

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение, в общем, относится к полностью человеческим антителам против CD3, а также к способам их применения.

Предшествующий уровень техники

Иммунная система организма служит в качестве защиты против различных состояний, включая, например, травму, инфекцию и неоплазию, и опосредована двумя отдельными, но взаимосвязанными системами, клеточной и гуморальной иммунной системами. В общем, гуморальная система опосредована растворимыми продуктами, называемыми антителами или иммуноглобулинами, которые способны соединяться с продуктами, распознаваемыми системой как чужеродные для организма, и нейтрализовать их. В отличие от этого, клеточная иммунная система вовлекает мобилизацию особых клеток, называемых Т-клетками, которые выполняют различные терапевтические роли.

Иммунная система людей и животных включает в себя два основных класса лимфоцитов: клетки тимусного происхождения (Т-клетки) и клетки костно-мозгового происхождения (В-клетки). Зрелые Т-клетки выходят из тимуса и циркулируют в тканях, лимфатической системе и кровяном русле. Т-клетки проявляют иммунологическую специфичность и непосредственно вовлечены в клеточно-опосредованные иммунные реакции (такие как отторжение трансплантата). Т-клетки действуют против различных чужеродных структур (антигенов) или в ответ на их появление. Во многих случаях данные чужеродные антигены экспрессируются на клетках хозяина в результате инфекции. Однако чужеродные антигены также могут происходить от самого хозяина, измененного неоплазией или инфекцией. Хотя Т-клетки сами не секретируют антитела, они обычно требуются для секреции антител вторым классом лимфоцитов, В-клетками.

Имеются различные субпопуляции Т-клеток, которые, в общем, определяются антигенными детерминантами, находящимися на их клеточных поверхностях, а также функциональной активностью и распознаванием чужеродного антигена. Некоторые субпопуляции Т-клеток, такие как CD8+ клетки, являются киллерными/супрессорными клетками, которые играют регуляторную функцию в иммунной системе, тогда как другие, такие как CD4+ клетки, служат для стимуляции воспалительных и гуморальных реакций.

Переход в митоз человеческих периферических Т-лимфоцитов может стимулироваться различными агентами, включая чужеродные антитела, моноклональные антитела и лектины, такие как фитогемагглютинин и конканавалин А. Хотя активация преимущественно происходит за счет связывания митогенов в специфических участках на клеточных мембранах, природа данных рецепторов и механизм их активации не вполне выяснены. Индукция пролиферации является только одним признаком активации Т-клеток. Другие признаки активации, определенной как изменения фонового или покоящегося состояния клетки, включают в себя повышение продукции цитокинов и активности цитотоксических клеток.

Активация Т-клеток является комплексным феноменом, который зависит от участия различных молекул клеточной поверхности, экспрессированных на отвечающей популяции Т-клеток. Например, антигенспецифичный Т-клеточный рецептор (TcR) состоит из связанного дисульфидными связями гетеродимера, содержащего две клонально распределенных интегральных мембранных цепи гликопротеинов, альфа и бета (α и β), или гамма и дельта (γ и δ), нековалентно ассоциированных с комплексом инвариантных белков с низкой молекулярной массой, обычно обозначаемых как CD3 (ранее обозначаемых как T3).

Альфа- и бета-цепи TcR определяют специфичность антигена. Структуры CD3 представляют добавочные молекулы, являющиеся элементами трансдукции сигналов активации, инициированных после связывания TcR альфа-бета (TcR $\alpha\beta$) со своим лигандом. Имеются обе константные области гликопротеиновых цепей TcR, и переменные области (полиморфизмы). Полиморфные переменные области TcR определяют субпопуляции Т-клеток с различной специфичностью. В отличие от антител, которые распознают целые или более малые фрагменты антигена, комплекс TcR взаимодействует только с малым пептидом антигена, который должен презентироваться в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). Молекулы МНС представляют другой, высокополиморфный набор молекул, случайно распределенных по виду. Так, активация часто требует тройного взаимодействия TcR и чужеродного пептидного антигена, связанного с основными белками МНС.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к полностью человеческим моноклональным антителам, направленным против CD3. Примеры моноклональных антител включают в себя описанные здесь 28F11, 27H5, 23F10 и 15C3. Альтернативно, моноклональное антитело представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и 28F11, 27H5, 23F10 или 15C3. Данные антитела, соответственно, обозначаются здесь как антитела huCD3. Антитело huCD3 имеет одну или несколько следующих характеристик: антитело связывается с CD3-положительными (CD3+) клетками, но не с CD3-отрицательными (CD3-) клетками; антитело huCD3 индуцирует антигенную модуляцию с вовлечением изменения (например, снижения) уровня экспрессии на клеточной поверхности или активность CD3 или Т-клеточного рецептора (TcR); антитело huCD3 ингибирует связывание мышиного моноклонального антитела ОКТ3

против человеческого белка с Т-лимфоцитами; или антитело huCD3 связывает эпитоп CD3, который полностью или частично включает в себя аминокислотную последовательность EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO:21). Антитела huCD3 по изобретению конкурируют с мышинным антителом против CD3 ОКТЗ за связывание с CD3, и воздействие антитела huCD3 удаляет или маскирует CD3 и/или TcR без воздействия на экспрессию на клеточной поверхности CD2, CD4 или CB8. Маскировка CD3 и/или TcR приводит к потере или снижению активации Т-клеток, что требуется при аутоиммунных заболеваниях, где происходит бесконтрольная активация Т-клеток. Отрицательная регуляция CD3 приводит к пролонгированному эффекту сниженной активации Т-клеток, например, на период, по меньшей мере, нескольких месяцев, по сравнению с преходящей супрессией, наблюдаемой с использованием традиционного иммуносупрессорного агента, например циклоспорина.

Антигенное модулирование относится к перераспределению и элиминации комплекса CD3-Т-клеточный рецептор на поверхности клетки, например лимфоцита. Снижение уровня экспрессии на клеточной поверхности или активности TcR на клетки означает, что количество или функция TcR снижены. Модулирование уровня экспрессии на клеточной поверхности или активности CD3 означает, что количество CD3 на клеточной поверхности или функция CD3 изменена, например снижена. Количество CD3 или TcR, экспрессированного на плазматической мембране клетки, снижается, например, интернализацией CD3 или TcR после контакта клетки с антителом huCD3. Альтернативно, после контакта клетки с антителом huCD3 CD3 или TcR маскируются.

Ингибирование связывания мышинного моноклонального антитела ОКТЗ против человеческого белка с Т-лимфоцитом определяется снижением способности мышинного антитела ОКТЗ образовывать комплекс с CD3 на клеточной поверхности Т-лимфоцита.

Антитело huCD3 содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 6, 10 или 22, и вариабельный домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 8, 16-20 или 25-26. Предпочтительно, три CDR тяжелой цепи включают в себя аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 92, 95, 97 98, 99% или более идентичности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из GYGMH (SEQ ID NO: 27); VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28); QMGYWHFDL (SEQ ID NO:29); SYGMH (SEQ ID NO:33); IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO:34); GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35) и AIWYNGRKQDYADSVKG (SEQ ID NO:44), и три CDR легкой цепи включают в себя аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентичности в отношении последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30); DASNRAT (SEQ ID NO:31); QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32); RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 36); GASSRAT (SEQ ID NO: 37); QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); YASSLQS (SEQ ID NO: 40); QQYYSTLT (SEQ ID NO:41); DASSLGS (SEQ ID NO: 42); WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43); QQRSNWPWT (SEQ ID NO:45); DASSLES (SEQ ID NO: 46) и QQFNSTPIT (SEQ ID NO: 47). Антитело связывает CD3.

Антитело huCD3 по изобретению характеризуется по меньшей мере двумя или более (т.е. двумя или более, тремя или более, четырьмя или более, пятью или более, шестью или более, семью или более, восемью или более, девятью или более, десятью или более, одиннадцатью или более) из следующих характеристик: антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи (V_H), кодируемую генной последовательностью человеческой зародышевой линии DP50 V_H или последовательностью нуклеиновой кислоты, гомологичной генной последовательности человеческой зародышевой линии DP50 V_H ; антитело содержит вариабельную область легкой цепи (V_L), кодируемую генной последовательностью человеческой зародышевой линии L6 V_L или последовательностью нуклеиновой кислоты, гомологичной генной последовательности человеческой зародышевой линии L6 V_L ; антитело содержит V_L , кодируемую генной последовательностью человеческой зародышевой линии L4/18a V_L или последовательностью нуклеиновой кислоты, гомологичной генной последовательности человеческой зародышевой линии L4/18a V_L ; антитело включает в себя область CDR1 V_H , содержащую аминокислотную последовательность YGMH (SEQ ID NO: 58); антитело включает в себя область CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность DSVKG (SEQ ID NO: 59); область CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность IWYX₁GX₂X₃X₄X₅YX₆DSVKG (SEQ ID NO: 60); область CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность X_AX_BGYX_CX_DFDX_E (SEQ ID NO: 61); область CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 62) или аминокислотную последовательность QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 63); антитело включает в себя аминокислотную последовательность VTVSS (SEQ ID NO: 64) в положении, которое является С-концевым по отношению к CDR3-области, где положение, которое является С-концевым по отношению к CDR3-области, входит в вариабельную область; антитело включает в себя аминокислотную последовательность GTLVTVSS (SEQ ID NO: 65) в положении, которое является С-концевым по отношению к CDR3-области, где положение, которое является С-концевым по отношению к CDR3-области, входит в вариабельную область; антитело включает в себя аминокислотную последовательность WGRGTLTVSS (SEQ ID NO: 66) в положении, которое является С-концевым по отношению к CDR3-области, где положение, которое является С-концевым по отношению к CDR3-области, входит в вариабельную область; антитело связывается с эпитопом, который час-

точно или полностью включает в себя аминокислотную последовательность EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67); и антитело включает в себя мутацию в тяжелой цепи в аминокислотном остатке в положении 234, 235, 265 или 297 или в их сочетаниях, и где высвобождение цитокинов из Т-клетки в присутствии указанного антитела снижено по сравнению с высвобождением цитокинов из Т-клетки в присутствии антитела, которое не включает в себя мутацию в тяжелой цепи в положении 234, 235, 265 или 297, или в их комбинации. Нумерация описанных здесь остатков тяжелой цепи соответствует индексу EU (см. Kabat et al., "Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health & Human Services (1983)), как показано, например, в патентах США № 5624821 и 5648260, содержание которых полностью включено сюда в качестве ссылки.

В некоторых аспектах антитело huCD3 содержит мутацию аминокислот. Мутация находится в константной области. Мутация приводит к образованию антитела, которое имеет измененную эффекторную функцию. Эффекторная функция антитела изменена путем изменения, т.е. повышения или снижения сродства антитела в отношении эффекторной молекулы, такой как Fc-рецептор или компонента комплемента. За счет изменения эффекторной функции антитела возможно контролировать различные аспекты иммунного ответа, например усиление или подавление различных реакций иммунной системы. Например, мутация приводит к получению антитела, которое способно снижать высвобождение цитокина из Т-клетки. Например, мутация происходит в тяжелой цепи в аминокислотном остатке 234, 235, 265 или 297 или в их комбинации. Предпочтительно, мутация приводит к появлению остатка аланина в положении 234, 235, 265 или 297, или остатка глутаминовой кислоты в положении 235, или их комбинации. Термин «цитокин» относится ко всем человеческим цитокинам, известным в данной области, которые связывают внеклеточные рецепторы, экспрессированные на клеточной поверхности, и за счет этого модулируют функцию клетки, включая в качестве неограничивающих примеров IL-2, IFN-гамма, TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13.

Высвобождение цитокинов может приводить к токсичному состоянию, известному как синдром высвобождения цитокинов (CRS), обычному клиническому осложнению, которое происходит, например, при использовании антитела против Т-клеток, такого как ATG (антитимоцитарный глобулин) и ОКТЗ (мышинное антитело против человеческого CD3). Данный синдром характеризуется интенсивным высвобождением цитокинов, таких как TNF, IFN-гамма и IL-2 в циркуляторное русло. CRS происходит в результате одновременного связывания антител с CD3 (посредством вариабельной области антитела) и с Fc-рецепторами и/или рецепторами комплемента (через константную область антитела) на других клетках, с активацией за счет этого Т-клеток с высвобождением цитокинов, которые продуцируют системный воспалительный ответ, характеризующийся гипотензией, повышенной температурой и ознобом. Симптомы CRS включают в себя лихорадку, озноб, тошноту, рвоту, гипотензию и одышку. Таким образом, антитело huCD3 по изобретению содержит одну или несколько мутаций, которые предотвращают опосредованное константной областью тяжелой цепи высвобождение одного или нескольких цитокинов *in vivo*.

