4**×**HER2, експресованих у вигляді різних Fc-варіантів: дикого типу, N297Q, LFLE, LALA, LFLENQ, LFLEDA, DANQ і LFLEDENQPS, у культуральному середовищі і вносили на планшети. Планшети інкубували протягом 3 днів при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . У якості контролю на 100 % загибель пухлинних клітин використовували інкубацію клітин з 1 мМ стауроспорина (#S6942-200, Sigma). Після інкубації одержували супернатанти й зберігали при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Планшети двічі промивали PBS і в кожну лунку додавали 150 мкл культурального середовища, що містить 10 % Alamar blue. Планшети інкубували протягом 4 годин при  $37^{\circ}\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ . Вимірювали поглинання при 590 нм (Envision, Perkin Elmer, Waltham, MA).

Проводили два експерименти, використовуючи PBMC від різних донорів. У першому експерименті тестували Fc-варіанти N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DANQ і LFLEDANQPS (Фіг. 14A-G). У другому експерименті тестували Fc-варіанти LFLEDA і LALA (Фіг. 15A-C). В обох експериментах у якості контролю включали антитіла з Fc-доменами дикого типу. Інкубація з моноспецифічним антитілом Igg1-huCLB-T3/4 дикого типу або біспецифічними антитілами huCLB-T3/4**×**b12 викликала неспецифічну загибель клітин мішені (Фіг. 14A-G і 15A-C). Варіанти N297Q (Фіг. 14A-G) і LALA (Фіг. 15A-C) моноспецифічного Igg1-huCLB-T3/4 і bsIgg1-huCLB-T3/4**×**b12 все-таки викликали деяку неспецифічну загибель клітин мішені, хоча й меншою мірою, ніж антитіла дикого типу, досліджувані в тому ж експерименті. Жодне з інших досліджуваних антитіл Igg1-huCLB-T3/4 або bsIgg1-huCLB-T3/4**×**b12 з неактивуючими мутаціями не викликало



неспецифічної загибелі клітин мішені (Фіг 14A-G і 15A-C).

Всі біспецифічні антитіла huCLB-T3/4×HER2 викликали дозозалежну загибель клітин AU565 з ефективністю, щонайменше порівнянню з біспецифічним антитілом huCLB-T3/4×HER2 дикого типу без неактивуючих мутацій (Фіг. 14A-G і 15A-C). Максимальна загибель відбувалася при

дуже низьких концентраціях.

Моноспецифічні антитіла b12 або HER2 дикого типу або неактивуючі варіанти не викликали ніякої цитотоксичності (Фіг. 14A-G і 15A-C), як і очікувалося.

Приклад 10. Дослідження зв'язування C1q з неактивуючими варіантами антитіла huCLB-T3/4

Взаємодія C1q з антитілами, пов'язаними із клітинами мішені, є першою стадією класичного шляху активації комплементу. Оскільки Igg1 дикого типу містить сайт для взаємодії з C1q, то досліджували взаємодію C1q з цими неактивуючими варіантами Igg1 методом ELISA.

На 96-ямкові планшети Microton ELISA (Greiner, Німеччина) наносили серійні розведення (від 7 до 30 000 нг/мл у вигляді 4-кратних розведень) Igg1-huCLB-T3/4, bsIgg1-huCLB-T3/4×HER2 й Igg1-CD20 (позитивний контроль) і неактивуючих варіантів антитіл, описаних вище у прикладі 1, протягом ночі при 4 °C. Планшети відмивали й блокували PBS з додаванням 0,025 % Tween 20 і 0,1 % желатину. З відмиваннями між інкубаціями, планшети послідовно інкубували з 3 % збіркою сироваткою людини (Sanquin, продукт #M0008) протягом 1 год. при 37 °C, з 100 мкл на лунку кролячого антитіла проти C1q людини (DAKO, продукт #A0136, 1:4000) протягом 1 год. за кімнатної температури й з 100 мкл на лунку свинячого антитіла проти IgG людини з HRP (DAKO, P0399, 1:10000) у якості детекуючого антитіла протягом 1 год. за кімнатної температури. Детектування проводили шляхом додавання 1 мг/мл 2,2-азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) (ABTS; Roche, Mannheim, Німеччина) приблизно на 30 хв. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл 2 % щавлевої кислоти. Вимірювали поглинання при 405 нм на зчитувальному обладнанні (Biotek, Winooski, VT). Після логарифмічного перетворення дані аналізували шляхом побудови сигмоїдальних кривих доза-відповідь зі змінним нахилом за допомогою програмного забезпечення Graphpad Prism.

З Фіг. 16A видно, що антитіла з Fc-областю Igg1 дикого типу: Igg1-CD20 і Igg1-huCLB-T3/4 проявляють зв'язування з C1q. Але зв'язування з C1q не виявлялось у всіх досліджених варіантів антитіл з неактивуючими мутаціями (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA).

З Фіг. 16B видно, що антитіло з Fc-областю Igg1 дикого типу bsIgg1-huCLB-T3/4×HER2 проявляє зв'язування з C1q. Але зв'язування з C1q не виявлялось у всіх досліджених варіантів антитіл з неактивуючими мутаціями (N297Q, LFLE, LFLENQ, LFLEDA, DA, DAPS, DANQ, LFLEPS, LFLEDANQPS, LALA).

З Фіг. 16C і Фіг. 16D видно, що антитіла з Fc-областю Igg1 дикого типу: Igg1-CD20, Igg1-huCLB-T3/4 і bsIgg1-huCLB-T3/4×HER2 проявляють зв'язування з C1q. Але зв'язування з C1q не виявлялось у варіантів антитіл з неактивуючими мутаціями (LFLEDA і LALA).

Приклад 11. Фармакокінетичний (PK) аналіз неактивуючих варіантів антитіл

У цьому дослідженні мишей розміщали в бар'єрному блоці Central Laboratory Animal Facility (Utrecht, Нідерланди) і утримували в клітках з фільтром нагорі, даючи їм воду і їжу ad libitum. Усі експерименти були схвалені комітетом з етики тварин в Utrecht University. 7-10-тижневим мишам SCID C.B-17 (C.B-17/lcr-Prkdc<Scid>/lcricoCrl, Charles-River) внутрішньовенно вводили 100 мкг антитіла дикого типу (Igg1-huCLB-T3/4, Igg1-HER2 або bsIgg1-huCLB-T3/4×HER2) або його неактивуючого варіанта (LALA, LFLEDA, LFLENQ, DANQ або LFLEDANQPS), використовуючи по 3 миші на 1 групу. Через 10 хв., 4 години, 1 день, 2 дні, 7 днів, 14 днів і 21 день після введення антитіла брали проби крові по 50 мкл із підшкірної вени. Кров відбирали в утримуючі гепарин пробірки й центрифугували 5 хв. при 10000×g. Плазму зберігали при -20 °C аж до визначення концентрації антитіл.

Концентрації IgG людини визначали методом сендвіч-ELISA на загальний hIgG. Для цього на 96-ямкові планшети Microton ELISA (Greiner, Німеччина) наносили мишаче mAb проти IgG-каппа людини клону MH16 (#M1268, CLB Sanquin, Нідерланди) у концентрації 2 мкг/мл у якості захоплюючого антитіла. Після блокування планшета PBS з додаванням 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну додавали зразки у вигляді серійних розведень у буфері ELISA (PBS з додаванням 0,05 % Tween 20 і 0,2 % бичачого сироваткового альбуміну) і інкубували на качалці протягом 1 год. за кімнатної температури (RT). Після цього планшети інкубували з козячим імуноглобуліном проти IgG людини (#109-035-098, Jackson, West Grace, PA) і проявляли за допомогою 2,2'азино-біс(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) (ABTS; Roche, Mannheim, Німеччина). Через 30 хв. реакцію зупиняли додаванням у лунки 2 % щавлевої кислоти. Вимірювали поглинання на зчитувальному обладнанні (Biotek, Winooski, VT) при 405 нм.

Швидкість виведення із плазми (мл/день/кг) розраховували, виходячи із площі під кривою

(AUC), за наступним рівнянням:

$$\frac{\text{доза (мкг/кг)}}{\text{AUC (мкг/мл/день)}}$$

швидкість виведення із плазми =

Аналіз даних проводили за допомогою програмного забезпечення Graphpad Prism.

5 З Фіг. 17A видно, що концентрація IgG людини в плазмі була нижча у варіантів антитіл N297Q, DANQ, LFLENQ і LFLEDANQPS у порівнянні з антитілами дикого типу, що свідчить про більш швидке виведення. Концентрація IgG людини в плазмі у варіантів антитіл LFLEDA і LALA була близька до такої в антитіл дикого типу.

10 З Фіг. 17B видно, що швидкість виведення із плазми у варіантів антитіл N297Q, DANQ і LFLENQ була в 2-3 рази вища, ніж у антитіл дикого типу. Швидкість виведення із плазми у варіанта антитіл LFLEDANQPS була в 3-5 разів вища, ніж у антитіла дикого типу. Швидкість виведення із плазми у варіантів антитіл LFLEDA і LALA була близька до такої в антитіл дикого типу.

Приклад 12. Оцінка імуногенності остова IgG1-LFLEDA in vitro

15 Для того, щоб визначити потенціал клінічної імуногенності в остова IgG1-LFLEDA-K409R, застосовували платформу EpiScreen™ фірми Antitope до IgG1-HER2-LFLEDA. Коротко, виділяли PBMC у когорті з 50 HLA-типованих здорових донорів, що представляють населення Європи й Північної Америки. Після виснаження Т-клітин CD8+ препарати PBMC окремо заморожували й зберігали. Згодом розморожені PBMC культивували й інкубували з IgG1-HER2-LFLEDA-K409R або одним з контрольних зразків (IgG1-HER2 або IgG1-HER2-LFLE-K409R) від 5 до 8 днів. Здатність зразків викликати відповіді Т-клітин CD4+ оцінювали шляхом вимірювання клітинної проліферації (за включенням [<sup>3</sup>H]-тимідину) і продукції IL-2 (методом ELISpot). Донори, що проявляли відповіді з індексом стимуляції (SI; співвідношення сигнал/фон) ≥ 1,9 при обох аналізах, уважалися позитивними.

25 Аналіз методом EpiScreen™ показав, що для IgG1-HER2-LFLEDA в 4 донорів (8 %) проявлялися позитивні відповіді Т-клітин CD4+, що порівнянно з 4 (8 %) і 3 (6 %) позитивними відповідями для IgG1-HER2 і IgG1-HER2-LFLE, відповідно (Фіг. 18). Таким чином, IgG1-HER2-LFLEDA-K409R (а також IgG1-HER2 і IgG1-HER2-LFLE-K409R) проявляють низький потенціал імуногенності із частотою відповідей нижче 10 %. У якості позитивного контролю використовували гуманізоване антитіло A33 (наприклад, [84]) як клінічний еталон контрольного антитіла, яке проявляє високий рівень імуногенності в клініці й зазвичай викликає 20-30 % Т-клітинних відповідей при аналізі методом EpiScreen.

Джерела інформації:

- 35 [1] Xu et al., 2000, Cell Immunol. 200(1):16-26.
- [2] Herold et al., 2005, Diabetes, 54(6):1763-9.
- [3] Staerz et al., 1985, Nature 314:628-631.
- [4] Muller and Kontermann, 2010, Biodrugs 24: 89-98.
- [5] Lum and Thakur, 2011, Biodrugs 25: 365-379.
- 40 [6] Linke et al., 2010, Mabs 2: 129-136.
- [7] Ruf et al., 2010, Br J Clin Pharmacol 69: 617-625.
- [8] Bokemeyer et al., 2009, J Clin Oncol (Meeting Abstracts), 3036.
- [9] Heiss et al., 2010, Int J Cancer 127: 2209-2221.
- [10] Jones et al., 2009, Lancet Oncol 10:1179-1187.
- [11] Kiewe et al., 2006, Clin Cancer Res 12:3085-3091.
- 45 [12] WO 2012/162067.
- [13] WO 2008/119567.
- [14] Fundamental Immunology Ch. 7, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989).
- [15] Lefranc MP et al., 2003, Dev Comp Immunol. Jan;27(1):55-77.
- [16] Brochet X. et al., 2008, Nucl. Acids Res. 36, W503-508.
- 50 [17] Giudicelli, V., Brochet, X, Lefranc, M.-P., 2011, Cold Spring Harb Protoc. Jun 1;2011(6).
- [18] Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15.
- [19] WO 92/22653.
- [20] EP 0 629 240.
- 55 [21] E. Meyers and W. Miller, 1988, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17.
- [22] Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 444-453.
- [23] Clustal W algorithm, Thompson, 1994.
- [24] T cell Epitope Database from e.g. <http://www.iedb.org/>.
- [25] Perry et al., 2008 Drugs R D 9 (6):385-396.

- [26] Bryson et al., 2010, Biodrugs 24 (1):1-8.
- [27] Kabat E.A. et al., 1991, Sequences of proteins of immunological interest. 5th Edition-US Department of Health and Human Services, NIH publication No. 91-3242, pp 662,680,689.
- [28] Oganessian et al., 2008, Acta Cryst. (D64):700-4.
- 5 [29] Canfield et al., 1991, J. Exp.Med. (173):1483-91.
- [30] Duncan et al., 1988, Nature (332):738-40.
- [31] Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. (276):6591-604.
- [32] Idusogie EE et al., 2000, J Immunol. 164: 4178-84.
- [33] Leabman et al., 2013, Mabs; 5(6):896-903.
- 10 [34] Parren et al., 1992, J. Clin Invest. 90: 1537-1546.
- [35] Bruhns et al., 2009, Blood 113: 3716-3725.
- [36] WO 2011/066501.
- [37] Lightle S. et al., 2010, Protein Science (19):753-62.
- [38] Brekke et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138.
- 15 [39] Dall'Acqua WF et al., 2006, J Immunol 177:1129-1138.
- [40] Wu et al., 2010, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (Dvd-ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg.
- [41] WO 2011/131746.
- [42] WO 2002/020039.
- 20 [43] WO 98/050431.
- [44] WO 2011/117329.
- [45] EP 1 870 459.
- [46] WO 2009/089004.
- [47] US 2010 00155133.
- 25 [48] WO 2010/129304.
- [49] WO 2007/110205.
- [50] WO 2010/015792
- [51] WO 2011/143545.
- [52] WO 2012/058768.
- 30 [53] WO 2011/028952.
- [54] WO 2008/003116.
- [55] US 7,262,028.
- [56] US 7,612,181.
- [57] WO 2010/0226923.
- 35 [58] US 7,951,918.
- [59] CN 102250246.
- [60] WO 2012/025525.
- [61] WO 2012/025530.
- [62] WO 2008/157379.
- 40 [63] WO 2010/080538.
- [64] Sykes and Johnston, 1997, Nat Biotech 17, 355- 59.
- [65] US 6,077,835.
- [66] WO 2000/70087.
- [67] Schakowski et al., 2001, Mol Ther 3, 793- 800.
- 45 [68] WO 2000/46147.
- [69] Benvenisty and Reshef, 1986, PNAS USA 83, 9551- 55.
- [70] Wigler et al., 1978, Cell 14, 725.
- [71] Coraro and Pearson, 1981, Somatic Cell Genetics 7, 603.
- [72] US 5,589,466.
- 50 [73] US 5,973,972.
- [74] Van Heeke & Schuster, 1989, J Biol Chem 264, 5503-5509.
- [75] F. Ausubel et al., 1987, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience New York.
- [76] Grant et al., 1987, Methods in Enzymol 153, 516-544.
- 55 [77] Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.
- [78] Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.
- [79] Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy, Plenum Press 1988.
- 60

[80] Chase, "Medical Applications of Radioisotopes, " in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al. (eds.), pp. 624-652, Mack Publishing Co., 1990.

[81] Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies, " in Biotechnology and Pharmacy 227-49, Pezzuto et al. (eds.), Chapman & Hall 1993.

5

[82] US 5,057,313.

[83] US 6,331,175.

[84] Ritter G. et al.; 2001, Cancer Res., 61:6851-9.

## ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

&lt;110&gt; ГЕНМАБ А/С

&lt;120&gt; ГУМАНІЗОВАНИ АБО ХИМЕРНІ АНТИТІЛА ДО CD3

&lt;130&gt; P/0082-WO

&lt;160&gt; 30

&lt;170&gt; Патентна версія 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

&lt;213&gt; Homo sapiens (людина)

&lt;400&gt; 1

Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala

1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

&lt;213&gt; Homo sapiens (людина)

&lt;400&gt; 2

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr

1 5 10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

&lt;213&gt; Homo sapiens (людина)

&lt;400&gt; 3

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

&lt;213&gt; Homo sapiens (людина)

&lt;400&gt; 4

Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr

1 5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

&lt;213&gt; Homo sapiens (людина)

&lt;400&gt; 5

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val

1 5

<210> 6

<211> 125

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 6

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

<210> 7

<211> 125

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 7

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

115 120 125  
 <210> 8  
 <211> 125  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 8  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110  
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125  
 <210> 9  
 <211> 125  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 9  
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp  
 50 55 60  
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr  
 85 90 95  
 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe  
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 10

<211> 109

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 10

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 11

<211> 109

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 11

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 12



<211> 109

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 12

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly

1 5 10 15

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser

20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly

35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asn Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala

65 70 75 80

Gln Ala Asp Asp Glu Ser Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn

85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu

100 105

<210> 13

<211> 186

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 13

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys

1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro

20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp

35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys

50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg

65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg

85 90 95

Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile

100 105 110

Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Val Tyr

115 120 125

Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly

130 135 140

Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro

145 150 155 160

Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp

165 170 175

Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile

180 185

<210> 14

<211> 150

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 14

Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg Val Phe Val Asn Cys

1 5 10 15

Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val Gly Thr Leu Leu Ser

20 25 30

Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile Leu Asp Pro Arg Gly

35 40 45

Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys Asp Lys Glu Ser Thr

50 55 60

Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys Val Glu Leu Asp Pro

65 70 75 80

Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val Ile Ala Thr Leu Leu

85 90 95

Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His Glu Thr Gly Arg Leu

100 105 110

Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg Asn Asp Gln Val Tyr

115 120 125

Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr Ser His Leu Gly Gly

130 135 140

Asn Trp Ala Arg Asn Lys

145 150

<210> 15

<211> 330

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 15

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35            40            45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50            55            60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65            70            75            80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85            90            95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100           105           110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115           120           125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130           135           140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145           150           155           160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165           170           175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180           185           190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195           200           205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210           215           220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225           230           235           240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245           250           255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260           265           270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275           280           285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290           295           300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305           310           315           320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325           330

<210> 16

<211> 330

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

&lt;400&gt; 16

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 17

<211> 119

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 17

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 Ser Ser Tyr

20 25 30

Gly Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Arg Tyr Ser Arg Tyr Ile Tyr Tyr Pro 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 Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Pro Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 106

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 18

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Thr Tyr Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Met Arg

100 105  
 <210> 19  
 <211> 121  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 19  
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Trp Leu Ser Ala Tyr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Leu  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Ile Val Val Arg Pro Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 20  
 <211> 107  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 20  
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 21

<211> 177

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 21

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Gln

1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu

20 25 30

Gly Ser Glu Ala Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly

50 55 60

Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Asn Pro Glu Asp Ala Ser His

65 70 75 80

His Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp

85 90 95

Val Met Ala Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu

100 105 110

Gly Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys

115 120 125

Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly

130 135 140

Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro

145 150 155 160

Ile Arg Lys Gly Gln Gln Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg

165 170 175

Ile

<210> 22

<211> 177

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 22

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Ser Ile Thr Gln Thr Pro Tyr His

1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Ser Gln His Leu

20 25 30

Gly Ser Glu Val Gln Trp Gln His Asn Gly Lys Asn Lys Glu Asp Ser

35 40 45

Gly Asp Arg Leu Phe Leu Pro Glu Phe Ser Glu Met Glu Gln Ser Gly

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

<210> 23

<211> 330

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 23

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



145            150            155            160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
                  165            170            175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
                  180            185            190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
                  195            200            205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
                  210            215            220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225            230            235            240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
                  245            250            255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
                  260            265            270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu  
                  275            280            285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
                  290            295            300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305            310            315            320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
                  325            330  
 <210> 24  
 <211> 330  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 24  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1            5            10            15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
                  20            25            30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
                  35            40            45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
                  50            55            60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65            70            75            80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
                  85            90            95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330  
 <210> 25  
 <211> 330  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 25  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50            55            60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65            70            75            80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
              85            90            95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
              100            105            110  
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
              115            120            125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
              130            135            140  
 Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145            150            155            160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
              165            170            175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
              180            185            190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
              195            200            205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
              210            215            220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225            230            235            240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
              245            250            255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
              260            265            270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Leu  
              275            280            285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
              290            295            300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305            310            315            320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
              325            330  
 <210> 26  
 <211> 330  
 <212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)  
 <213> Homo sapiens (людина)  
 <400> 26  
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1            5            10            15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
              20            25            30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
              35            40            45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
              50            55            60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
              65            70            75            80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
              85            90            95  
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
              100            105            110  
 Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
              115            120            125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
              130            135            140  
 Val Val Val Ala Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
              145            150            155            160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
              165            170            175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
              180            185            190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
              195            200            205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
              210            215            220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
              225            230            235            240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
              245            250            255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
              260            265            270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
              275            280            285  
 Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
              290            295            300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
              305            310            315            320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
              325            330