Полностью человеческие антитела против CD3 по изобретению включают в себя, например, мутацию $L^{234} L^{235} \rightarrow A^{234} E^{235}$ в Fc-области, так что высвобождение цитокинов после воздействия антитела huCD3 значительно снижено или отменено (см., например, фиг. 11A, 11B). Как описано ниже в примере 4, мутация $L^{234} L^{235} \rightarrow A^{234} E^{235}$ в Fc-области антител huCD3 по изобретению снижает или отменяет высвобождение цитокинов там, где антитела huCD3 воздействуют на лейкоциты человека, в то время как мутации, описанные ниже, поддерживают значительную способность к высвобождению цитокинов. Например, значительное снижение в высвобождении цитокинов определяется сравнением высвобождения цитокинов после воздействия антитела huCD3, имеющего мутацию $L^{234} L^{235} \rightarrow A^{234} E^{235}$ в Fc-области, до уровня высвобождения цитокинов после воздействия другого антитела против CD3, имеющего одну или несколько описанных здесь мутаций. Другие мутации в Fc-области включают в себя, например, $L^{234} L^{235} \rightarrow A^{234} A^{235}$, $L^{235} \rightarrow E^{235}$, $N^{297} \rightarrow A^{297}$ и $D^{265} \rightarrow A^{265}$.

Альтернативно, антитело huCD3 кодируется нуклеиновой кислотой, которая включает в себя одну или несколько мутаций, которые замещают остаток нуклеиновой кислоты остатком нуклеиновой кислоты зародышевой линии. Под «остатком нуклеиновой кислоты зародышевой линии» подразумевается остаток нуклеиновой кислоты, который имеется в природе в гене зародышевой линии, кодирующем константную или вариабельную области. «Ген зародышевой линии» представляет собой ДНК, находящуюся в зародышевой клетке (т.е. клетке, которой суждено стать яйцеклеткой или сперматозоидом). «Мутация зародышевой линии» относится к наследуемому изменению конкретной ДНК, которое происходит в зародышевой клетке или в зиготе на стадии единичной клетки, и затем переносится на потомство, например мутация вводится в каждую клетку организма. Мутация зародышевой линии является противоположностью соматической мутации, которая приобретает единичной клеткой организма. В некоторых случаях нуклеотиды в последовательности ДНК зародышевой линии, кодирующей вариабельную область, мутированы (т.е. имеют соматическую мутацию) и замещены другим нуклеотидом. Таким образом, антитела по изобретению включают одну или несколько мутаций, которые замещают нуклеиновую кислоту остатком нуклеиновой кислоты зародышевой линии. Гены антитела зародышевой линии вклю-

чают, например, DP50 (инвентарный номер: IMG/EMBL/GenBank/DBJ:L06618) , L6 (инвентарный номер: IMG/EMBL/GenBank/DBJ:X01668) и L4/18a (инвентарный номер: EMBL/GenBank/DBJ:Z00006).

Тяжелая цепь антитела huCD3 происходит из гена V (вариабельной цепи) зародышевой линии, такого как, например, ген зародышевой линии DP50. Последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности для гена зародышевой линии DP50 включают, например, последовательности нуклеиновой кислоты и аминокислотные последовательности, показанные ниже:

```

tgattcatgg agaatagag agactgagtg tgagtgaaca tgagtgagaa aaactggatt
tggtgggcat tttctgataa cgggtgcctt ctgtttgag gtgtccagtg tcaggtgcag
ctggtggagt ctgggggagg cgtggtccag cctgggaggt cctgagact ctctgtgca
gcgtctggat tcaccttcag tagctatggc atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag
gggctggagt ggggtggcagt tatatgggat gatggaagta ataaatacta tgcagactcc
gtgaagggcc gattccatct ctccagagac aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg
aacagcctga gagccgagga cacggctgtg tattactgtg cgagagacac ag (SEQ ID
NO: 68)

```

```

VQCQVQLVES GGGVVQPGRS LRLSCAASGF TFSSYGMHWV RQAPGKGLEW VAVINVDGSN

```

```

KYIADSVKGR FTISRDN SKN TLYLQMNLSR AEDTAVYYCA R (SEQ ID NO: 69)

```

Антитела huCD3 по изобретению включают в себя область вариабельной тяжелой цепи (V_H), кодируемую геномной последовательностью V_H человеческой зародышевой линии DP50. Последовательность гена V_H зародышевой линии DP50 показана, например, в SEQ ID NO: 48 на фиг. 5. Антитела huCD3 по изобретению включают в себя область V_H , которая кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80% гомологична в отношении последовательности гена V_H зародышевой линии DP50. Предпочтительно, последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере на 90, 95, 96, 97% гомологична в отношении последовательности гена V_H зародышевой линии DP50 и более предпочтительно по меньшей мере 98, 99% гомологична в отношении последовательности гена зародышевой линии V_H DP50. V_H -область антитела huCD3 имеет по меньшей мере 80% гомологии в отношении аминокислотной последовательности V_H -области, кодируемой последовательностью гена V_H зародышевой линии DP50. Предпочтительно, аминокислотная последовательность V_H -области антитела huCD3 имеет по меньшей мере 90, 95, 96, 97% гомологии в отношении аминокислотной последовательности V_H -области, кодируемой последовательностью гена V_H зародышевой линии DP50 и более предпочтительно по меньшей мере 98, 99% гомологии в отношении последовательности, кодируемой последовательностью гена V_H зародышевой линии DP50.

Антитела huCD3 по изобретению также включают в себя вариабельную область легкой цепи (V_L), кодируемую последовательностью гена V_L человеческой зародышевой линии L6 или L4/18a. Последовательность гена V_L человеческой зародышевой линии L6 показана, например, в SEQ ID NO: 74 на фиг. 6, и последовательность гена V_L человеческой зародышевой линии L4/18a показана, например, в SEQ ID NO: 53 на фиг. 7. Альтернативно, антитела huCD3 включают в себя V_L -область, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80% гомологична в отношении последовательности гена V_L человеческой зародышевой линии L6 или L4/18a. Предпочтительно, последовательность нуклеиновой кислоты имеет по меньшей мере 90, 95, 96, 97% гомологии в отношении последовательности гена V_L зародышевой линии L6 или L4/13a и более предпочтительно по меньшей мере 98, 99% гомологии в отношении последовательности гена V_L зародышевой линии L6 или L4/18a. V_L -область антитела huCD3 имеет по меньшей мере 80% гомологии в отношении аминокислотной последовательности V_L -области, кодируемой последовательности гена V_L зародышевой линии L6 или L4/18a. Предпочтительно, аминокислотная последовательность V_L -области антитела huCD3 имеет по меньшей мере 90%, 95%, 96%, 97% гомологии в отношении аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью гена V_L зародышевой линии L6 или L4/18a и более предпочтительно по меньшей мере 98, 99% гомологии в отношении последовательности, кодируемой последовательностью гена V_L зародышевой линии L6 или L4/18a.

Антитела huCD3 по изобретению имеют, например, частично консервативные аминокислотные последовательности, которые происходят из зародышевой линии DP50. Например, область CDR1 антител huCD3 по изобретению имеет, по меньшей мере, непрерывную аминокислотную последовательность YGMH (SEQ ID NO: 58).

CDR2 антител huCD3 включает в себя, например, по меньшей мере, непрерывную аминокислотную последовательность DSVKG (SEQ ID NO: 59). Например, область CDR2 включает в себя непрерывную аминокислотную последовательность IWYX₁GX₂X₃X₄X₅YX₆DSVKG (SEQ ID NO: 60), в которой X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ и X₆ представляют собой любую аминокислоту. Например, X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой гидрофильные аминокислоты. В некоторых антителах huCD3 по изобретению X₁ представляет собой аспарагин или аспарагиновую кислоту, X₂ представляет собой аргинин или серию, X₃ представляет собой лизин или аспарагин, X₄ представляет собой лизин или глутамин, X₅ представляет собой аспарагиновую кислоту, аспарагин или тирозин и/или X₆ представляет собой валин или аланин. Например, область CDR2 V_H включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AIWYNGRQDYADSVKG (SEQ ID NO: 69), IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 70),

VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 71) и VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 72).

Область CDR3 антител huCD3 содержит, например, по меньшей мере одну непрерывную аминокислотную последовательность $X_A X_B G Y X_C X_D F D X_E$ (SEQ ID NO: 61), в которой X_A , X_B , X_C , X_D и X_E представляют собой любую аминокислоту. В некоторых антителах huCD3 по изобретению X_A и X_B представляют собой нейтральные аминокислоты, X_D представляет собой ароматическую аминокислоту и/или X_E представляет собой гидрофильную аминокислоту. Например, X_A представляет собой глицин или глутамин, X_B представляет собой треонин или метионин, X_C представляет собой аспарагин или триптофан, X_D представляет собой триптофан или гистидин и/или X_E представляет собой пролин или лейцин. Например, область CDR3 включает в себя непрерывную аминокислотную последовательность GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 62) или непрерывную аминокислотную последовательность QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 63).

Антитела huCD3 включают в себя каркасную область 2 (FRW2), которая содержит аминокислотную последовательность WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 73). Антитела huCD3 по изобретению включают в себя каркасную область 3 (FRW3), которая содержит аминокислотную последовательность RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 74).

Некоторые антитела huCD3 включают в себя непрерывную аминокислотную последовательность VTVSS (SEQ ID NO: 64) в положении, которое находится с С-конца относительно CDR3-области. Например, антитело содержит непрерывную аминокислотную последовательность GTLVTSS (SEQ ID NO: 65) в положении, которое находится с С-конца относительно CDR3-области. Другие антитела huCD3 включают в себя непрерывную аминокислотную последовательность WGRGTLVTSS (SEQ ID NO: 66), в положении, которое находится с С-конца относительно CDR3-области. Остаток аргинина в SEQ ID NO: 66 показан, например, в последовательностях V_H антитела huCD3 28F11 (SEQ ID NO: 2) и антитела huCD3 23F10 (SEQ ID NO: 6).

В другом аспекте антитело относится к способам лечения, профилактики или ослабления симптома, связанного с иммунитетом нарушения путем введения субъекту антитела huCD3. Субъекту необязательно далее вводят второе средство, неограничивающими примерами которого являются противовоспалительные соединения и иммунодепрессанты. Например, субъектам с диабетом I типа или с латентным аутоиммунным диабетом взрослых (LADA) также вводят второе средство, например GLP-1 или соединение покоящихся бета-клеток (т.е. соединение, которое снижает или иначе ингибирует высвобождение инсулина, например соединение, открывающее калиевые каналы).

Подходящие соединения включают в качестве неограничивающих примеров метотрексат, циклоспорин А (включая, например, микроэмульсию циклоспорина), такролимус, кортикостероиды, статины, интерферон-бета, ремикад (инфликсимаб), энбрел (этанерцепт) и гумиру (адалимумаб).

Данный субъект страдает или предрасположен к развитию связанного с иммунитетом нарушения, такого как, например, аутоиммунного заболевания или воспалительного нарушения.

В другом аспекте изобретение относится к способам введения антитела huCD3 по изобретению субъекту перед, во время и/или после трансплантации органа или ткани. Например, антитело huCD3 по изобретению применяют для лечения или профилактики отторжения после трансплантации органа или ткани.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 является серией представлений нуклеотидной последовательности и аминокислотных последовательностей переменных областей легкой цепи и переменных областей тяжелой цепи антитела huCD3 28F11. На фиг. 1А показана нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область тяжелой цепи, а фиг. 1В представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 1А, где CDR выделены прямоугольниками. На фиг. 1С показана нуклеотидная последовательность, кодирующая переменную область легкой цепи, а фиг. 1D представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 1С, где CDR выделены прямоугольниками.

Фиг. 2 является серией представлений нуклеотидной последовательности и аминокислотных последовательностей переменной области легкой и тяжелой цепи антитела huCD3 23F10, причем фиг. 2А представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, фиг. 2В представляет аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 2А, фиг. 2С представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи, и фиг. 2D представляет аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 2С.

Фиг. 3 является серией представлений нуклеотидной последовательности и аминокислотных последовательностей переменной области легкой и тяжелой цепи антитела huCD3 27H5. Фиг. 3А представляет нуклеотидную последовательность переменной области тяжелой цепи; фиг. 3В представляет аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 3А; фиг. 3С представляет пять нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменную область легкой цепи для клона 27H5; фиг. 3D представляет пять аминокислотных последовательностей, кодируемых нуклеотидными последовательностями, показанными на фиг. 3С; и фиг. 3Е представляет собой

выравнивание пяти легких цепей из клона 27H5, где звездочка (*) в последнем ряду (отмеченная KEY) представляет консервативную аминокислоту в данном столбце; двоеточие (:) в строке KEY представляет консервативную мутацию; и точка (.) в строке KEY представляет полуконсервативную мутацию.

Фиг. 4 является серией представлений нуклеотидной последовательности и аминокислотных последовательностей вариательной области легкой и тяжелой цепи антитела huCD3 15C3, причем фиг. 4А представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую вариательную область тяжелой цепи, фиг. 4В представляет аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 4А, фиг. 4С представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую вариательную область легкой цепи для клона 15C3, и фиг. 4D представляет аминокислотную последовательность, кодируемую нуклеотидной последовательностью, показанной на фиг. 4С.