<210> 27

<211> 125

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 27

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

<210> 28

<211> 109

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 28

Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser  
 20 25 30  
 Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly  
 35 40 45  
 Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 100 105  
 <210> 29

<211> 122

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Asp Arg

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His 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 Thr Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Asp Ile Gln Tyr Gly Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30

<211> 107

<212> PRT (ГРУПА ЗАХИСНОЇ/РАДИКАЛ ТРАНСЛОКАЦІЇ)

<213> Homo sapiens (людина)

<400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Гуманізоване антитіло, що зв'язується з CD3 людини, яке містить у собі зв'язувальну область, що містить варіабельну область важкого ланцюга (VH), послідовності SEQ ID NO: 6 і варіабельну область легкого ланцюга (VL), послідовності SEQ ID NO: 10.
2. Антитіло за пунктом 1, яке **відрізняється** тим, що є повнорозмірним антитілом.
3. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що містить у собі Fc-область, яка містить перший і другий важкі ланцюги імуноглобуліну.
4. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що дані перший і другий важкі ланцюги належать до ізотипу, вибраного із групи, яка складається з IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4.
5. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що містить у собі Fc-область, яка була модифікована так, щоб зв'язування C1q з даним антитілом зменшилося у порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 95 %, на 97 %, на 99 % або на 100 % при визначенні зв'язування з C1q методом ELISA.
6. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що містить у собі Fc-область, яка була модифікована так, щоб це антитіло викликало зниження Fc-опосередкованої проліферації Т-клітин у порівнянні з антитілом дикого типу щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або на 100 % при вимірюванні такої проліферації Т-клітин методом функціонального аналізу на основі мононуклеарів периферичної крові (PBMC),
7. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що містить у собі Fc-область, яка була модифікована так, щоб це антитіло знижувало Fc-опосередковану експресію CD69 щонайменше на 50 %, на 60 %, на 70 %, на 80 %, на 90 %, на 99 % або на 100 % у порівнянні з антитілом дикого типу при визначенні Fc-опосередкованої експресії CD69 методом функціонального аналізу на основі PBMC.
8. Антитіло за будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що містить перший і другий важкі ланцюги імуноглобуліну, причому щонайменше в одному із цих першого й другого важких ланцюгів імуноглобуліну амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A чи A, A і A, відповідно.
9. Антитіло за п. 8, яке **відрізняється** тим, що щонайменше в одному із першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно.
10. Антитіло за п. 8, яке **відрізняється** тим, що щонайменше в одному із першого й другого важких ланцюгів амінокислоти в положеннях, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені A, A і A, відповідно.
11. Антитіло будь-яким з попередніх пунктів, яке **відрізняється** тим, що містить Fc-область, що включає перший і другий важкі ланцюги імуноглобуліну, в яких амінокислоти в положенні, які відповідають положенням L234, L235 і D265 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені F, E і A, відповідно, амінокислоти в положенні N297 і P331 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлені N і P відповідно і позиції амінокислот пронумеровані відповідно до системи нумерації EU.
12. Антитіло за п. 11, яке **відрізняється** тим, що включає константну область важкого ланцюга SEQ ID NO: 16.
13. Антитіло за п. 11, яке **відрізняється** тим, що включає константну область важкого ланцюга SEQ ID NO: 25.
14. Антитіло за п. 11, яке **відрізняється** тим, що включає константну область важкого ланцюга SEQ ID NO: 26.
15. Біспецифічне антитіло, яке містить першу зв'язувальну область антитіла за будь-яким з пп. 1-4 і другу зв'язувальну область, яка зв'язується з іншою мішенню, ніж дана перша область, яка зв'язує антиген.
16. Біспецифічне антитіло за п. 15, яке **відрізняється** тим, що антитіло містить у собі, перший і другий важкі ланцюги.
17. Біспецифічне антитіло за п. 16, яке **відрізняється** тим, що:
  - а) містить Fc-область, модифіковану за будь-яким з пп. 5-7; або в якому б) щонайменше один із першого й другого важких ланцюгів містить одну або кілька амінокислот, модифікованих так, як визначено в будь-якому з пп. 8-14.
  18. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-17, яке **відрізняється** тим, що кожен із першого й другого важких ланцюгів містить принаймні шарнірну область, область C<sub>H</sub>2 і область C<sub>H</sub>3, причому в першому важкому ланцюзі щонайменше одна з амінокислот у положеннях, які

відповідають положенням, вибраних із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, була замінена, і в другому важкому ланцюзі щонайменше одна з амінокислот у положеннях, які відповідають положенням, вибраних із групи, яка складається з T366, L368, K370, D399, F405, Y407 і K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, була замінена, причому перший і даний другий важкі ланцюги замінені не в тих самих положеннях.

19. Біспецифічне антитіло за п. 18, яке **відрізняється** тим, що у першому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає F405 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена L, а в другому важкому ланцюзі амінокислота в положенні, що відповідає K409 у важкому ланцюзі IgG1 людини, представлена R, або ж навпаки.

20. Біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-19, яке **відрізняється** тим, що перша зв'язувальна область відповідає будь-якому з пп. 1-7, а друга зв'язувальна область зв'язується з іншою мішенню, ніж перша зв'язувальна область.

21. Конструкція з нуклеїнової кислоти, що кодує варіабельну область важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO: 6 або варіабельну область легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO: 10.

22. Експресуючий вектор, який містить:

(i) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує

послідовність важкого ланцюга гуманізованого або химерного антитіла за будь-яким з пп. 1-20;

(ii) послідовність нуклеїнової кислоти, що кодує послідовність легкого ланцюга гуманізованого або химерного антитіла за будь-яким з пп. 1-20; або

(iii) - і (i), і (ii) .

23. Клітина хазяїна, яка містить експресуючий вектор за п. 22.

24. Клітина хазяїна за п. 23, яка є рекомбінантною еукаріотичною, рекомбінантною прокаріотичною або рекомбінантною мікробною клітиною хазяїна.

25. Композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-14 або біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-20.

26. Фармацевтична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-14 або біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-20 і фармацевтично прийнятний носій.

27. Антитіло за будь-яким з пп. 1-14, біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-20, композиція за п. 25 або фармацевтична композиція за п. 26 для застосування як лікарського засобу.

28. Антитіло за будь-яким з пп. 1-14, біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-20, композиція за п. 25 або фармацевтична композиція за п. 26 для застосування при лікуванні захворювання.

29. Спосіб одержання антитіла за будь-яким з пп. 1-14 або біспецифічного антитіла за будь-яким з пп. 15-20, який включає стадії:

а) культивування клітин хазяїна за будь-яким з пп. 23-24; і

б) виділення даного антитіла з культурального середовища.

30. Діагностична композиція, яка містить антитіло за будь-яким з пп. 1-14 або біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-20.

31. Спосіб виявлення наявності антигену CD3 або клітин, експресуючих CD3, у зразку, який включає стадії:

а) контактування зразка з антитілом за будь-яким з пп. 1-14 або біспецифічним антитілом за будь-яким з пп. 15-20 в умовах, що сприяють утворенню комплексу між даним антитілом і CD3, і

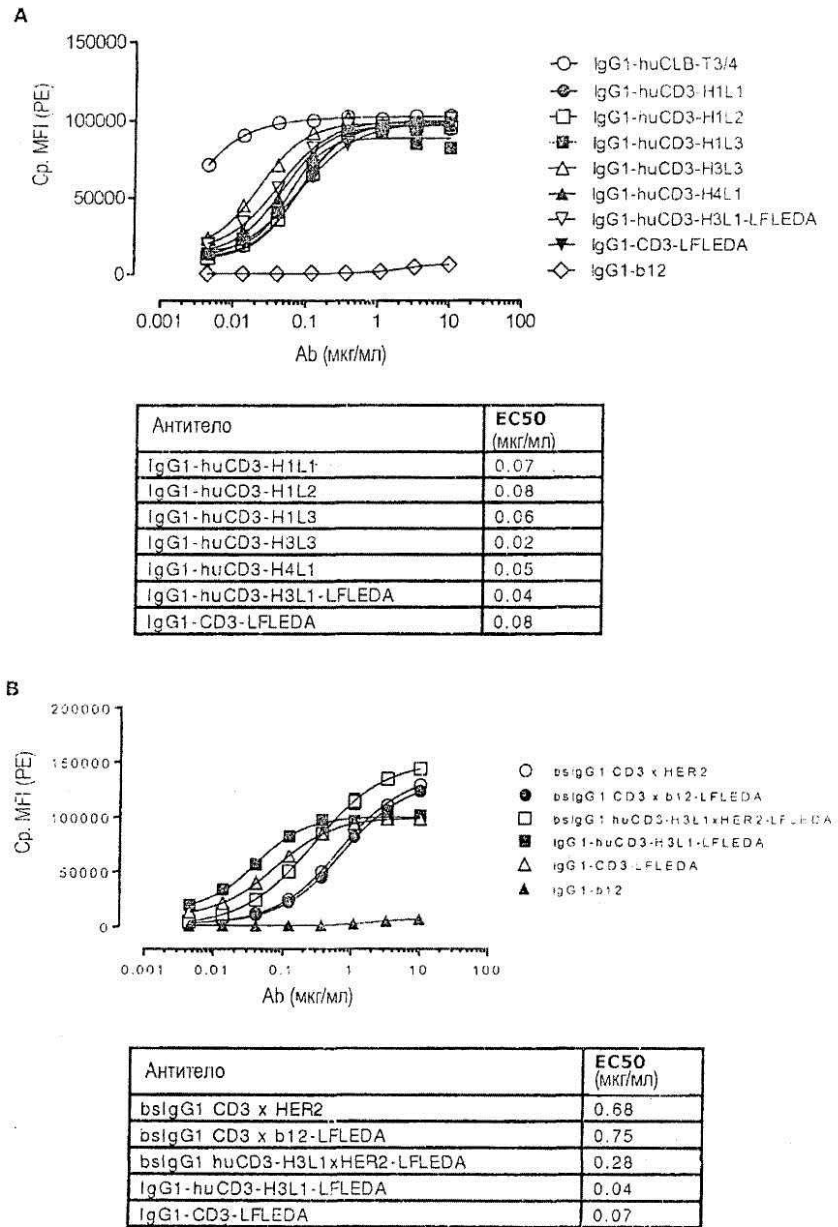
б) аналізу того, чи утворився комплекс.

32. Набір для виявлення наявності антигену CD3 або клітин, експресуючих CD3, у зразку, який включає:

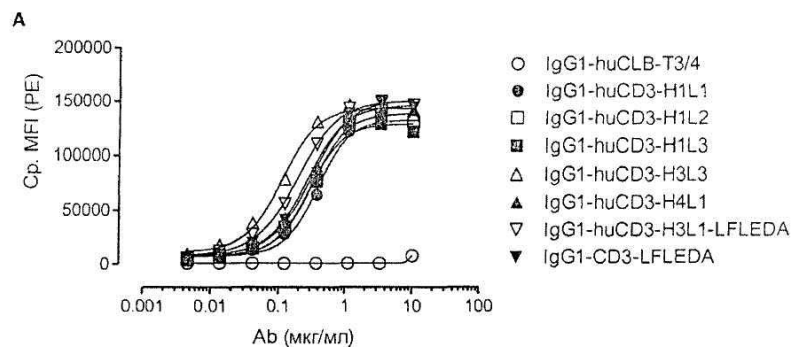
i) антитіло за будь-яким з пп. 1-14 або біспецифічне антитіло за будь-яким з пп. 15-20; і

ii) інструкції із застосування даного набору.

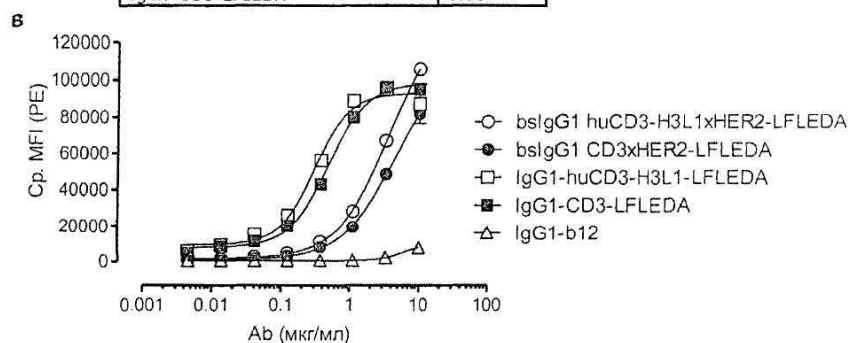




Фиг. 1

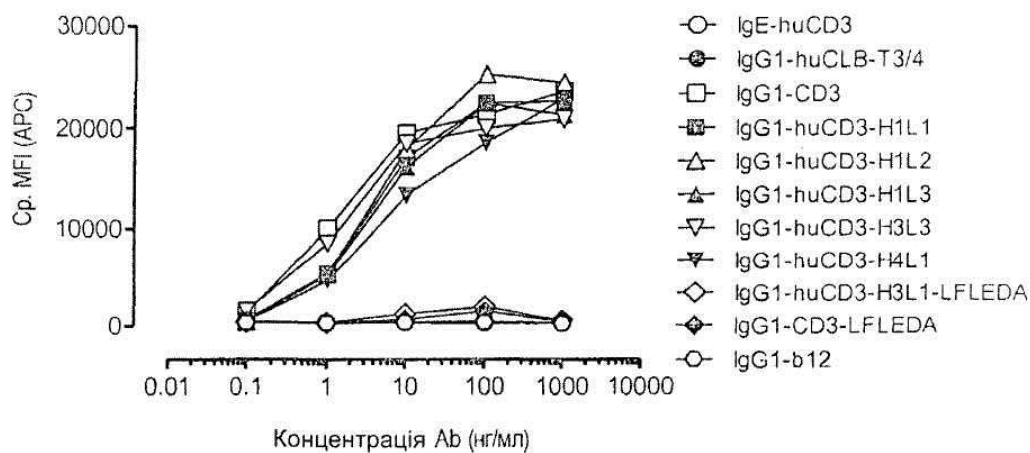


Антитело	EC50 (мкг/мл)
IgG1-huCD3-H1L1	0.37
IgG1-huCD3-H1L2	0.31
IgG1-huCD3-H1L3	0.28
IgG1-huCD3-H3L3	0.11
IgG1-huCD3-H4L1	0.26
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.19
IgG1-CD3-LFLEDA	0.30



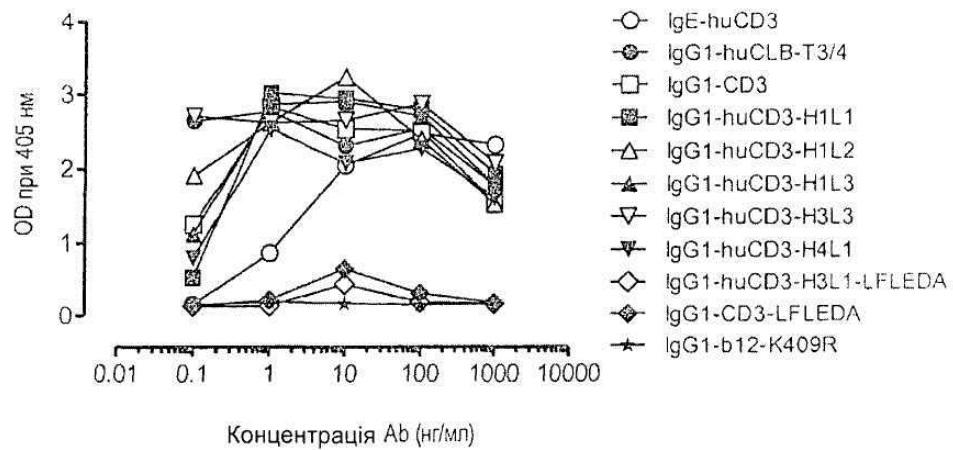
Антитело	EC50 (мкг/мл)
bslgG1 CD3xHER2-LFLEDA	4.46
bslgG1 huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	3.64
IgG1-CD3-LFLEDA	0.47
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.30