Фиг. 5 представляет собой выравнивание, отображающее вариательные области тяжелой цепи антител huCD3 15C3, 27H5 и 28F11, а также последовательность зародышевой линии DP-50, соединительную последовательность человеческой тяжелой цепи 5-02 и соединительную последовательность человеческой тяжелой цепи 2. Для каждой последовательности показаны области CDR.

Фиг. 6 представляет собой выравнивание, отображающее вариательные области V_KIII 15C3 (вариательная легкая цепь 1, т.е. «VL1») и антитела huCD3 28F11, а также последовательность зародышевой линии L6, человеческую соединительную последовательность каппа 4 и человеческую соединительную последовательность каппа 1. Для каждой последовательности обозначены области CDR.

Фиг. 7 представляет собой выравнивание, отображающее вариательные области V_KI 15C3 (вариательная легкая цепь 1, т.е. «VL2») и VL2 антитела huCD3 27H5, а также последовательность зародышевой линии L4/18a, человеческую соединительную последовательность каппа 4 и человеческую соединительную последовательность каппа 5. Для каждой последовательности обозначены области CDR.

Фиг. 8 представляет собой выравнивание, отображающее вариательные области V_KII антитела huCD3 VL1 27H5 и DPK22, а также человеческую соединительную последовательность каппа 5. Для каждой последовательности обозначены области CDR.

Фиг. 9А представляет собой график, на котором показано связывание молекул CD3 на поверхности клеток Jurkat с использованием различных антител против CD3, включая антитела huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 и 15C3VL2 по изобретению. Фиг. 9В представляет собой график, на котором показана способность различных антител против CD3, включая антитела huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 и 15C3VL2 по изобретению, ингибировать связывание мышиного антитела против CD3 ОКТ3 с CD3-положительными клетками. Фиг. 9С представляет собой график, на котором показано антигенное модулирование CD3 и TCR с поверхности человеческих Т-клеток периферической крови различными антителами против CD3, включая антитела huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 и 15C3VL2 по изобретению. Фиг. 9D представляет собой график, на котором показан эффект различных антител против CD3, включая антитела huCD3 28F11, 27H5VL1, 27H5VL2, 15C3VL1 и 15C3VL2 по изобретению на пролиферацию Т-клеток.

Фиг. 10 представляет собой иллюстрацию, на которой показан профиль связывания полностью человеческого моноклонального антитела 28F11 с пептидным чипом, происходящим из аминокислотной последовательности CD3-эпсилон.

Фиг. 11 представляет собой серию графиков, на которых показан уровень высвобождения цитокинов после воздействия антитела huCD3 дикого типа 28F11 (28F11WT), мутантного антитела huCD3 28F11, имеющего мутацию L²³⁴ L²³⁵→A²³⁴ A²³⁵ (28F11AA), и мутантное антитело huCD3 28F11, имеющее мутацию L²³⁴ L²³⁵→A²³⁴ E²³⁵ (28F11AE). На фиг. 11А показан уровень высвобождения TNF-альфа после воздействия данных антител, а фиг. 11В обозначает уровень высвобождения интерферона-гамма.

Подробное описание

Настоящее изобретение относится к полностью человеческим моноклональным антителам, специфичным в отношении эпсилон-цепи CD3 (CD3ε). Антитела соответственно обозначаются здесь как антитела huCD3.

CD3 представляет собой комплекс по меньшей мере из пяти мембраносвязанных полипептидов в зрелых Т-лимфоцитах, которые нековалентно ассоциированы друг с другом и с Т-клеточным рецептором. Комплекс CD3 включает в себя цепи гамма, дельта, эпсилон, зета и эта (также обозначенные как субъединицы). Не относящиеся к человеку моноклональные антитела были разработаны против некоторых из данных цепей, например мышиные антитела ОКТ3, SP34, UCHT1 или 64.1. (см., например, June, et al., J. Immunol. 136: 3945-3952 (1986); Yang, et al., J. Immunol. 137: 1097-1100 (1986); и Hayward, et al., Immunol. 64:87-92 (1988)).

Антитела huCD3 по изобретению продуцировали путем иммунизации трансгенных мышей двух линий, мышей HuMabTM и мышей KMTM (Medarex, Princeton, Нью-Джерси).

Антитела huCD3 по изобретению имеют одну или несколько следующих характеристик: антитело связывается с CD3-положительными (CD3+) клетками, но не с CD3-отрицательными (CD3-) клетками; антитело huCD3 индуцирует антигенную модуляцию с вовлечением изменений уровня экспрессии на клеточной поверхности CD3 или Т-клеточного рецептора (TCR) или антитело huCD3 ингибирует связы-

вание мышиноного моноклонального антитела ОКТЗ против человеческого белка с Т-лимфоцитами. Антитела huCD3 по изобретению конкурируют с мышинным антителом против CD3 ОКТЗ за связывание с CD3, и воздействие на антитело huCD3 удаляет или маскирует CD3 и/или TcR без воздействия на экспрессию на клеточной поверхности CD2, CD4 или CD8. Маскировка CD3 и/или TcR приводит к потере или снижению активации Т-клеток.

Антитела huCD3 по изобретению связываются с CD3, который полностью или частично включает в себя аминокислотные остатки от положения 27 до положения 43 процессированной эпсилон-субъединицы человеческого CD3 (т.е. без лидерной последовательности). Аминокислотная последовательность эпсилон-субъединицы человеческого CD3 показана, например, в инвентарных номерах GenBank NP_000724; AAA52295; P07766; A32069; CAA27516; и AAN49847. Например, антитело huCD3 связывается с эпитопом CD3, которое полностью или частично включает в себя аминокислотную последовательность EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67). Типовое моноклональное антитело huCD3, которое связывается с данным эпитопом, представляет собой описанное здесь антитело 28F11. Антитело 28F11 включает в себя варируемую область тяжелой цепи (SEQ ID NO:2), кодируемую последовательностью нуклеотидной кислоты, показанной ниже в SEQ ID NO: 1, и варируемую область легкой цепи (SEQ ID NO: 4), кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 3 (фиг. 1A-1D).

Аминокислоты, составляющие определяющие комплементарность области (CDR), установленные Chothia et al. 1989, E. A. Kabat et al., 1991, выделены ниже прямоугольниками (см. также фиг. 1B и 1D и фиг. 5 и 6). (См. Chothia, C, et al., Nature 342: 877-883 (1989); Kabat, EA, et al., Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)). CDR тяжелой цепи антитела 28F11 имеют следующие последовательности: GYGMH (SEQ ID NO: 27), VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28) и QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 29). CDR легкой цепи антитела 28F11 имеют следующие последовательности: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30) DASNRAT (SEQ ID NO: 31) и QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32).

>28F11 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO:1)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
 CTCCTGTGCAGCGTCTGGATCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
 STCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATAC
 TATGTAGACTCCGTGAAGGCGCTTCCACATCTCCAGAGACAATCCAAGAACAGCT
 GTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAC
 AAATGGGCTACTGGCACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

>28F11 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:2)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFS[GYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[VIWYDGSKKY]
 [YVDSVKG]RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAR[QMGYWHFDL]WGRGTLTVTVSS

>28F11 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO:3)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC
 CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA
 GCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA
 GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTT
 TCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Антитело 23F10 включает варируемую область тяжелой цепи (SEQ ID NO:6), кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной ниже в SEQ ID NO: 5, и варируемую область легкой цепи (SEQ ID NO: 8), кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной в SEQ ID NO: 7.

Аминокислоты, составляющие определяющие комплементарность области (CDR), установленные Chothia et al. 1989, E. A. Kabat et al., 1991, выделены ниже прямоугольниками (см. также фиг. 2B, 2D). CDR тяжелой цепи антитела 23F10 имеют следующие последовательности: GYGMH (SEQ ID NO: 27), VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 28) и QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 29). CDR легкой цепи антитела 23F10 имеют следующие последовательности: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30), DASNRAT (SEQ ID NO: 31) и QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32).

23F10 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 5)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCCTGAGACT
 CTCTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
 CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATAC
 TATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGCTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCT
 GTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGGGCAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAC
 AAATGGGCTACTGGCACTTCGATCTCTGGGCGCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCTCA

23F10 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 6)

QVQLVQSGGGVVQSGRSLRLSCAASGFKFS**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**I**WYDGS**KKY**
YVDSV**KGR**RFTISRDNKNTLYLQMN**SL**RGEDTAVYYCAR**Q**MGY**W**HFD**L**WGRGTLVTVSS

23F10 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 7)

GAAATGTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC
 CTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAACAGGGCCACTGGCATCCCA
 GCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA
 GCCTGAAGATTTGCAGTTTATTACTGTCAAGCAGCGTAGCAACTGGCCCTCCGCTCACTT
 TCGGGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

23F10 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 8)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**R**ASQSVSS**SYLA**WYQ**K**PGQAP**R**LLI**Y**DAS**N**RAT**G**I**P**
 ARFSGSGSGTDFTLT**I**SSLEPEDFAVYYC**Q**Q**R**SN**W**P**L**L**T**FGGGTK**V**E**I**K

Антитело 27H5 включает в себя вариабельную область тяжелой цепи (SEQ ID NO:10), кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной ниже в SEQ ID NO: 9, и вариабельную область легкой цепи, выбранную из аминокислотных последовательностей, показанных ниже в SEQ ID NO: 16-20, и кодируемых последовательностями нуклеиновой кислоты, показанными в SEQ ID NO: 11-15. Как описано здесь в примере 2, гибридома одного клона, выделенная из трансгенных мышей HuMAb™, может продуцировать много легких цепей из единичной тяжелой цепи. Каждая продуцируемая комбинация тяжелых или легких цепей тестируется на оптимальное функционирование, как описано в примере 2.

Аминокислоты, составляющие определяющие комплементарность области (CDR), установленные Chothia et al. 1989, E. A. Kabat et al., 1991, выделены ниже прямоугольниками (см. также фиг. 3B, 3D, 5 и 7-8). CDR тяжелой цепи антитела 27H5 имеют следующие последовательности: SYGMH (SEQ ID NO: 33), IWYDGSKKNYADSVK (SEQ ID NO: 34) и GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35). CDR легкой цепи антитела 27H5 имеют следующие последовательности: RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 36); GASSRAT (SEQ ID NO: 37); QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); YASSLQS (SEQ ID NO: 40); QQYYSTLT (SEQ ID NO: 41); DASSLGS (SEQ ID NO: 42); и WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43).

>27H5 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 9)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACT
 CTCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGAAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGG
 CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATATGGTATGATGGAAGTAAAAA
 TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCT
 GTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAG
 GAACTGGGTACAACCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCAACCGTCTCTCA

>27H5 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:

10)

QVQLVESGGGVVQ**P**GRSLRLSCAASG**F**TFR**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**I**WYDGS**KKN**
YADSV**KGR**RFTISRDNKNTLYLQMN**SL**RAEDTAVYYCAR**G**TGYN**W**F**D**P**L**WQ**G**TLVTVSS

>27H5 VL1 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 11)

GAAATGTGTTGACACAGTCTCCACGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCAC
 CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGA
 AACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATC
 CCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT
 GGACCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAAGATATGGTAGCTCACCGATCASCT
 TCGGCCAAGGGACACCACTGGAGATTA

>27H5 VL2 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 12)

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCCCGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
 CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGCGGCAAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
 GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>27H5 VL3 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 13)

GACATCGTATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCCCGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
 CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGGAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGCGGCAAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
 GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>27H5 VL4 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCTGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAAC
 CAGCAAAAGCCCTAAGCTCTTCACTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGCGGCAAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
 GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>27H5 VL5 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 15)

GACATCGAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGCTGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAAC
 CAGCAAAAGCCCTAAGCTCTTCACTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGCGGCAAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGAACCTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCG
 GAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

>27H5 VL1 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:

16)

EIVLTQSPRTELSLSPGERATLSQRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI
 PDRFSGSGSGTDFTLTISRLDPEDFAVYYCQQYGSPTTFGGQTRLEIK

>27H5 VL2 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:

17)

DIEMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYVASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>27H5 VL3 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:

18)

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPKAPKLLIYDASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>27H5 VL4 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:

19)

DIQMTQSPFSLASVGDRTITCRASQGISSSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYVASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>27H5 VL5 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO:

20)

DIEMTQSPFSLASVGDRTITCRASQGISSSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYVASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

Антитело 15C3 включает в себя вариабельную область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 22), кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты, показанной ниже в SEQ ID NO: 21, и вариабельную область

легкой цепи, выбранную из аминокислотных последовательностей, показанных ниже в SEQ ID NO: 25-26 и кодируемых последовательностями нуклеиновой кислоты, показанными в SEQ ID NO: 23-24. Как описано здесь в примере 2, гибрида одного клона, выделенная из трансгенных мышей HuMAb™, может продуцировать много легких цепей из единичной тяжелой цепи. Каждая продуцируемая комбинация тяжелых или легких цепей тестируется на оптимальное функционирование, как описано в примере 2.