Фіг. 2

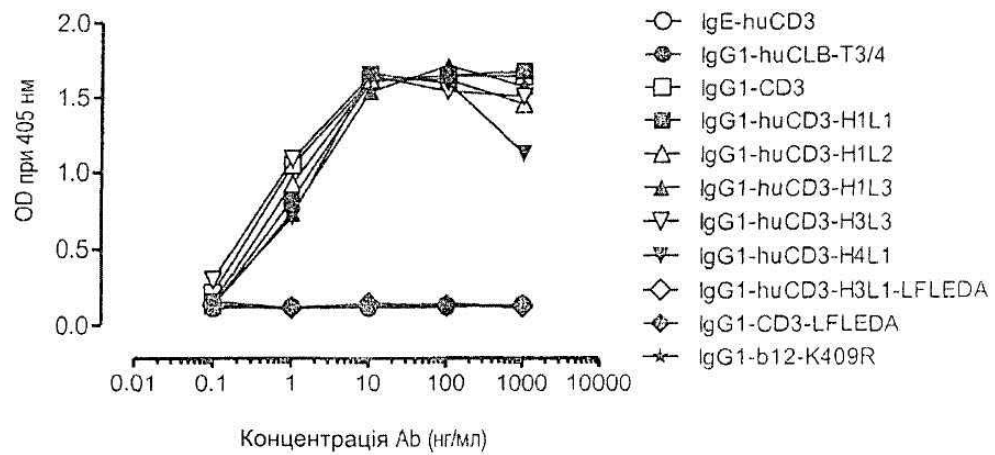


Фіг. 3

A

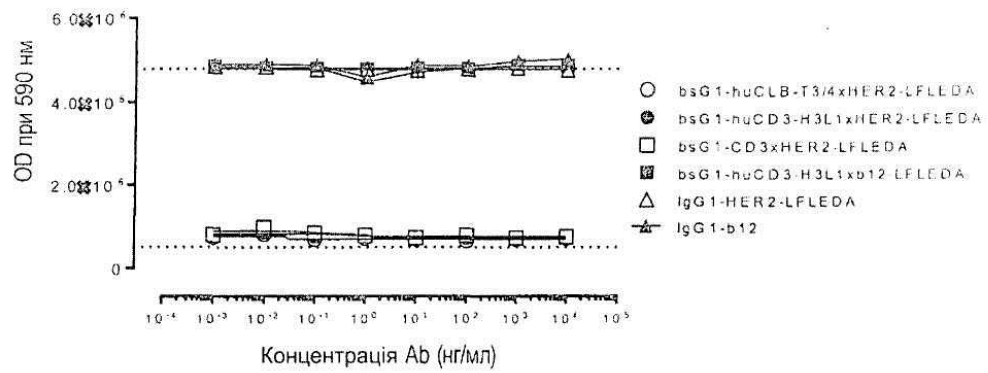


B

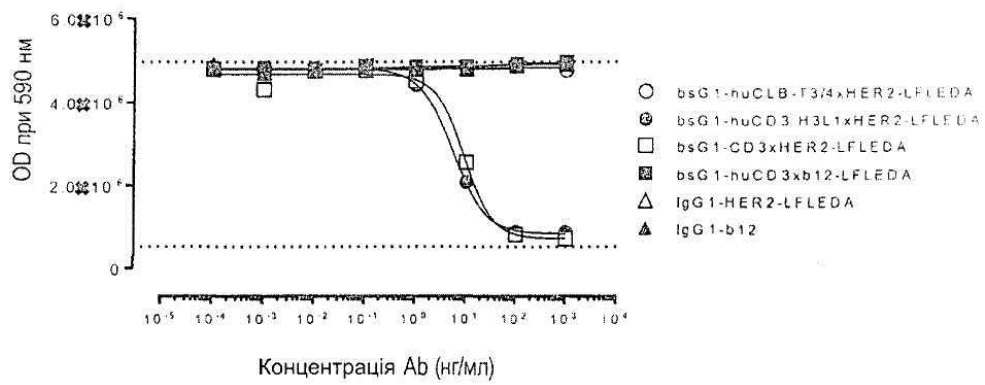


Фіг. 4

A

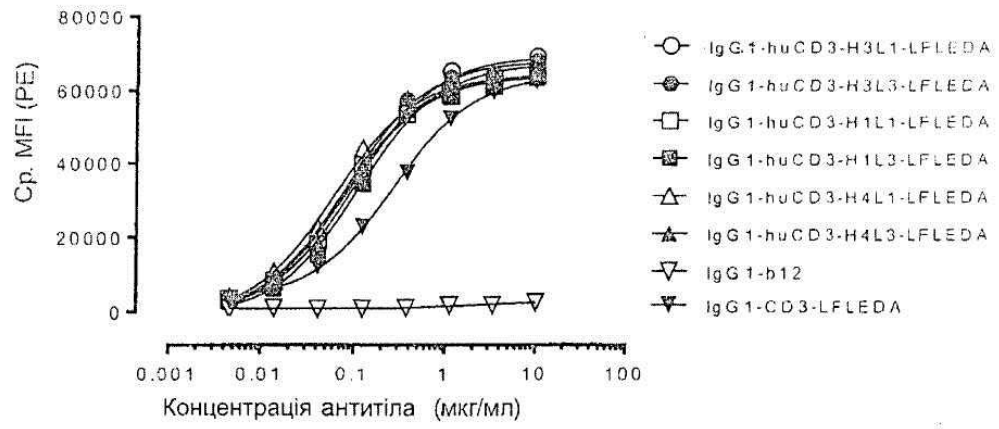


B



Фіг. 5

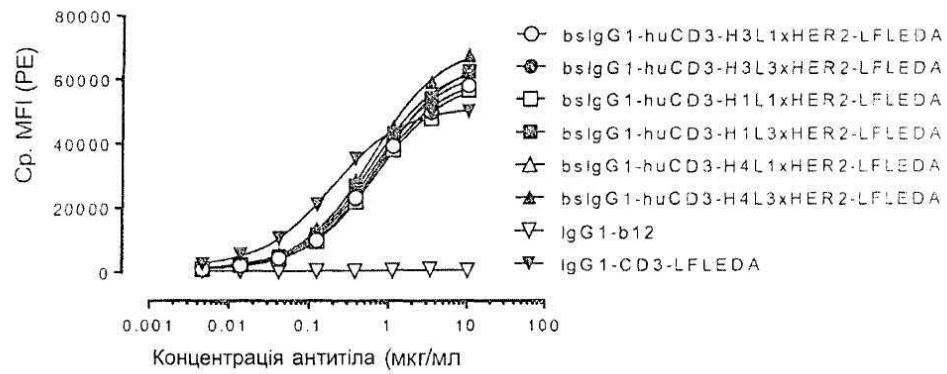
A



Антитело	EC50 (мкг/мл)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.10
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA	0.08
IgG1-3huCD3-H1L1-LFLEDA	0.08
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA	0.11
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA	0.06
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA	0.08
IgG1-CD3-LFLEDA	0.27

Фіг. 6

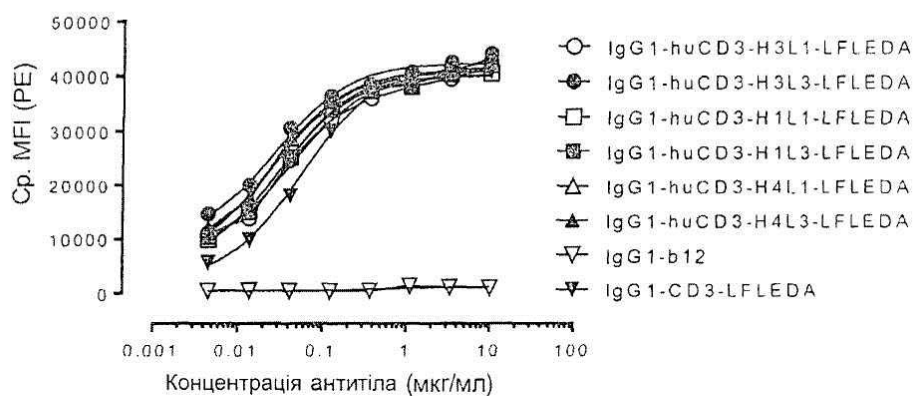
B



Антитело	EC50 (мкг/мл)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.64
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.74
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.66
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.58
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.62
bsIgG1-huCD3-H4L3xHER2-LFLEDA	0.59
IgG1-CD3-LFLEDA	0.18

Фіг. 6 (продовження)

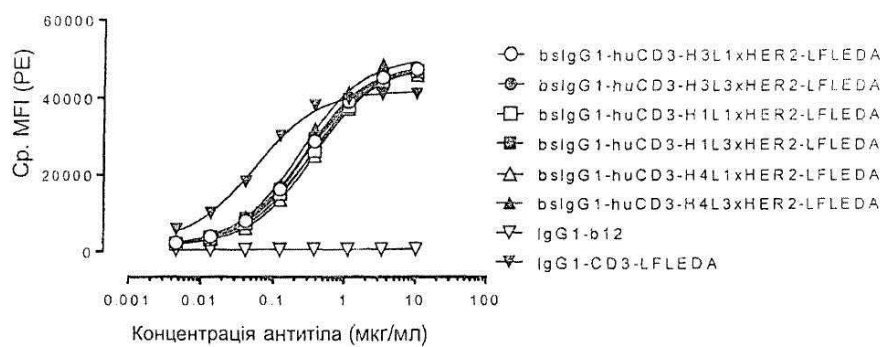
A



Антитіло	EC50 (мкг/мл)
IgG1-huCD3-H3L1-LFLEDA	0.04
IgG1-huCD3-H3L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H1L3-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L1-LFLEDA	0.03
IgG1-huCD3-H4L3-LFLEDA	0.02
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

Фіг. 7

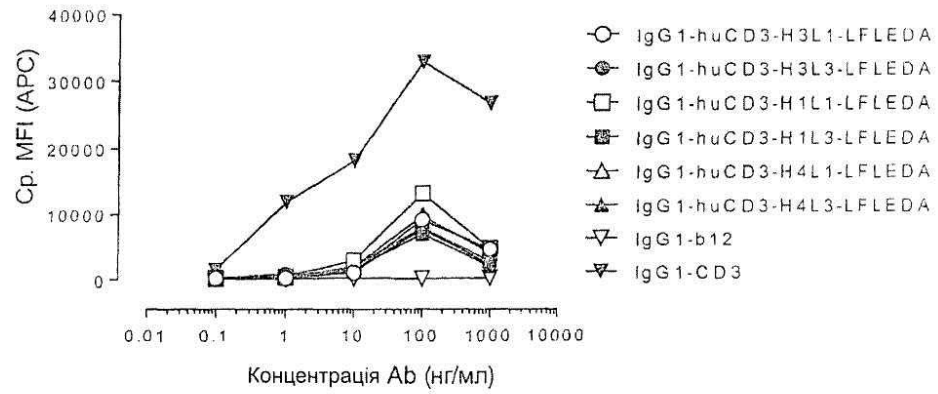
B



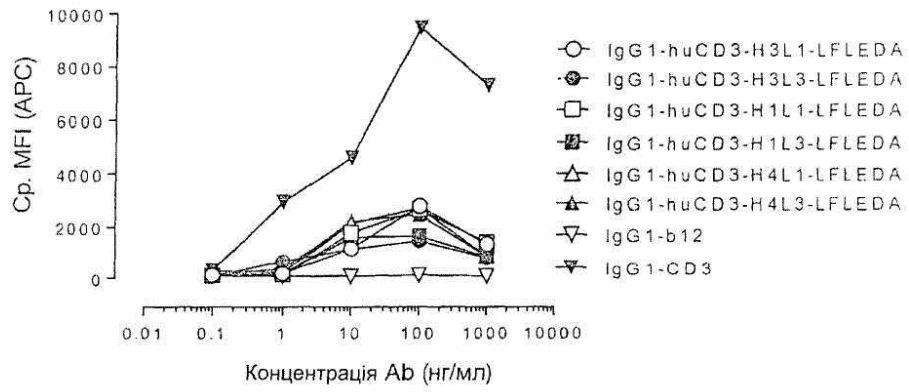
Антитіло	EC50 (мкг/мл)
bsIgG1-huCD3-H3L1xHER2-LFLEDA	0.28
bsIgG1-huCD3-H3L3xHER2-LFLEDA	0.26
bsIgG1-huCD3-H1L1xHER2-LFLEDA	0.32
bsIgG1-huCD3-H1L3xHER2-LFLEDA	0.25
bsIgG1-huCD3-H4L1xHER2-LFLEDA	0.36
bsIgG1-huCD3-H4L3xHER2-LFLEDA	0.24
IgG1-CD3-LFLEDA	0.06

Фіг. 7 (продовження)