Аминокислоты, составляющие определяющие комплементарность области (CDR), установленные Chothia et al. 1989, E. A. Kabat et al., 1991, выделены ниже прямоугольниками (см. также фиг. 4B, 4D и 5-7). CDR тяжелой цепи антитела 15C3 имеют следующие последовательности: SYGMH (SEQ ID NO: 33), AIWYNGRKQDYADSVKVG (SEQ ID NO: 44) и GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35). CDR тяжелой цепи антитела 15C3 имеют следующие последовательности: RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30); DASNRAT (SEQ ID NO: 31); QQRSNWPWT (SEQ ID NO: 45); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); DASSLES (SEQ ID NO: 46); QQFNSTYPIT (SEQ ID NO: 47).

>15C3 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 21)

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCCGGAGGTCCSTGAGACT
CTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACTTCACTAGCTATGGCATGCCTGGGTCCGCCAGG
CTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGCTATATGTTAATGGAAGAAAACAAGAC
TATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCT
GTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGGG
GAATGGGTACAATGGTTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTACCCTCTCCTCA

>15C3 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 22)

QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFS<u>SYGMH</u>WVRQAPGKGLEWVA<u>AIWYNGRKQD</u>
<u>YADSVKGR</u>FTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTR<u>GTGYNWFDP</u>WGQGLVTVSS

>15C3 VL1 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 23)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAAGAGCCAC
CCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAAC
CTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCA
GCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA
GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCCAGCAGCGTAGCAACTGGCCGTGGACGTTCC
GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

>15C3 VL2 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 24)

GCCATCCAGTGCACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTATGAGACAGAGTCA
CATCACTTGGCCGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
CAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCA
TCAAGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACAGTTTAAATAGTTACCCATCACCTTCC
GCCAAGGGACACGACTGGAGATTA

>15C3 VL1 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 25)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC<u>RASQSVSSYLA</u>WYQQKPGQAPRLLIY<u>DASNRAT</u>GIP
ARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYC<u>QQRSNWPWT</u>FGQGTKVEIK

>15C3 VL2 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 26)

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITC<u>RASQGISSALA</u>WYQQKPGKAPKLLIY<u>DASSLES</u>GVP
SRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC<u>QQFNSTYPIT</u>FGQGRLEIK

Антитела huCD3 по изобретению также включают в себя антитела, которые включают переменную аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентична в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, 6, 10 или 22, и/или переменную аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 90, 92, 95, 97, 98, 99% или более идентична в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 8, 16-20 или 25-26.

Альтернативно, моноклональное антитело представляет собой антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и 28F11, 27H5, 23F10 или 15C3.

Кроме определенных иначе случаев, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют значения, которые обычно подразумеваются обычными специалистами в данной области. Далее, кроме случаев, когда контекст требует иного, термины в единственном числе включают в себя множественное число, и термины во множественном числе включают в себя единственное число. В общем, описанные здесь номенклатуры и способы, используемые в связи с клеточной и тканевой культурой, молекулярной биологией и химией белков и олиго- или полинуклеотидов и гибридации, соответствуют хорошо известным и обычно используемым в данной области. Стандартные способы используют для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культуры ткани и трансформации (т.е. электропорации, липофекции). Ферментативные реакции и способы очистки проводят по спецификациям производителя или как это обычно выполняется в данной области и описано здесь. Сле-

дующие способы и процедуры, в общем, проводят обычными способами, хорошо известными в данной области и описанными в различных общих и более специфичных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в данной спецификации. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Описанные здесь номенклатуры, лабораторные процедуры и способы, используемые в связи с аналитической химией, химией органического синтеза, и медицинской и фармацевтической химией, соответствуют хорошо известным и обычно используемым в данной области. Для химического синтеза, химического анализа, получения и доставки фармацевтических препаратов и лечения пациентов используют стандартные способы.

Используемые в соответствии с настоящим описанием следующие термины, кроме указанных иначе случаев, следует понимать как имеющие следующее значение.

Используемый здесь термин «антитело» относится к иммуноглобулиновым молекулам и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулина (Ig), т.е. молекул, которые содержат антигенсвязывающий участок, специфично связывающий антиген (иммунно взаимодействующий с ним). Такие антитела включают в себя в качестве неограничивающих примеров поликлональные, моноклональные, химерные, одноцепочечные, F_{ab} , $F_{ab'}$ и $F_{(ab')_2}$ и экспрессионную библиотеку F_{ab} . Под «специфичным связыванием» и «иммунным взаимодействием» подразумевается, что антитело взаимодействует с одной или несколькими антигенными детерминантами требуемого антигена и не взаимодействует (т.е. не связывается) с другими полипептидами или связывается с ними с намного меньшим сродством ($K_d > 10^{-6}$) с другими полипептидами.

Основная структурная единица антитела, как известно, включает в себя тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну «легкую» (примерно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (примерно 50-70 кДа). N-концевая часть каждой цепи включает в себя варибельную область примерно из 100-110 или более аминокислот, непосредственно ответственных за распознавание антитела. С-концевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь, ответственную за эффекторную функцию. Человеческие легкие цепи классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как мю, дельта, гамма, альфа или эpsilon и определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgA и IgE соответственно. В легких и тяжелых цепях варибельные и константные области соединены «J»-областью размером примерно 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает в себя «D»-область длиной примерно 10 или более аминокислот. В общем, см. *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ea., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Варибельные области каждой пары легкая/тяжелая цепь образуют связывающий участок антитела.

Используемый здесь термин «моноклональное антитело» (MAb) или «композиция моноклонального антитела» относится к популяции молекул антитела, которые содержат молекулы только одного вида антитела, состоящие из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела идентичны в отношении всех молекул популяции. MAb содержат антигенсвязывающий участок, способный к иммунному взаимодействию с конкретным эпитопом антигена, характеризующийся уникальным сродством связывания с ним.

В общем, молекулы антитела, полученные от людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются один от другого природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Конкретные классы имеют также подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Более того, у людей легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

Термин «антигенсвязывающий участок» или «связывающая часть» относится к части иммуноглобулиновой молекулы, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий участок образован аминокислотными остатками N-концевых варибельных («V») областей тяжелых («H») и легких («L») цепей. Три высокодивергентных участка в V-областях тяжелой и легкой цепей, обозначенные как «гиперварибельные области», расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как «каркасные области» или «FR». Таким образом, термин «FR» относится к аминокислотным последовательностям, которые находятся в природе между гиперварибельными областями в иммуноглобулинах и прилегают к ним. В молекуле антитела три гиперварибельных области легкой цепи и три гиперварибельных области тяжелой цепи расположены друг относительно друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связывающего антигена, и три гиперварибельных области каждой из тяжелых и легких цепей обозначены как «определяющие комплементарность области» или «CDR». Нумерация аминокислот каждого домена проводится в соответствии с определениями Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk J. *Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987), Chothia et al. *Nature* 342: 878-883 (1989).

Используемый здесь термин «эпитоп» включает в себя любую белковую детерминанту, способную специфично связываться с иммуноглобулином, scFv или T-клеточным рецептором. Термин «эпитоп» включает в себя любую белковую детерминанту, способную к специфичному связыванию с иммуноглобулином или T-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных группировок молекул, таких как аминокислотные или сахарные боковые цепи, и обычно имеют спе-

цифичные трехмерные структурные характеристики, а также специфичные характеристики заряда. Говорят, что антитело специфично связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; предпочтительно ≤ 100 нМ и наиболее предпочтительно ≤ 10 нМ.

Используемые здесь термины «иммунологическое связывание» и «свойства иммунологического связывания» относятся к нековалентным взаимодействиям того типа, который происходит между иммуноглобулиновой молекулой и антигеном, в отношении которого иммуноглобулин является специфичным. Сила или сродство взаимодействий иммунологического связывания может выражаться в виде константы диссоциации (K_d) взаимодействия, причем более низкая K_d означает более сильное сродство. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов подвергают количественному анализу с использованием способов, хорошо известных в данной области. Один из таких способов включает в себя измерение скорости образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающего участка/антигена, где указанные скорости зависят от концентраций партнеров в комплексе, сродства взаимодействия, геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, «константа скорости прямой реакции» (K_{on}) и «константа скорости обратной реакции» (K_{off}) могут определяться расчетом концентраций и истинных скоростей ассоциации и диссоциации (см. Nature 361:186-87 (1993)). Отношение K_{off}/K_{on} обеспечивает отмену всех параметров, не связанных со сродством, и равно константе диссоциации K_d . (В общем, см. Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Говорят, что антитело по настоящему изобретению специфично связывается с эпитопом CD3, когда равновесная константа связывания (K_d) составляет ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно от ≤ 100 пМ примерно до 1 пМ, что измеряется такими анализами, как анализы связывания радиоактивного лиганда, известные специалистам в данной области.

Специалистам в данной области понятно, что возможно определить без излишнего экспериментирования, имеет ли человеческое моноклональное антитело ту же специфичность, что и человеческое моноклональное антитело по изобретению (например, моноклональное антитело 28F11, 27H5, 23F10 или 15C3) путем установления того, препятствует ли первое связыванию второго с антигенным полипептидом CD3. Если тестируемое человеческое моноклональное антитело конкурирует с человеческим моноклональным антителом по изобретению, что показано снижением связывания человеческого моноклонального антитела по изобретению, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом. Другой путь определения того, имеет ли человеческое моноклональное антитело специфичность человеческого моноклонального антитела по изобретению, состоит в предварительной инкубации человеческого моноклонального антитела по изобретению с антигенным полипептидом CD3, с которым оно обычно взаимодействует, и последующем добавлении тестируемого человеческого моноклонального антитела для определения того, ингибируется ли способность тестируемого человеческого антитела связывать антигенный полипептид CD3. Если тестируемое человеческое моноклональное антитело ингибируется, то, по всей вероятности, оно имеет ту же, или функционально эквивалентную, эпитопную специфичность, что и моноклональное антитело по изобретению.

Различные процедуры, известные в данной области, используются для продукции моноклональных антител, направленных против белка, такого как белок CD3, или против его производных, фрагментов, аналогов, гомологов или ортологов (см., например, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, что включено сюда в качестве ссылки). Полностью человеческие антитела представляют собой молекулы антитела, в которых вся последовательность легкой цепи или тяжелой цепи, включая CDR, происходит из человеческих генов. Такие антитела называются здесь «человеческие антитела» или «полностью человеческие антитела». Человеческие моноклональные антитела получают, например, с использованием процедур, описанных здесь в примере 1. Человеческие моноклональные антитела также получают с использованием способа триомы; способа человеческой В-клеточной гибридомы (см. Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72) и способа EBV-гибридомы для продукции человеческих моноклональных антител (см. Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Человеческие моноклональные антитела могут использоваться и могут продуцироваться с использованием человеческих гибридом (см. Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) или путем трансформации человеческих В-клеток вирусом Эпштейн-Барр in vitro (см. Cole, et al., 1985 In: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Антитела очищают хорошо известными способами, такими как хроматография с использованием белка А или белка G, которые предоставляют в основном фракцию IgG иммунной сыворотки. Впоследствии или специфичный антиген, который относится к искомому иммуноглобулину, или, альтернативно, его эпитоп, может иммобилизоваться на колонке для очистки иммуноспецифичного антитела путем иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов обсуждается, например, D. Wilkinson (The Scientist, опубликовано The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Когда требуется модифицировать антитело по изобретению в плане эффекторной функции, усиливается, например, эффективность антитела в лечении связанных с антителом заболеваний. Например, в

Fc-область вводят остаток(ки) цистеина, обеспечивая таким образом образование дисульфидной связи в данной области. Гомодимерное антитело, полученное таким образом, может характеризоваться улучшенной способностью к интернализации и/или повышенной опосредованной комплементом гибелью клеток и антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) (см. Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992)). Альтернативно, может конструироваться антитело, которое имеет двойные Fc-области и за счет этого могут характеризоваться усиленным лизисом комплемента и способностями ADCC (см. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989)).

Изобретение также относится к F_v , F_{ab} , F_{ab}' и $F(ab')_2$ фрагментам huCD3, к одноцепочечным антителам huCD3, биспецифическим антителам huCD3 и антителам-гетероконъюгатам huCD3.

Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют специфичность связывания по меньшей мере для двух различных антигенов. В настоящем случае необходимо, чтобы одна из связывающих специфичностей соответствовала CD3. Вторая связывающая мишень представляет собой другой антиген, и преимуществом является белок клеточной поверхности, или рецептор, или субъединица рецептора.

Способы получения биспецифических антител известны в данной области. Традиционно, рекомбинантная продукция биспецифических антител основана на совместной экспрессии двух пар иммуноглобулиновой тяжелой цепи/легкой цепи, где тяжелые цепи имеют различную специфичность (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). По причине случайного ассортимента иммуноглобулиновых легких и тяжелых цепей, данные гибридомы (квадромы) продуцируют потенциальную смесь десяти различных молекул антител, из которых только одна имеет правильную биспецифичную структуру. Очистка правильной молекулы обычно выполняется путем стадий аффинной хроматографии. Сходные процедуры описаны в WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993 г., и в Traunecker et al., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

Вариабельные домены антитела с требуемой специфичностью связывания (участки комбинации антитело-антиген) могут подлежать слиянию с последовательностями константного домена иммуноглобулина. Слияние предпочтительно происходит с константными доменами тяжелой цепи иммуноглобулина, включающего в себя по меньшей мере часть шарнира, области CH2 и CH3. Предпочтительно иметь первую константную область (CH1) тяжелой цепи, содержащую участок, необходимый для связывания легкой цепи, присутствующий по меньшей мере в одном из продуктов слияния. ДНК, кодирующие продукты слияния иммуноглобулиновой тяжелой цепи и, если требуется, иммуноглобулиновой легкой цепи, встраивают в отдельные экспрессирующие векторы и совместно трансфицируют в подходящий организм хозяина. Для дальнейших подробностей по получению биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

Согласно другому подходу, описанному в WO 96/27011, поверхность взаимодействия между парой молекул антител может конструироваться с целью максимизации процента гетеродимеров, которые получают из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительная поверхность взаимодействия включает в себя по меньшей мере часть области CH3 константного домена антитела. В данном способе одна или несколько малых аминокислотных боковых цепей поверхности взаимодействия первой молекулы антител замещают более объемными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). Компенсаторные «полости» идентичного или сходного размера, что и крупная(ые) боковая(ые) цепь(и), формируют на поверхности второго антитела замещением крупных аминокислотных боковых цепей на менее объемные (например, аланин или треонин). Это обеспечивает механизм повышения выхода гетеродимера над другими ненужными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, $F_{(ab')_2}$ антител). Способы получения биспецифических антител из фрагментов антител описаны в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены с использованием химического связывания. Brennan et al., *Science* 229: 81 (1985) описывают процедуру, в которой интактные антитела расщепляют протеолитически с образованием $F_{(ab')_2}$ -фрагментов. Данные фрагменты восстанавливают в присутствии образующего комплекс с дитиолом агента арсенита натрия для стабилизации соседних дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидных мостиков. Полученные F_{ab}' фрагменты затем преобразуют в производные динитробензоата (TNB). Одно из производных F_{ab}' -TNB затем преобразуют обратно в F_{ab}' -тиол восстановлением меркаптоэтиламинамином и смешивают с эквимольным количеством другого производного F_{ab}' -TNB с образованием биспецифического антитела. Продуцированные биспецифические антитела могут использоваться в качестве средств для селективной иммобилизации ферментов.

Кроме того, F_{ab}' -фрагменты могут быть непосредственно получены из *E. coli* и химически связаны с образованием биспецифических антител. Shalaby et al. *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) описывают продукцию молекулы полностью гуманизированного биспецифического антитела $F_{(ab')_2}$. Каждый F_{ab}' -фрагмент отдельно секретируется из *E. coli* и подвергался направленному химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Биспецифическое антитело, образованное таким образом, было способно связываться с клетками, гиперэкспрессировавшими рецептор ErbB2 и с нормальными

ми человеческими Т-клетками, а также опосредовать лизисную активность человеческих цитотоксических лимфоцитов против опухолевых клеток-мишеней молочной железы.

Также описаны различные способы получения и выделения биспецифических фрагментов антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела могут продуцироваться с использованием лейциновых застежек. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148 (5):1547-1553 (1992). Пептиды лейциновой застежки из белков Fos и Jun связывали с F_{ab}-частями двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антитела восстанавливали в области шарнира с образованием мономеров и затем обратно окисляли с образованием гетеродимеров антител. Данный способ также может использоваться для продукции гомодимеров антитела. Технология «диатела», описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993), предоставляет альтернативный механизм получения фрагментов биспецифических антител. Данные фрагменты включают в себя тяжелый домен переменной цепи (V_H), связанный с переменной доменом легкой цепи (V_L) линкером, слишком коротким для обеспечения образования пары двух доменов одной цепи. В соответствии с этим, V_H- и V_L-домены одного фрагмента принуждают к образованию пары с комплементарными V_L- и V_H-доменами другого фрагмента, с образованием таким образом двух антигенсвязывающих участков. Другой стратегией получения биспецифических фрагментов антител, о которой имеется сообщение, является применение одноцепочечных димеров Fv (sFv) (см. Gruber et al., *J. Immunol.* 152: 5368 (1994)).

Рассматриваются антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела (Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60 (1991)).

Типовые биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами, по меньшей мере один из которых происходит из белкового антигена по изобретению. Альтернативно, направленное против антигена плечо иммуноглобулиновой молекулы может комбинироваться с плечом, которое связывает триггерную молекулу на лейкоците, такую как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2, CD3, CD28 или B7), или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), например FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), так что механизмы клеточной защиты фокусируются на клетке, экспрессирующей конкретный антиген. Биспецифические антитела также могут использоваться для направления цитотоксических агентов на клетки, которые экспрессируют конкретный антиген. Данные антитела имеют антигенсвязывающее плечо и плечо, которое связывает цитотоксический агент или хелатор радионуклида, например EOTUBE, DPTA, DOTA или TETA. Другое интересное биспецифическое антитело связывает описанный здесь белковый антиген и далее связывает тканевой фактор (TF).

Антитела-гетероконъюгаты также относятся к объему настоящего изобретения. Антитела-гетероконъюгаты составлены из двух ковалентно объединенных антител. Такие антитела, например, предложены для направления клеток иммунной системы на нежелательные клетки (патент США № 4676980) и для лечения инфекции ВИЧ (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Предусмотрено, что антитела могут быть получены *in vitro* с использованием известных в синтетической химии белка способов, включая те, которые включают в себя перекрестно связанные агенты. Например, иммунотоксины могут конструироваться с использованием реакции обмена дисульфидных мостиков или с образованием тиоэфирной связи. Примеры подходящих для этой цели реагентов включают в себя аминоктиолат и метил-4-меркаптобутиримидат и те, что описаны, например, в патенте США № 4676980.

Изобретение также относится к иммуноконъюгатам, включающим в себя антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного, или животного происхождения, или его фрагментов), или радиоактивный изотоп (т.е. радиоактивный конъюгат).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут использоваться, включают в себя цепь А дифтерийного токсина, несвязывающие активные фрагмент дифтерийного токсина, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модекцина, альфасарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Sapaonaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктин, феномицин, эномицин и трикотецены. Для продукции радиоактивно конъюгированных антител доступны различные радионуклиды. Примеры включают в себя ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y и ⁸⁶Re.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с использованием различных бифункциональных агентов для связывания белков, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтиол)пропионат (SPDP), аминоктиолат (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат-HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаровый альдегид), бис-азидо-соединения (такие как бис-(п-азидобензил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-соединения активного фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый иммунотоксин может быть получен, как описано Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). Меченная углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилентриаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) представляет собой типовой хелатирующий агент для конъюгации радионуклида с антителом (см. WO 94/11026).

Специалистам в данной области понятно, что очень разнообразные возможные радикалы могут присоединяться к полученным в результате антителам или к другим молекулам по изобретению (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которого включено сюда в качестве ссылки).

Связывание осуществляется любой химической реакцией, которая будет связывать две молекулы, при том, что антитело и другой радикал сохраняют соответствующую им активность. Данное связывание может включать в себя многие химические механизмы, например ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координатное связывание и образование комплекса. Предпочтительное связывание, однако, является ковалентным. Ковалентное связывание достигается путем прямой конденсации существующих боковых групп или путем внедрения извне молекул-мостиков. Многие бивалентные или поливалентные связывающие агенты могут использоваться в связывании белковых молекул, таких как антитела по настоящему изобретению, с другими молекулами. Например, репрезентативные связывающие агенты могут включать в себя органические соединения, такие как тиоэфиры, карбодиимиды, сульфидные сложные эфиры, диизоцианаты, глутаровый альдегид, диазобензол и гексаметилендиамин. Данный список не предназначен для полного перечисления различных классов связывающих агентов, известных в данной области, но, тем не менее, типичен для более обычных связывающих агентов (см. Killen and Lindstrom, *Jour. Immun.* 133: 1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62: 185-216 (1982); и Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987)). Предпочтительные линкеры описаны в литературе (см., например, Ramakrishnan, S. et al., *Cancer Res.* 44: 201-208 (1984), которые описывают применение MBS (М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир), см. также патент США № 5030719, в котором описано применение галогенированного производного ацетилгидразида, связанного с антителом путем олигопептидного линкера). В частности, предпочтительные линкеры включают в себя: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилокарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., кат.№21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексанат (Pierce Chem. Co., кат.№ 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)пропионамид]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат.№ 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., кат. № 24510), конъюгированный с EDC.

Описанные выше линкеры содержат компоненты, которые имеют различные признаки, что ведет к образованию конъюгатов с отличающимися физико-химическими свойствами. Например, сульфо-NHS-эфиры алкилкарбоксилатов более стабильны, чем сульфо-NHS-эфиры ароматических карбоксилатов. NHS-эфиры, содержащие линкеры, менее растворимы, чем сульфо-NHS-эфиры. Далее, линкер SMPT содержит стерически блокированную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с повышенной стабильностью. Дисульфидные связи в общем менее стабильны, чем другие связи, поскольку дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, что приводит к меньшей доступности конъюгата. Сульфо-NHS, в частности, может усиливать стабильность карбодиимидных связей. Карбодиимидные связи (такие как EDC) при использовании с сульфо-NHS образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем сама по себе карбодиимидная связь.

Используемый здесь термин «выделенный полинуклеотид» означает полинуклеотид геномного происхождения, происхождения из кДНК, или синтетического происхождения, или какую-либо их комбинацию, причем благодаря своему происхождению «выделенный полинуклеотид» (1) не ассоциирован со всем полинуклеотидом, с которым «выделенный полинуклеотид» находится в природе, или его частью, (2) функционально связан с полинуклеотидом, который не связан с ним в природе, или (3) не встречается в природе как часть более длинной последовательности.

Указанный здесь термин «выделенный белок» означает белок, происходящий из кДНК, рекомбинантной РНК, или белок синтетического происхождения, или некоторую их комбинацию, причем благодаря своему происхождению или источнику получения «выделенный белок» (1) не ассоциирован с белками, с которыми он находится в природе, (2) лишен других белков из того же источника, например лишен морских белков, (3) экспрессирован клеткой из другого вида или (4) не встречается в природе.

Термин «полипептид» используется здесь в качестве общего термина для обозначения нативного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Следовательно, нативные белковые фрагменты и аналоги представляют собой виды полипептидного рода. Предпочтительные полипептиды по изобретению включают в себя человеческие иммуноглобулиновые молекулы тяжелой цепи, представленные на фиг. 1В, 2В, 3В и 4В, и иммуноглобулиновые молекулы легкой цепи, представленные на фиг. 1D, 2D, 3D и 4D, а также молекулы антитела, образованные комбинацией, включающей в себя иммуноглобулиновые молекулы тяжелой цепи с иммуноглобулиновыми молекулами легкой цепи, такие как иммуноглобулиновые молекулы легкой цепи каппа, и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

Используемый здесь термин «встречающийся в природе», применяемый к объекту, относится к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может выделяться из источника в природе и которая не была умышленно модифицированной человеком в лаборатории или

иначе, является встречающейся в природе.

Используемый здесь термин «функционально связанный» относится к тому, что положения компонентов, описанных таким образом, находятся в отношениях, позволяющих им функционировать в предназначенной им манере. Контрольная последовательность, «функционально связанная» с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с последовательностями контроля.

Используемый здесь термин «последовательность контроля» относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких последовательностей контроля отличается в зависимости от организма хозяина в прокариотах, причем такие последовательности контроля в общем включают в себя промотор, участок связывания рибосомы, и последовательность терминации транскрипции у эукариот, в общем, такие последовательности контроля включают в себя промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин «последовательность контроля», как подразумевается, включает в себя как минимум все компоненты, присутствие которых существенно для экспрессии и процессинга, и также может включать в себя дополнительные компоненты, присутствие которых предпочтительно, например лидерные последовательности и последовательности партнера слияния.

Указанный здесь термин «полинуклеотид» означает полимерный ряд нуклеотидов по меньшей мере из 10 оснований в длину, рибонуклеотидов, или дезоксирибонуклеотидов, или модифицированной формы каждого типа нуклеотидов. Термин включает в себя одно- или двухцепочечные формы ДНК.

Указанный здесь термин «олигонуклеотид» включает в себя встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды, связанные друг с другом встречающимися в природе и не встречающимися в природе олигонуклеотидными связями.

Олигонуклеотиды представляют собой подмножество полинуклеотидов, в общем включающее в себя в длину 200 оснований или менее. Предпочтительно, олигонуклеотиды составляют от 10 до 60 оснований в длину и наиболее предпочтительно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 оснований в длину. Олигонуклеотиды обычно являются одноцепочечными, например для зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть и двухцепочечными, например для применения в конструкции генного мутанта. Олигонуклеотиды по изобретению представляют собой смысловые или антисмысловые олигонуклеотиды.