A



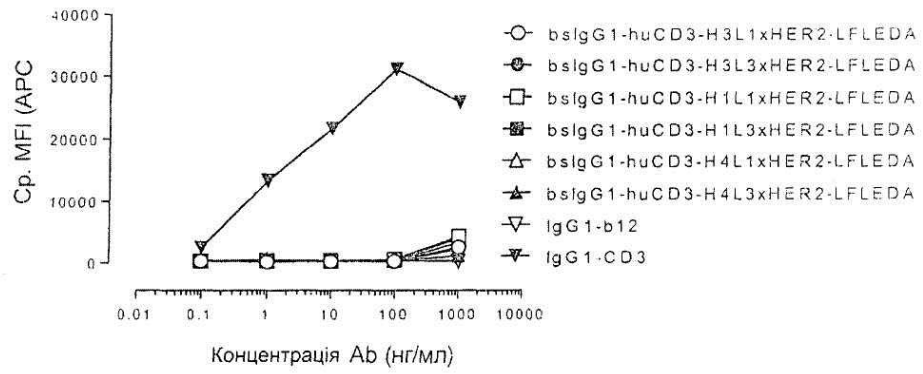
B



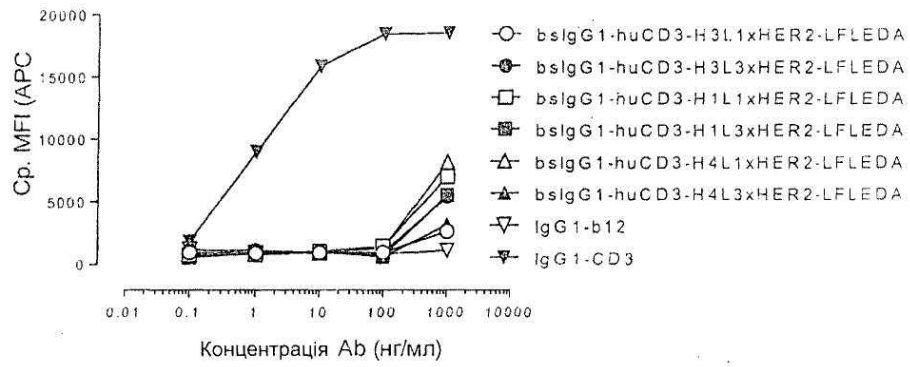
Фіг. 8



C

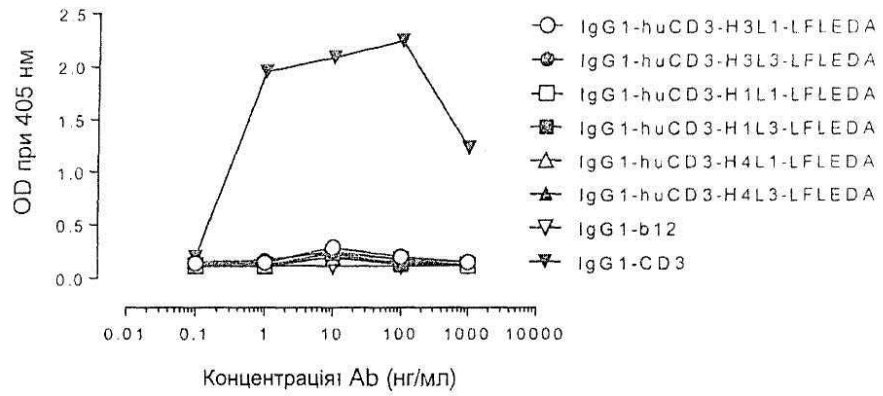


D

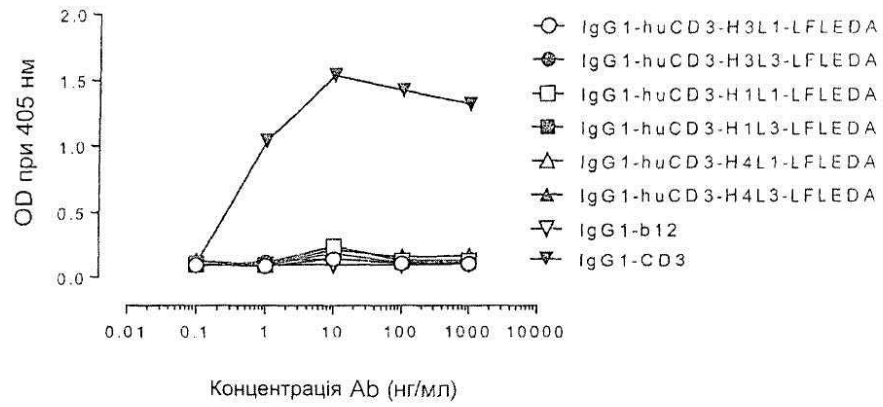


Фіг. 8 (продовження)

A

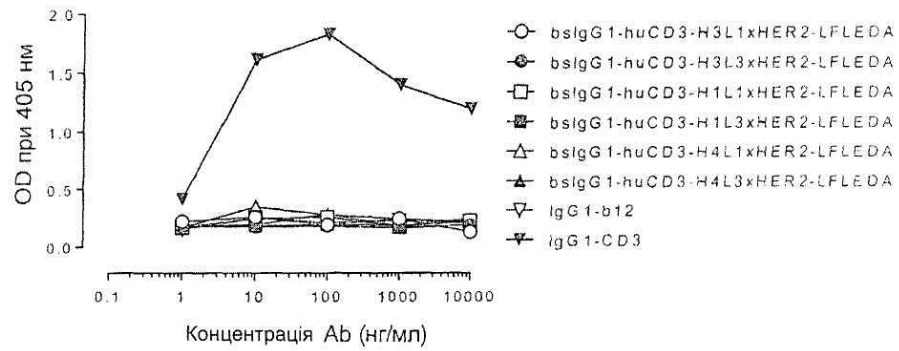


B

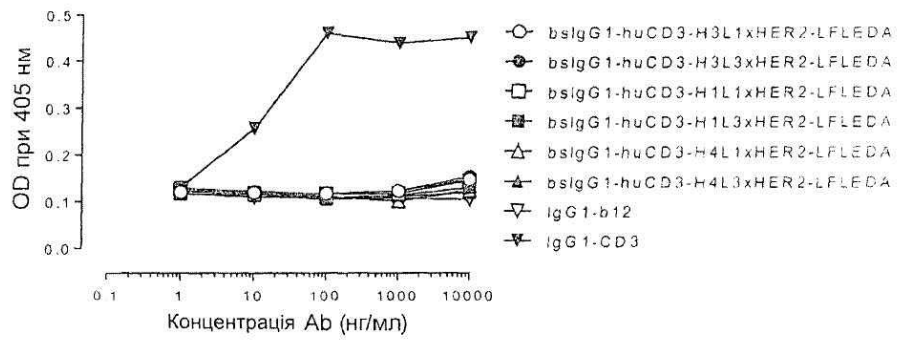


Фіг. 9

C

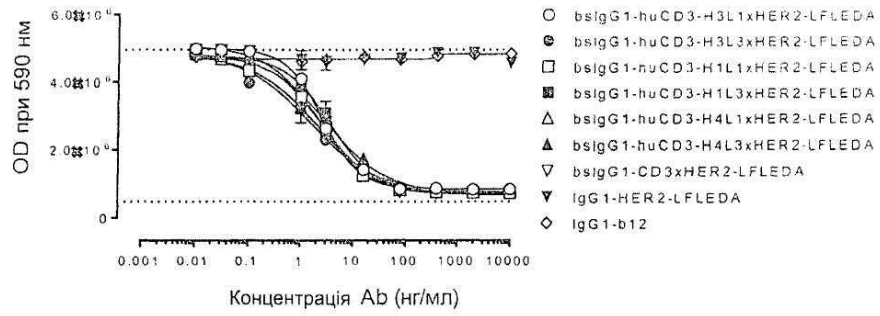


D

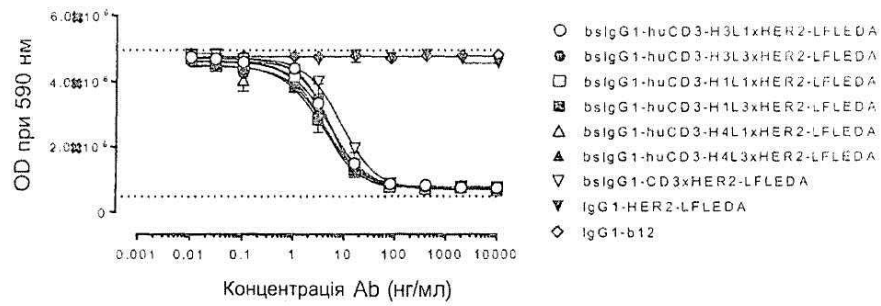


Фіг. 9 (продовження)

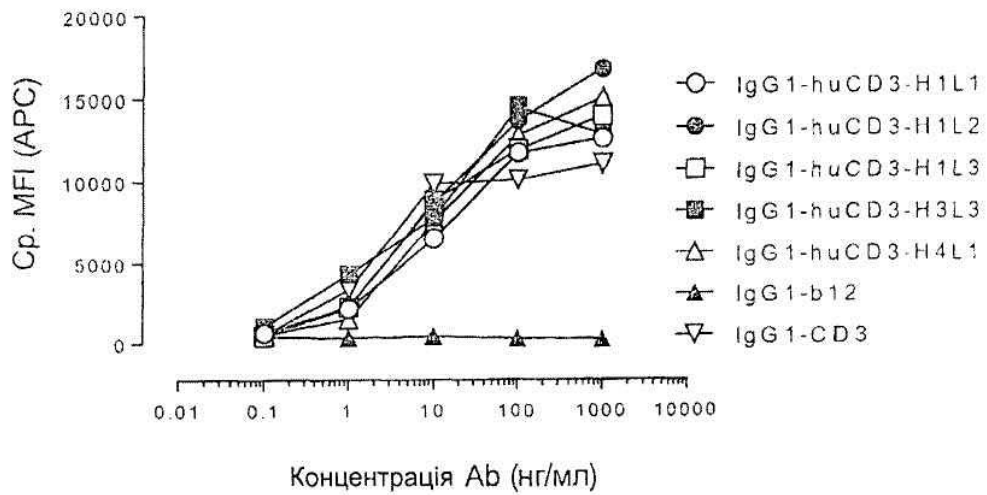
A



B

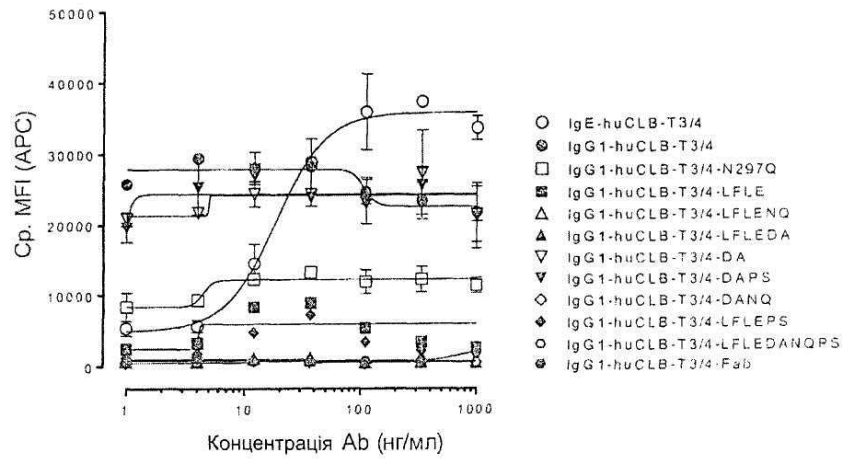


Фіг. 10

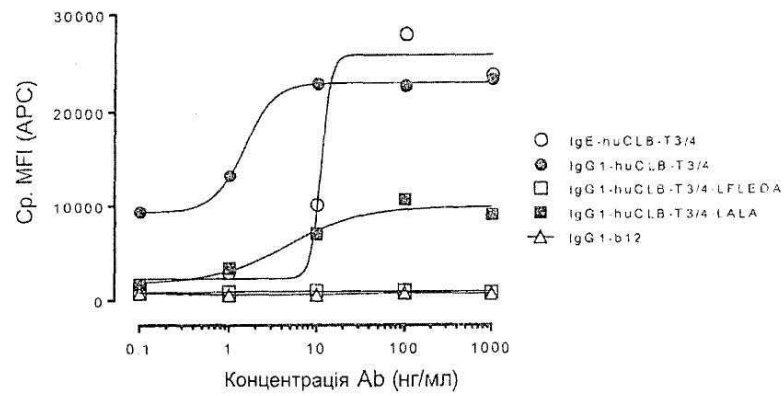


Фіг. 11

A

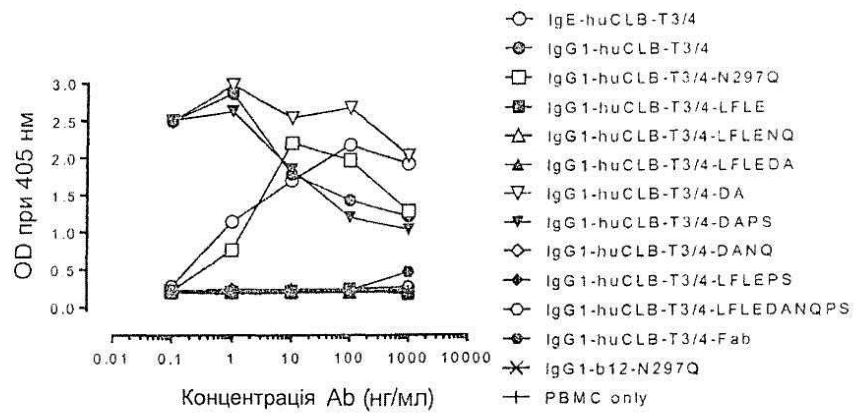


B

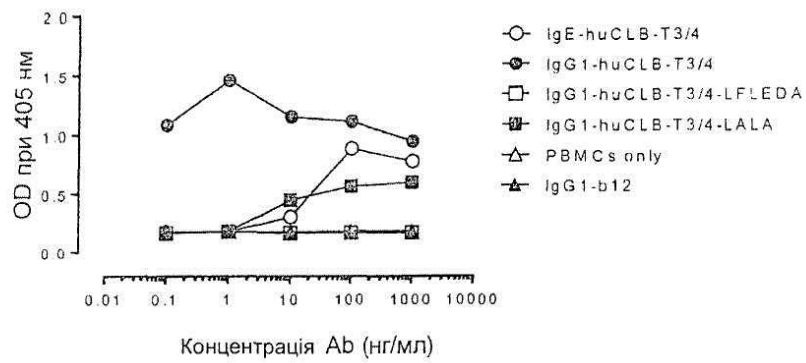


Фіг. 12

A

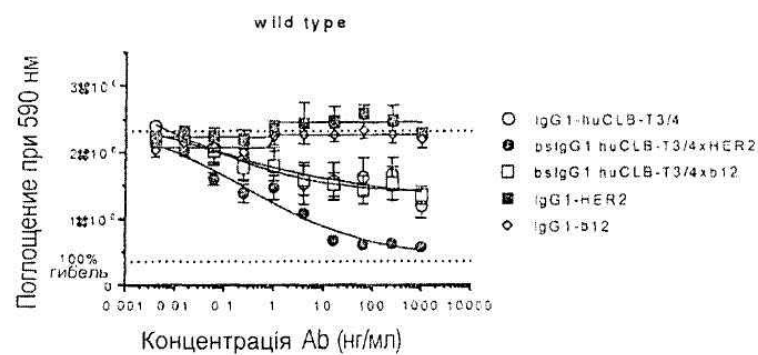


B

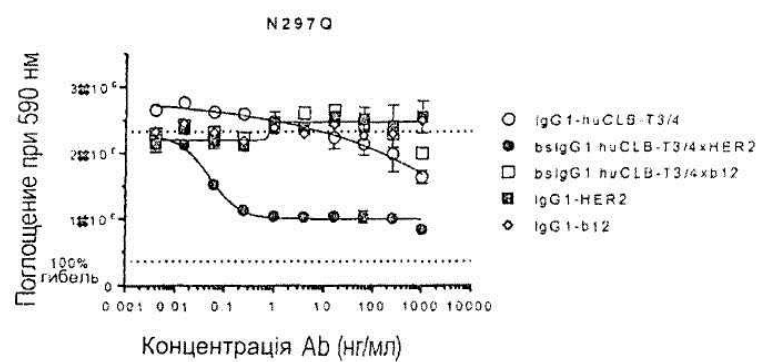


Фіг. 13

A

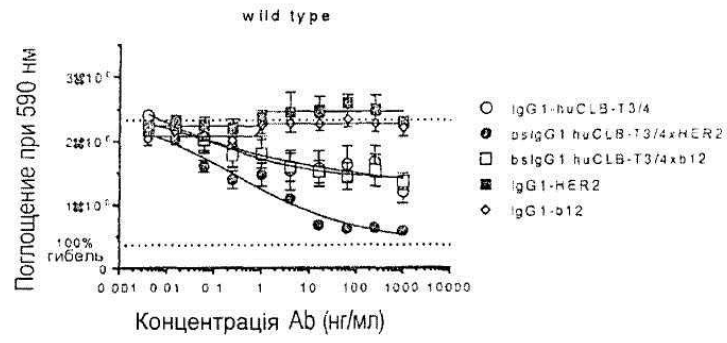


B

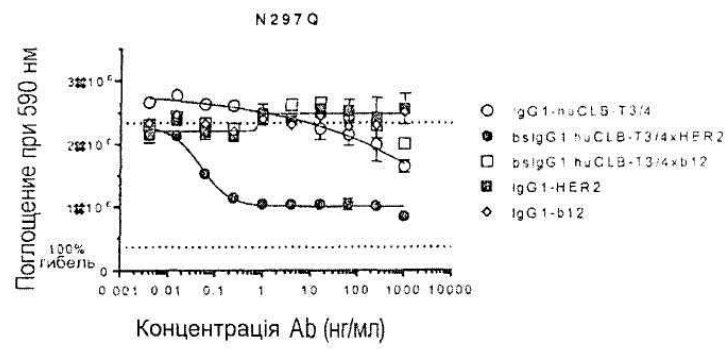


Фіг. 14

A



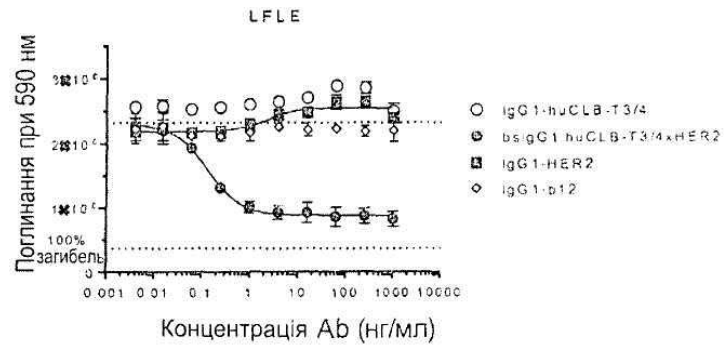
B



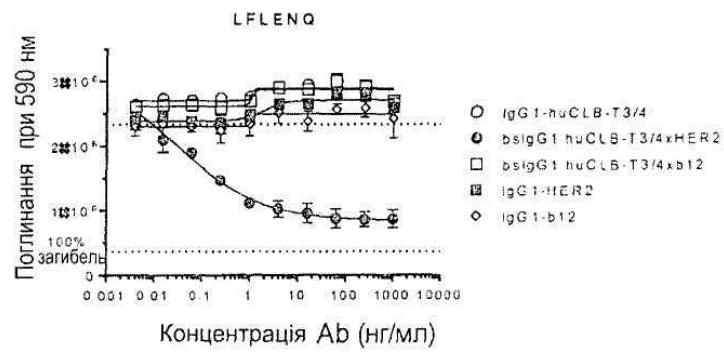
Фіг. 14



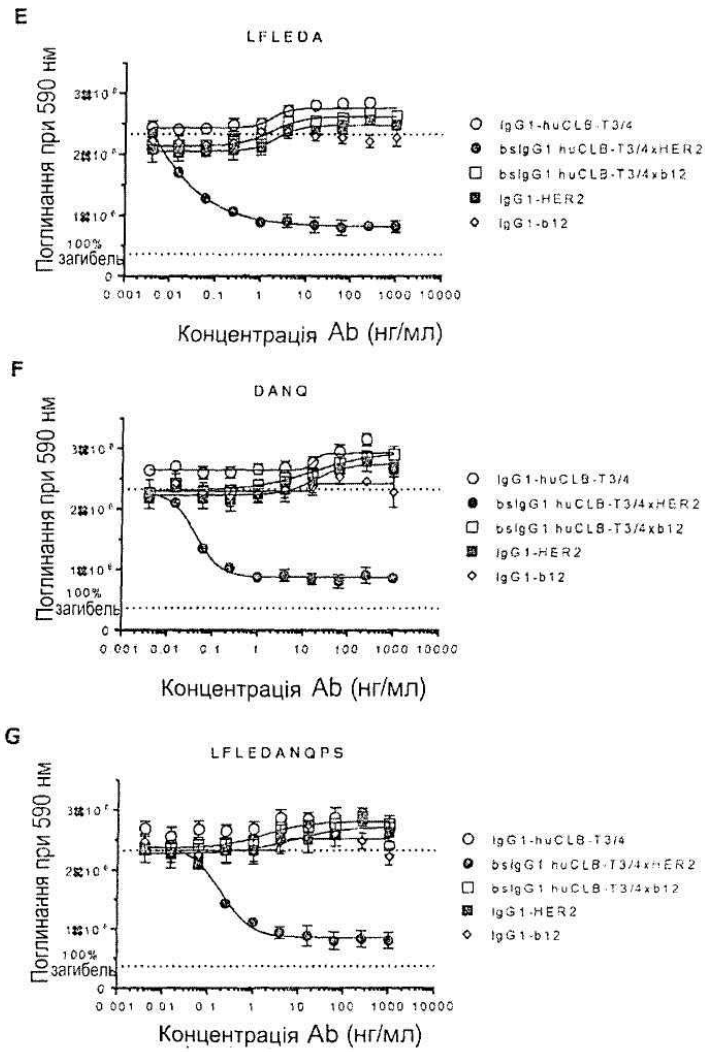
C



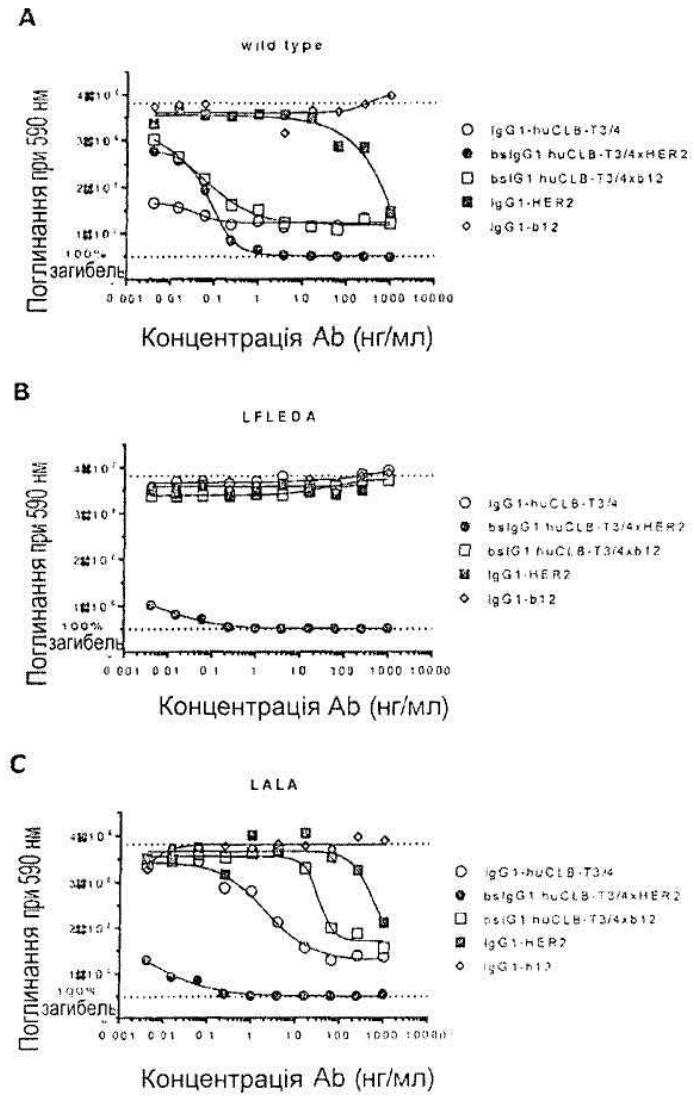
D



Фіг. 14 (продовження)

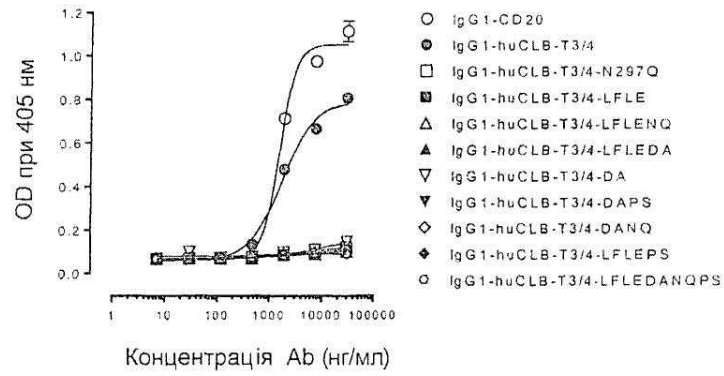


Фіг. 14 (продовження)

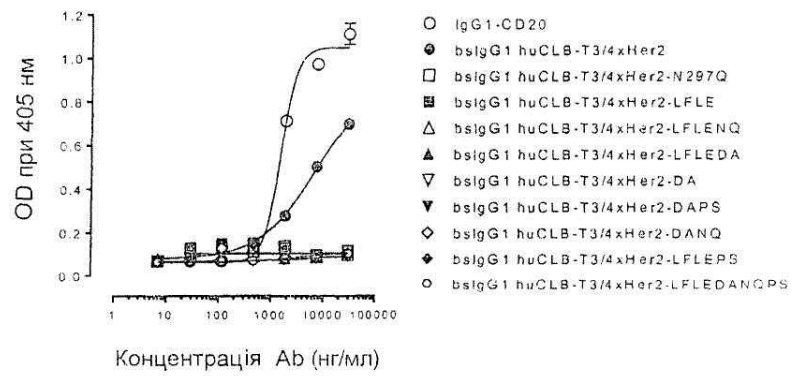