Указанный здесь термин «встречающиеся в природе нуклеотиды» включает в себя дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Указанный здесь термин «модифицированные нуклеотиды» включает в себя нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и тому подобным. Указанный здесь термин «олигонуклеотидные связи» включает в себя олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротиоатные, фосфородитиоатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфороанилотиоатные, фосфороаниладатные, фосфороимидатные, и подобные им (см., например, LaPlanche et al. *Nucl. Acids Res.* 14: 9081 (1986); Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.* 106: 6077 (1984); Stein et al. *Nucl. Acids Res.* 16: 3209 (1988); Zon et al. *Anti Cancer Drug Design* 6: 539 (1991); Zon et al. *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. *U. S. Patent No.* 5,151,510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90: 543 (1990)). Олигонуклеотид, если требуется, может включать в себя метку для детекции.

Указанный здесь термин «селективно гибридизоваться» означает детектируемо и специфично связываться. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты по изобретению селективно гибридизуются с цепями нуклеиновой кислоты в условиях гибридизации и отмывки, которые минимизируют ощутимые количества детектируемого связывания с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. Условия высокой жесткости могут использоваться для достижения селективных условий гибридизации, как это известно в данной области и обсуждается здесь. В общем, гомология последовательности нуклеиновой кислоты между полинуклеотидами, олигонуклеотидами и фрагментами по изобретению и интересующей последовательностью нуклеиновой кислоты, составляет по меньшей мере 80% и более, обычно с предпочтительно возрастающими значениями гомологии, равными по меньшей мере 85, 90, 95, 99 и 100%. Две аминокислотные последовательности гомологичны, если имеется частичная или полная идентичность между их последовательностями. Например, 85% гомология означает, что 85% аминокислот идентичны при выравнивании последовательностей на предмет максимального совпадения. Для максимального совпадения последовательностей допускаются пропуски (в одной из двух совпадающих последовательностей) предпочтительно длиной 5 или менее остатков, более предпочтительно 2 или менее остатков. Альтернативно и предпочтительно, две белковые последовательности (или происходящие от них полипептидные последовательности длиной по меньшей мере 30 аминокислот в длину) гомологичны, в применении здесь этого термина, если они имеют коэффициент выравнивания более 5 (в единицах стандартного отклонения), полученный с использованием программы ALIGN с матрицей данных по мутациям и штрафом за пропуск 6 или более (см. Dayhoff, M. O., in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10). Две последовательности или их части более предпочтительно гомологичны, если их аминокислоты идентичны на 50% или более, при оптимальном выравнивании с использованием программы ALIGN.

Используемый здесь термин «соответствует» означает, что полинуклеотидная последовательность

гомологична (т.е. идентична, а не строго эволюционно связана) всей последовательности полинуклеотида сравнения или ее части, или что полипептидная последовательность идентична полипептидной последовательности сравнения. В противоположность этому используемый здесь термин «комплементарен» означает, что комплементарная последовательность гомологична всей последовательности полинуклеотида сравнения или ее части. Для иллюстрации нуклеотидная последовательность «ТАТАС» соответствует последовательности сравнения «ТАТАС» и комплементарна последовательности сравнения «ГТАТА».

Следующие термины используются для описания отношений последовательностей между двумя или более полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями: «последовательность сравнения», «окно сравнения», «идентичность последовательности», «процент идентичности последовательности» и «существенная идентичность». «Последовательность сравнения» представляет собой определенную последовательность, используемую в качестве основы для сравнения последовательности, причем последовательность сравнения может быть подмножеством более длинной последовательности, например сегментом полноразмерной кДНК или геномной последовательности, приведенной в списке последовательностей, или может представлять собой полную последовательность кДНК или геномную последовательность. В общем, последовательность сравнения составляет по меньшей мере 18 нуклеотидов или 6 аминокислот в длину, часто по меньшей мере 24 нуклеотида или 8 аминокислот в длину и часто по меньшей мере 48 нуклеотидов или 16 аминокислот в длину. Поскольку две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности могут каждая (1) включать в себя последовательность (т.е. часть полной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности), которая сходна между двумя молекулами, и (2) могут далее включать в себя последовательность, которая различается между двумя полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями, сравнения последовательностей между двумя (или более) молекулами обычно проводят путем сравнения последовательностей двух молекул в «окне сравнения» для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательности.

Используемый здесь термин «окно сравнения» относится к концептуальному сегменту по меньшей мере 18 следующих друг за другом положений нуклеотидов или 6 аминокислот, в которых полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность может сравниваться с последовательностью сравнения по меньшей мере из 18 следующих друг за другом нуклеотидов или 6 аминокислотных последовательностей, и где часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может включать в себя дополнения, делеции, замены и тому подобное (т.е. пропуски) в количестве 20% или менее по сравнению с последовательностью сравнения (которая не содержит дополнения или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения может проводиться по алгоритму локальной гомологии Smith and Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), по алгоритму гомологичного выравнивания Needleman and Wunsch *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970), по способу поиска сходства Pearson and Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444 (1988), с использованием компьютеризированных реализаций данных алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном обеспечении Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Висконсин), Geneworks или MacVector или путем инспекции и выбирают лучшее выравнивание (т.е. в результате которого получают самый высокий процент гомологии в окне сравнения), сгенерированное различными способами.

Термин «идентичность последовательности» означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности идентичны (т.е. на основе отношения нуклеотида к нуклеотиду или остатка к остатку) в пределах окна сравнения. Термин «процент идентичности последовательности» рассчитывается путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в пределах окна сравнения, с определением числа положений, в которых в обеих последовательностях случается идентичное основание нуклеиновой кислоты (т.е. А, Т, С, G, U или I) или остаток для получения числа совпадающих положений, причем это число делят на общее число положений в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножают результат на 100 с получением процента идентичности последовательности.

Используемый здесь термин «существенная идентичность» означает характеристику полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, где полинуклеотид или аминокислота содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85-процентную идентичность последовательности, предпочтительно идентичность последовательности по меньшей мере от 90 до 95%, более обычно, идентичность последовательности по меньшей мере 99%, по сравнению с последовательностью сравнения в окне сравнения, равно по меньшей мере 18 нуклеотидным (6 аминокислотным) положениям, часто в окне, равно по меньшей мере 24-48 нуклеотидным (8-16 аминокислотным) положениям, где процент идентичности последовательности рассчитывается путем сравнения последовательности сравнения с последовательностью, которая может включать в себя делеции или добавления, составляющие всего 20% или менее от последовательности сравнения в окне сравнения. Последовательность сравнения может представлять собой подмножество более длинной последовательности.

Используемые здесь двадцать обычных аминокислот и их аббревиатуры соответствуют общепринятому применению. См. *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных

аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α,α -двухзамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие необычные аминокислоты также могут быть подходящими компонентами для полипептидов по настоящему изобретению. Примеры необычных аминокислот включают в себя: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N,N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие сходные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В используемой здесь записи полипептида левостороннее направление представляет собой N-концевое направление и правостороннее направление представляет собой C-концевое направление в соответствии со стандартным применением и правилом.

Сходным образом, кроме указанных иначе случаев, левосторонний конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей представляет собой 5'-конец, левостороннее направление двухцепочечных нуклеотидных последовательностей обозначается как 5'-направление. Добавочные последовательности, лежащие в 5' и 3'-направлении от образующихся РНК-транскриптов, обозначаются как области последовательностей направления транскрипции на цепи ДНК, имеющей ту же последовательность, что и РНК, и те из них, которые лежат в 5'-направлении от 5'-конца транскрипта РНК, обозначаются как «вышележащие последовательности», при этом области последовательности на цепи ДНК, имеющие ту же последовательность, что РНК, и находящиеся в 3'-направлении от 3'-конца РНК-транскрипта, обозначаются как «нижележащие последовательности».

По отношению к полипептидам термин «существенная идентичность» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, посредством программ GAP или BEST-FIT с использованием значений веса пропуска по умолчанию характеризуются по меньшей мере 80%-ной идентичностью по последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90%-ной идентичностью по последовательности, более предпочтительно по меньшей мере 95%-ной идентичностью по последовательности и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99%-ной идентичностью по последовательности.

Предпочтительно, положения остатков, которые не идентичны, отличаются консервативными аминокислотными заменами.

Консервативные аминокислотные замены относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, включает в себя глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, включает в себя серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амидосодержащие боковые цепи, включает в себя аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, включает в себя фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, включает в себя лизин, аргинин и гистидин и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, включает в себя цистеин и метионин. Предпочтительные группы консервативных замен аминокислот включают в себя: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминовую кислоту-аспарагиновую кислоту и аспарагин-глутамин.

Как обсуждается здесь, минорные вариации в аминокислотных последовательностях антител или иммуноглобулиновых молекул, как предусматривается, относятся к настоящему изобретению, с обеспечением того, что вариации аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80, 90, 95% и наиболее предпочтительно 99%. В частности, предусматриваются консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены соответствуют тем, которые имеют место в семействе аминокислот, которые относятся к их боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты, в общем, подразделяются на семейства: (1) кислые аминокислоты включают в себя аспарат и глутамат; (2) основные аминокислоты включают в себя лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты включают в себя аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные аминокислоты включают в себя глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают в себя аргинин, аспарагин, аспарат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофильные аминокислоты включают в себя аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают в себя (i) серин и треонин, которые представляют собой семейство алифатических гидроксисодержащих аминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, которые представляют собой амидосодержащее семейство; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые представляют собой алифатическое семейство; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые представляют собой ароматическое семейство.

Например, следует ожидать, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин или сходная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет иметь большого влияния на связывание или свойства полученной в результате молекулы, особенно если замена не вовлекает аминокислоту в каркасном участке. Там, где изменение аминокислоты, приводящее к образованию функционального пептида, может легко определяться путем анализа специ-

фичной активности полипептидного производного. Здесь подробно описаны анализы. Фрагменты или аналоги антител или иммуноглобулиновых молекул могут быть легко получены специалистами в данной области. Предпочтительные N- или C-концы фрагментов или аналогов происходят вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут идентифицироваться сравнением данных нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с доступными общественности или коммерческими базами данных последовательностей. Предпочтительно, используются компьютеризованные способы сравнения для идентификации мотивов последовательности или предсказанных доменов конформации белка, которые имеют место в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы идентификации белковых последовательностей, которые сворачиваются в известные трехмерные структуры. Bowie et al. *Science* 253: 164 (1991). Таким образом, следующие примеры демонстрируют, что специалист в данной области может выявить мотивы последовательности и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных доменов по изобретению.

Предпочтительные аминокислотные замены представляют собой те, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют сродство связывания образования белковых комплексов, (4) изменяют сродство связывания и (5) создают или модифицируют физикохимические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать в себя различные мутеины с последовательностью, отличной от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, единичные или множественные аминокислотные замены (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) могут быть сделаны во встречающейся в природе последовательности (предпочтительно в части полипептида вне домена(ов) межмолекулярных контактов). Консервативная аминокислотная замена существенно не меняет структурных характеристик родительской последовательности (например, заменившая аминокислота не ведет к нарушению спирали, которая имеется в родительской последовательности, или не нарушает другие типы вторичной структуры, которой характеризуется родительская последовательность). Примеры известных в данной области полипептидных вторичных и третичных структур описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature* 354:105(1991).

Используемый здесь термин «полипептидный фрагмент» относится к полипептиду, который имеет N-концевую и/или C-концевую делецию, но где оставшаяся аминокислотная последовательность идентична соответствующим положениям встречающейся в природе последовательности, предсказанной, например, из полноразмерной последовательности кДНК. Фрагменты обычно составляют в длину по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот, предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот, более предпочтительно по меньшей мере 20 аминокислот, обычно по меньшей мере 50 аминокислот и даже более предпочтительно по меньшей мере 70 аминокислот.

Используемый здесь термин «аналог» относится к полипептидам, которые составлены из сегмента длиной по меньшей мере 25 аминокислот, по существу, идентичного в отношении части предсказанной аминокислотной последовательности и имеющего по меньшей мере одно из следующих свойств: (1) специфичное связывание с CD3 в подходящих условиях связывания, (2) способность блокировать соответствующее связывание с CD3 или (3) способность ингибировать рост CD3-экспрессирующих клеток *in vitro* или *in vivo*. Обычно полипептидные аналоги содержат консервативные аминокислотные замены (или добавления или делеции) по отношению к встречающейся в природе последовательности. Аналоги обычно составляют в длину по меньшей мере 20 аминокислот, предпочтительно 50 аминокислот или более, и могут часто по длине соответствовать полноразмерному встречающемуся в природе полипептиду.

Аналоги пептидов обычно используются в фармацевтической промышленности в качестве непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными таковым исходного пептида. Данные типы непептидного соединения называются «пептидные миметики» или «пептидомиметики». Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15: 29 (1986), Veber and Freidinger *TINS* p. 392 (1985); и Evans et al. *J. Med. Chem.* 30: 1229 (1987). Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютеризованного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, которые структурно сходны с используемыми в терапии пептидами, могут применяться для продукции эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. В общем, пептидомиметики структурно сходны с теоретическим полипептидом (т.е. полипептидом, который имеет биохимические свойства или фармакологическую активность), таким как человеческое антитело, но имеют одну или несколько пептидных связей, необязательно замещенных связью, выбранной из группы, состоящей из $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (цис или транс), $-\text{COCH}_2-$, $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2\text{SO}-$, способами, хорошо известными в данной области. Системная замена одной или нескольких аминокислот консенсусной последовательностью D-аминокислотой того же типа (например, D-лизином вместо L-лизина) может использоваться для получения более стабильных пептидов. Кроме того, фиксированные пептиды, содержащие консенсусную последовательность или, по существу, идентичную консенсусу вариацию последовательности, могут генерироваться способами, известными в данной области (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61: 387 (1992)); например добавлением внутреннего цистеинового остатка, способного образовывать внутримолекулярные дисульфидные мостики, которые циклизуют пептид.