Фіг. 15

A

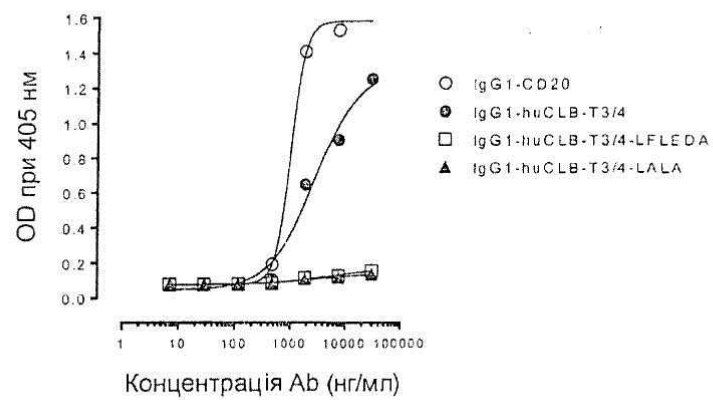


B

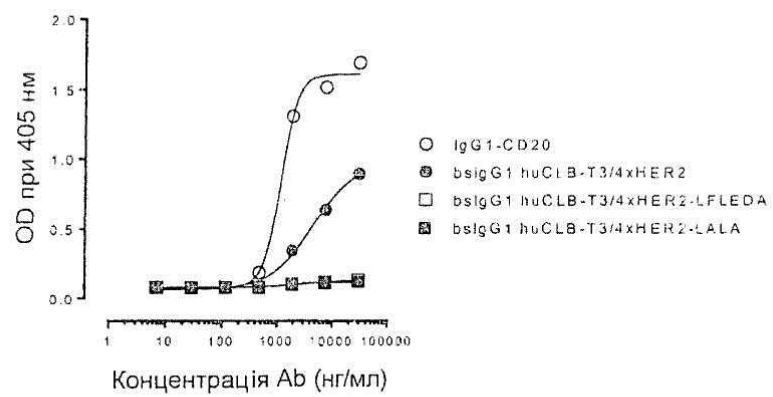


Фіг. 16

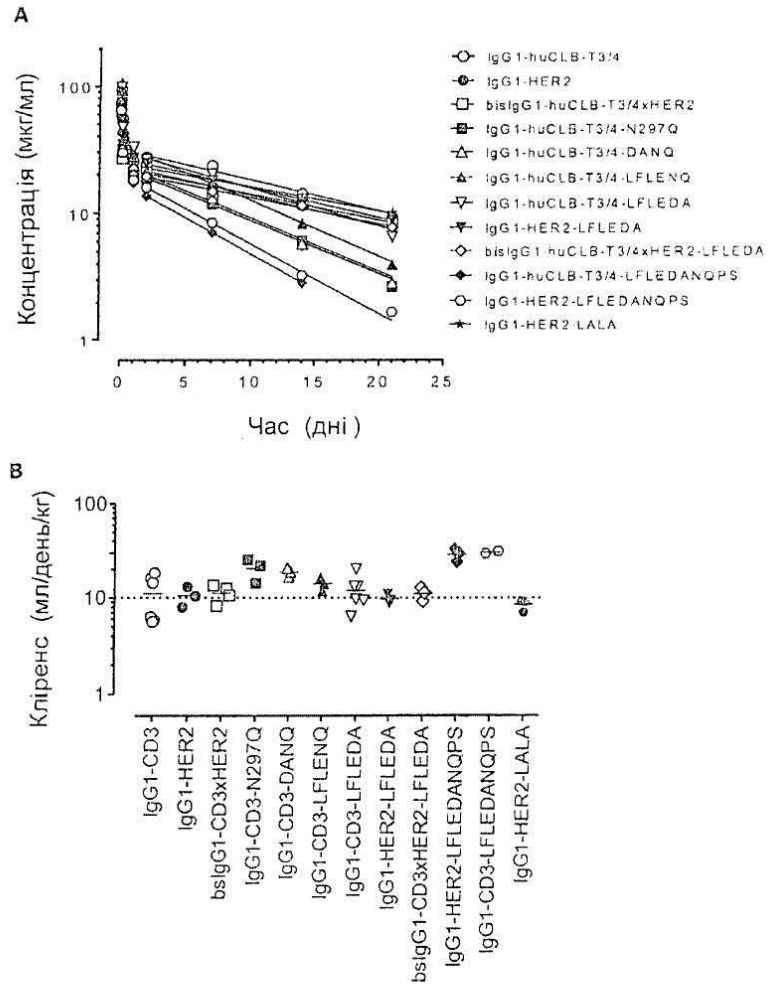
C



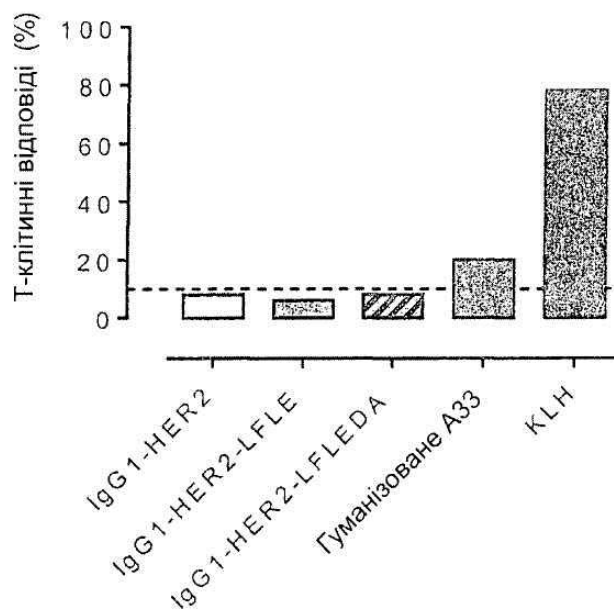
D



Фіг. 16 (продовження)



Фіг. 17



Фіг. 18

**VH**  
 VH3 EVKLIVSGGGLVKPGRSLRLSCAASGFTFTNYAMHWVQAPGKGLMWVARIKSKYNNYATYYADSVKDRFTISRQDSKSLYLQMSLKTEPTAMYYICVRHGNFGNSYVSWPAYWGOGTLVTSS  
 VH2 -----N----- 99%  
 VH4 -----M----- 99%  
 VH1 -----C-G-----S-----N----- 97%  
  
**VL**  
 VL1 QAVVTQEPFSEVSPGGTVTLTCRSGTGAVITSNYANWVOQTPGQAFGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQADESTYFCALWYSNLWFEGGGLTLVL  
 VL2 -----IL-N----- 97%  
 VL3 -----IL-N-----D-Y----- 95%

Фіг. 19

Комп'ютерна верстка В. Мацело

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601