Термин «агент» используется здесь для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов.

Используемые здесь термины «метка» или «меченный» относятся к введению детектируемого маркера, например, путем введения радиоактивной аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинных групп, которые могут быть выявлены меченым авидином (например, стрептавидином, содержащим флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может выявляться оптическими или калориметрическими методами). В некоторых ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут использоваться. Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают в себя следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантаниды фосфора), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинные группы, предварительно выявленные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательность пары лейциновых застеек, участки связывания вторичных антител, связывающие металл домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединяются к спейсерным плечам различной длины для снижения потенциального стерического препятствия. Используемый здесь термин «фармацевтическое средство или лекарственное средство» относится к химическому соединению или композиции, способной к индукции требуемого терапевтического эффекта, при надлежащем введении пациенту.

Другие химические термины используются здесь по общепринятому применению в данной области, например, как в *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Термин «антинеопластическое средство» используется здесь для обозначения функционального свойства ингибирования или прогрессии неоплазии у человека, в частности злокачественного (ракового) очага, такого как карцинома, саркома, лимфома или лейкоз. Ингибирование метастазирования часто представляет собой свойство антинеопластического средства.

Используемый здесь термин «по существу, чистый» означает, что указанный вид молекулы является преобладающим присутствующим видом (т.е. на молярной основе он наиболее обилен, чем любой другой вид молекулы в композиции) и предпочтительно, по существу, очищенная фракция представляет собой композицию, в которой указанный вид молекулы составляет по меньшей мере примерно 50% (на молярной основе) от всех присутствующих видов макромолекул.

В общем, по существу, чистая композиция включает в себя более чем примерно 80% всех видов макромолекул, присутствующих в композиции, более предпочтительно более чем примерно 85, 90, 95 и 99%. Наиболее предпочтительно, указанный вид очищен до существенной гомогенности (контаминантные виды не могут детектироваться в композиции общепринятыми способами детекции), при этом композиция состоит, по существу, из одного вида макромолекул.

Термин «пациент» включает собой людей и субъектов ветеринарии.

Человеческие антитела и гуманизация антител

Антитело huCD3 получали, например, путем иммунизации ксеногенных мышей, способных вырабатывать полностью человеческие антитела (см. пример 1). Антитело IgG huCD3 получали, например, путем преобразования антитела IgM анти-CD3, выработанного трансгенными мышами (см. пример 2).

Альтернативно, такое антитело huCD3 получали, например, с использованием способов фагового дисплея, с помощью антител, содержащих только человеческие последовательности. Такие подходы хорошо известны в науке, например описаны в WO 92/0104 7 и патенте США № 6521404, которые включены здесь в виде ссылки. При таком подходе, комбинаторную библиотеку фагов, несущих случайные пары легких и тяжелых цепей, исследовали с использованием естественных или рекомбинантных источников CD3 или их фрагментов.

Изобретение включает в себя способы получения антител huCD3 с помощью процесса, в котором по меньшей мере одна стадия включает в себя иммунизацию трансгенных животных белком CD3 человека. Некоторые из локусов эндогенных тяжелых и/или каппа легких цепей этих ксеногенных животных неспособны к перестройке, необходимой для образования генов, кодирующих иммуноглобулины в ответ на антиген. Кроме того, по меньшей мере один локус тяжелой цепи человека и по меньшей мере один локус легкой цепи человека были стабильно трансфицированы животным. Таким образом, в ответ на введение антигена человеческие локусы перестраивались для выработки генов, кодирующих различные человеческие области, иммуноспецифичные для антигена. После иммунизации, таким образом, ксеногенные мыши вырабатывали В-клетки, которые секретировали полностью человеческие иммуноглобулины.

Различные способы получения ксеногенных животных хорошо известны в науке. Например, см. патенты США № 6075181 и 6150584. Согласно одной стратегии, гены ксеногенного (человеческого) иммуноглобулина с тяжелыми и легкими цепями вводили в зародышевую линию хозяина (например, сперматозоиды или ооциты) и на отдельных стадиях соответствующие гены хозяина делали нефункционирующими путем инактивации с помощью гомологичной рекомбинации. Гены человеческого иммуноглобу-

лина с тяжелыми и легкими цепями реконструировали в соответствующих эукариотических или прокариотических микроорганизмах и полученные в результате фрагменты ДНК вводили подходящему хозяину, например в пронуклеарные или фертильные мышинные ооциты или эмбриональные стволовые клетки. Инактивации локусов эндогенного иммуноглобулина хозяина достигали путем направленного повреждения соответствующих локусов гомологичной рекомбинацией в клетках хозяина, в частности в эмбриональных стволовых клетках или в пронуклеарных или фертильных мышинных ооцитах. Направленное повреждение может включать в себя введение нарушения или делеции в локус-мишень или делецию локуса-мишени в сочетании с введением в локус, например, опознавательного маркера. В случае эмбриональных стволовых клеток образуются химерные животные, происходящие частично из модифицированных эмбриональных стволовых клеток и способные к передаче генетических модификаций в зародышевой линии. Скрещивание хозяев с введенными локусами человеческого иммуноглобулина с линиями с инактивированными эндогенными локусами позволяет получить животных, продуцирующих чисто ксеногенные, например человеческие, антитела.

Согласно альтернативной стратегии по меньшей мере части локусов человеческих иммуноглобулинов с тяжелыми и легкими цепями использовали для замещения непосредственно соответствующих локусов эндогенных иммуноглобулинов путем гомологичной рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках. Это приводило к одновременной инактивации и замещению эндогенного иммуноглобулина. Вследствие этого образовывались химерные животные, у которых клетки, происходящие из эмбриональных стволовых клеток, могли передаваться в зародышевых линиях.

Например, клон В-клеток, экспрессирующий человеческое антитело анти-CD3, выделяли из ксеногенных животных и иммортализовывали в соответствии с различными способами, известными в науке. Эти В-клетки могут быть получены непосредственно из крови животных или из лимфоидных тканей, включающих в себя, но не ограничивающихся ими, селезенку, миндалины, лимфоузлы и костный мозг. В итоге, иммортализованные В-клетки сохраняли и культивировали *in vitro* для получения значительных, клинически применимых количеств антитела huCD3. Альтернативно, гены, кодирующие иммуноглобулины с одним или более различными человеческими областями, могут быть выявлены и экспрессированы в клетках разных типов, включающих в себя, но не ограничивающихся ею, систему культуры клеток млекопитающих, с целью получения непосредственно антител или их отдельных цепей, состоящих из одноцепочечных молекул Fv.

Кроме того, полный набор полностью человеческих антител анти-CD3, выработанных ксеногенными животными, может быть исследован для идентификации одного такого клона с оптимальными характеристиками. Эти характеристики включают в себя, например, сродство связывания с человеческим белком CD3, стабильность взаимодействия, а также изотип полностью человеческого антитела анти-CD3. Клоны из полного набора, имеющие желаемые характеристики, использовали затем как источник нуклеотидных последовательностей, кодирующих различные желаемые участки, для дальнейших манипуляций для получения антител с этими характеристиками в альтернативных системах клеток, с использованием общепринятых рекомбинантных или трансгенных способов.

Эта общая стратегия была продемонстрирована вместе с образованием первых линий Xenomouse™, как опубликовано в 1994 г. См. Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994). Этот подход в дальнейшем обсуждался и использовался в заявках на выдачу патента США 07/466008, поданной 12 января 1990 года, 07/610515, поданной 8 ноября 1990 года, 07/919297, поданной 24 июля 1992 года, 07/922649, поданной 30 июля 1992 года, 08/031801, поданной 15 марта 1993 года, 08/112848, поданной 27 августа 1993 года, 08/234145, поданной 28 апреля 1994 года, 08/376279, поданной 20 января 1995 года, 08/430938, поданной 27 апреля 1995 года, 08/464584, поданной 5 июня 1995 года, 08/464582, поданной 5 июня 1995, 08/463191, поданной 5 июня 1995 года, 08/462837, поданной 5 июня 1995 года, 08/486853, поданной 5 июня 1995 года, 08/486857, поданной 5 июня 1995 года, 08/486859, поданной 5 июня 1995 года, 08/462513, поданной 5 июня 1995 года, 08/724752, поданной 2 октября 1996 года и 08/759620, поданной 3 декабря 1996 года, и в патентах США № 6162963, 6150584, 6114598, 6075181 и 5939598, патентах Японии № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2. См. также Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997) и Green and Jakobovits, J. Exp. Med. 188:483-495 (1998). См. также европейский патент № EP 04 63151 B1, решение о выдаче опубликовано 12 июня 1996, заявку на международный патент № WO 94/02602, опубликованную 3 февраля 1994 года, заявку на международный патент № WO 96/34096, опубликованную 31 октября 1996 года, WO 98/24893, опубликованную 11 июня 1998 года, WO 00/76310, опубликованную 21 декабря 2000 года.

В альтернативном подходе некоторые применяли «минилокусный» способ. При минилокусном способе экзогенный локус Ig мимикрировали путем включения участков (индивидуальных генов) локуса Ig. Таким образом, один или более генов V_H, один или более генов D_H, один или более генов J_H, константную область μ и вторую константную область (предпочтительно область константы гамма) формировали в конструкцию для введения животному. Этот подход описан в патенте США № 5545807, выданном Surani et al., в патентах США № 5545806, 5625825, 5625126, 5633425, 5661016, 5770429, 5789650, 5814318, 5877397, 5874299 и 6255458, каждый выдан Lonberg и Kay, в патентах США № 5591669 и 6023010, выданных Krimpenfort и Berns, в патентах США № 5612205, 5721367 и 5789215, выданных

Berns et al., и в патенте США № 5643763, выданном Choi и Dunn, и в заявках GenPharm International на патент США 07/574748, поданной 29 августа 1990 года, 07/575962, поданной 31 августа 1990 года, 07/810279, поданной 17 декабря 1991 года, 07/853408, поданной 18 марта 1992 года, 07/904068, поданной 23 июня 1992 года, 07/990860, поданной 16 декабря 1992 года, 08/053131, поданной 26 апреля 1993 года, 08/096762, поданной 22 июля 1993 года, 08/155301, поданной 18 ноября 1993 года, 08/161739, поданной 3 декабря 1993 года, 08/165699, поданной 10 декабря 1993 года, 08/209741, поданной 9 марта 1994 года. См. также европейский патент № 0546073 В1, заявки на международный патент № WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и патент США № 5981175. См. далее Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994) и Tuailon et al., (1995), Fishwild et al., (1996).

Преимуществом минилокусного подхода является быстрота, с которой конструкции, включающие в себя порции локуса Ig, могут быть созданы и введены животным. Однако соразмерным и значительным недостатком минилокусного подхода является в теории недостаточное многообразие, представленное при введении малых количеств генов V, D и J. Действительно, опубликованные работы подтверждают это опасение. Развитие В-клеток и продукция антител животными, полученными с использованием минилокусного подхода, представляются недостаточными. Таким образом, исследования, сопутствующие настоящему изобретению, были в основном направлены на введение больших порций локуса Ig с целью достижения большего разнообразия и в стремлении перестроить иммунный спектр животных.

Kirin также показал образование человеческих антител у мышей, которым вводили путем микроклеточного слияния большие участки хромосом или целые хромосомы. См. заявки на европейский патент № 773288 и 843961.

Успешное срабатывание человеческих анти-мышинных антител (НАМА) привело промышленность к производству химерных или иначе гуманизированных антител. Поскольку химерные антитела имеют человеческую константную область и вариабельную иммунную область, ожидается, что у человека будут наблюдаться определенные анти-химерные антительные ответы (НАСА), особенно при длительном применении антител или при применении больших доз антител. Следовательно, было бы желательным получение полностью человеческих антител против CD3 с целью избежать опасений и/или эффектов ответа НАМА или НАСА.

Получение антител со сниженной иммуногенностью также осуществлено через гуманизацию и представляет способы с использованием соответствующих библиотек. Обнаружено, что мышинные антитела или антитела других животных могут быть гуманизированы или приматизированы с использованием способов, хорошо известных в науке. См., например, Winter and Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) и Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Интересующие антитела могут быть созданы способами с использованием рекомбинантной ДНК для замены CH1, CH2, CH3, шарнирного домена и/или скелетного домена с соответствующей человеческой последовательностью (см. WO 92102190 и патенты США № 5530101, 5585089, 5693761, 5693792, 5714350 и 5777085). Также известно в науке использование кДНК Ig для конструирования генов химерного иммуноглобулина (Liu et al., *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) и *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). мРНК изолировали из гибридомы или другой клетки, вырабатывающей антитела, и использовали для получения кДНК. Интересующую кДНК амплифицировали полимеразной цепной реакцией с использованием специфичных праймеров (патенты США № 4683195 и 4683202). Альтернативно, создавали и изучали библиотеку для изолирования интересующей последовательности. Последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область антитела, затем подвергали слиянию с последовательностью человеческой константной области. Последовательности генов человеческих константных областей можно найти в Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of immunological Interest*, N.I.H. публикация № 91-3242. Человеческие гены участка С легкодоступны из известных клонов. Выбор изолированного будет определяться желаемыми эффекторными функциями, такими как фиксация комплекса или активность в клеточной цитотоксичности, зависящей от антител.

Предпочтительными изо типами являются IgG1, IgG3 и IgG4. Может быть использована как каппа, так и лямбда легкая цепь константных областей. Химерное, гуманизированное антитело затем экспрессируют общепринятыми способами.

Фрагменты антител, такие как Fv, F(ab')₂ и Fab, могут быть получены путем расщепления интактного белка, например с помощью протеазы или химическим расщеплением. Альтернативно, может быть создан процессированный ген. Например, химерный ген, кодирующий порцию фрагмента F(ab')₂, может включать в себя последовательности ДНК, кодирующие домен CH1 и шарнирную область цепи H, с последующим трансляционным стоп-кодоном, для получения процессированной молекулы.

Транскрипционные последовательности областей H и L, J могут применяться для создания олигонуклеотидов, использующихся как направляющие для введения полезных сайтов рестрикции в область J для последующего связывания сегментов области V с сегментами области C. Содержащая область C кДНК может быть модифицирована путем направленного мутагенеза сайта для помещения сайта рестрикции в аналогичную позицию человеческой последовательности.

Векторы экспрессии включают в себя плазмиды, ретровирусы, эписомы, происходящие от YAC,

EBV и тому подобное. Подходящим вектором является тот, который кодирует функционально полную последовательность СН или СL человеческого иммуноглобулина с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, что любая последовательность VH или VL-31 может быть легко введена и экспрессирована. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между сайтом-донором сплайсирования в введенной области J и сайтом-акцептором сплайсирования, предшествующим человеческой области C, а также в областях сплайсирования, находящихся в пределах человеческих СН экзонов. Полиаденилирование и окончание транскрипции происходит в естественных хромосомных сайтах ниже кодирующих областей. Полученное в результате химерное антитело может быть присоединено к любому сильному промотору, включающему в себя ретровирусные LTR, например ранний промотор SV-40 (Okayama et al., *Mol. Cell. Bio.* 3:280 (1983)), LTR вирус саркомы Рousa (Gorman et al., *P.N.A.S.* 79:6777 (1982)) и LTR вирус лейкемии мышей Молони (Grosschedl et al. *Cell* 41:885 (1985)). Также, что будет особенно ценно, могут использоваться естественные Ig-промоторы и им подобные.

Далее, человеческие антитела или антитела других животных могут быть получены с использованием способов дисплейного типа, включающих в себя, без ограничения, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомальный дисплей и другие способы, хорошо известные в науке, и полученные молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, такому как созревание сродства, как это хорошо известно в науке. Wright and Harris, выше, Hanes and Plutchau *PEAS USA* 94:4937-4942 (1997) (рибосомальный дисплей), Parmley and Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *PNAS USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty *TIBTECH*; 10:80-8A (1992) и патент США № 5733743. Если дисплейные способы используются для получения антител, не являющихся человеческими, то такие антитела могут быть гуманизированы, как описано выше.

Используя эти способы, могут быть созданы антитела к клеткам, экспрессирующим CD3, самому CD3, формам CD3, их эпитопам или пептидам и, кроме того, к библиотекам экспрессии (см., например, патент США № 5703057), которые затем могут быть исследованы, как описано выше, на активность, как описано выше.

Разработка и создание других лекарств

В соответствии с настоящим изобретением и на основе активности антител, полученных и охарактеризованных здесь в отношении CD3, разработка других способов лечебного воздействия, помимо молекул антител, упрощается. Такие способы воздействия включают в себя, без ограничения, усовершенствованные антителные лекарства, такие как биспецифические антитела, иммунотоксины и радиоактивно меченые лекарства, создание пептидных лекарств, генную терапию, особенно интратела, антисмысловые лекарства и малые молекулы.

Например, в связи с биспецифическими антителами, биспецифические антитела могут быть созданы таким образом, что будут содержать: (i) два конъюгированных антитела: одно со специфичностью к CD3, а другое ко второй молекуле, (ii) одно антитело, имеющее одну цепь, специфичную к CD3, и вторую цепь, специфичную ко второй молекуле, или (iii) одноцепочечное антитело, имеющее специфичность к CD3 и другой молекуле. Такие биспецифические антитела могут быть созданы с использованием хорошо известных способов, например в связи с (i) и (ii), см., Fanger et al., *Immunol Methods* 4:72-81 (1994) и Wright and Harris, выше, а в связи с (iii) см., например, Traunecker et al., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992). В каждом случае вторая специфичность может быть создана к рецепторам активации, относящимся к тяжелым цепям, включающим в себя, без ограничения, CD16 или CD64 (см., например, Deo et al., 18:127 (1997)), или CD89 (см., например, Valerius et al., *Blood* 90:4485-4492 (1997)). Биспецифические антитела, полученные в соответствии с вышеизложенным, будут, вероятно, способны убивать клетки, экспрессирующие CD3, и особенно те клетки, в отношении которых эффективны антитела к CD3 по изобретению.

В связи с иммунотоксинами антитела могут быть модифицированы и применены в способах, использующих иммунотоксины, хорошо известных в науке. См., например, Vitetta *Immunol Today* 14:252 (1993). См. также патент США № 5194594. В связи с получением радиомеченых антител такие модифицированные антитела также легко могут применяться в используемых способах, хорошо известных в науке. См., например, Junghans et al. in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). См. также патенты США № 4681581, 4735210, 5101827, 5102990 (RE 35500), 5648471 и 5697902. Каждый из иммунотоксинов и радиомеченых молекул будут, вероятно, способны убивать клетки, экспрессирующие CD3, и особенно те клетки, в отношении которых эффективны антитела к CD3 по изобретению.

В связи с созданием лекарственных пептидов путем использования структурной информации, относящейся к CD3 и антителам к ним, такими как антитела по изобретению, или исследования пептидных библиотек могут быть созданы лекарственные пептиды, направленные против CD3. Разработка и исследование пептидных лекарств обсуждались также в Houghten et al., *Biotechniques* 13:412-421 (1992), Houghten *PNAS USA* 82:5131-5135 (1985), Pinalla et al., *Biotechniques* 13:901-905 (1992), Blake and Litz-Davis *BioConjugate Chem.* 3:510-513 (1992). Иммунотоксины и радиомеченые молекулы также могут быть получены и способом, сходным с пептидными молекулами, как обсуждалось выше в связи с анти-

телями. Если предположить, что молекула CD3 (или ее форма, такая как сплайсинговый вариант, или альтернативная форма) является функционально активной в процессе заболевания, также представляется возможным разработать генные и, кроме того, бессмысленные лекарства с использованием общепринятых способов. Такие способы воздействия могут применяться для изменения функции CD3. В связи с этим, антитела по настоящему изобретению облегчают разработку и использование соответствующих функциональных анализов, помимо прочего. Разработка и стратегия для бессмысленных лекарств обсуждается в деталях в заявке на международный патент № WO 94/29444. Разработка и стратегии для генной терапии хорошо известны. Однако, в частности, использование способов генной терапии, включающих в себя интрацеллюлярные, могут доказать свои явные преимущества. См., например, Chen et al., *Human Gene Therapy* 5:595-601 (1994) и Marasco, *Gene Therapy* 4:11-15 (1997). Общий подход к разработке и соображения, касающиеся генных лекарств, также обсуждаются в заявке на международный патент № WO 97/38137.

Тщательно изученные сведения по структуре молекулы CD3 и ее взаимодействию с другими молекулами в соответствии с настоящим изобретением, такими как антитела по изобретению, и другими, могут быть использованы для рациональной разработки других терапевтических воздействий. В этом отношении, рациональные способы разработки лекарств, такие как рентгеновская кристаллография, компьютерное молекулярное моделирование (CAMM), способ количественного или качественного соотношения структура-активность (QSAR) и подобные способы, могут применяться для фокусирования усилий по разработке лекарств. Рациональная разработка позволяет предсказывать белковые или синтетические структуры, которые могут взаимодействовать с молекулой или ее специфическими формами, что может быть использовано для изменения активности CD3. Такие структуры могут быть синтезированы химически или экспрессированы в биологических системах. Этот подход был рассмотрен в Carsey et al., *Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs* (Stockton Press, NY (1988)). Далее, могут быть разработаны и синтезированы комбинаторные библиотеки для использования в программах скрининга, таких как высокоэффективные программы скрининга.

Лекарственные формы и введение лекарств

Было бы желательно, чтобы введение лекарственных веществ в соответствии с изобретением происходило с приемлемыми носителями, наполнителями и другими агентами, которые включаются в лекарственную форму для улучшения транспортировки, доставки, переносимости и тому подобного. Множества подходящих лекарственных форм могут быть найдены в справочнике, известном всем фармакологическим химикам: *Remington's Pharmaceutical Sciences* (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), особенно в Части 87, написанной Blaug и Seymour. Эти лекарственные формы включают в себя, например, порошки, пасты, мази, гели, воски, масла, жиры, везикулы, содержащие липиды (катионные или анионные) (такие как Lipofectin™), конъюгаты ДНК, обезвоженные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, карбоваксовые эмульсии (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любые из вышеуказанных смесей могут быть пригодны для лечения в соответствии с настоящим изобретением, обеспечивая то, что активный ингредиент лекарственной формы не инактивируется лекарственной формой, и лекарственная форма является физиологически совместимой и переносимой с учетом пути введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." *Regul. Toxicol Pharmacol.* 32 (2):210-8, Wang W. "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203 (1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." *J Pharm Sci.* 89 (8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations", *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998) и ссылки, приведенные здесь для дополнительной информации, относящейся к лекарственным формам, наполнителям и носителям, хорошо известным фармакологическим химикам.

Терапевтические лекарственные формы по изобретению, которые включают в себя антитела huCD3 по изобретению, использовали для лечения или облегчения симптомов, связанных с иммунными нарушениями, такими, например, как аутоиммунное заболевание или воспалительное нарушение.

Аутоиммунные заболевания включают в себя, например, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД (AIDS), который является вирусным заболеванием с аутоиммунным компонентом), очаговое облысение, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, аутоиммунную болезнь Аддисона, аутоиммунную гемолитическую анемию, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную болезнь внутреннего уха (AIED), аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунную тромбоцитопеническую пурпуру (АТФ), болезнь Бехчета, кардиомиопатию, глютеиновую болезнь; синдром хронической усталости (CFIDS), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD), рубцующий пемфигоид, болезнь холодовой агглютинации, крест-синдром, болезнь Крона, болезнь Дегоса, ювенильный дерматомиозит, дискоидную волчанку, эссенциальную смешанную криоглобулинемию, фибромиалгию-фибромиозит, болезнь Грейвса, синдром Гиллана-Барра, тиреоидит Хашимото, идиопатический легочный фиброз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТФ), IgA-нефропатию, инсулин-зависимый сахарный диабет, ювенильный хронический артрит (болезнь Стилла), ювенильный ревматоидный артрит, болезнь Меньера, спаечную болезнь, множественный склероз, мигастению гравис,

пернициозную анемию, узелковый полиартрит, полихондрит, полигландулярные синдромы, ревматическую полимиалгию, полимиозит и дерматомиозит, первичную агаммаглобулинемию, первичный билиарный цирроз, псориаз, псориатический артрит, феномен Рейнауда, синдром Рейтера, ревматическую лихорадку, ревматоидный артрит, саркоидоз, склеродермию (прогрессирующий системный склероз (PSS), также известный как системный склероз (SS)), синдром Шегрена, синдром Моэраша-Вольфмана, системную красную волчанку, артериит Такаясу, височный артериит/гигантоклеточный артериит, язвенный колит, увеит, витилиго и гранулематоз Вегенера.

Воспалительные нарушения включают в себя, например, хронические и острые воспалительные нарушения. Примеры воспалительных нарушений включают в себя болезнь Альцгеймера, астму, атопическую аллергию, аллергию, атеросклероз, бронхиальную астму, экзему, гломерулонефрит, болезнь «трансплантат против хозяина», гемолитические анемии, остеоартрит, сепсис, инсульт, трансплантации тканей и органов, васкулиты, диабетическую ретинопатию и повреждения легких, вызванные вентиляцией.

В одном варианте осуществления композиции антитела huCD3 по изобретению вводили в сочетании со вторым агентом, таким как, например, GLP-1 или соединениями, ингибирующими бета-клетки (то есть соединениями, которые уменьшают или иным образом ингибируют высвобождение инсулина, такими как активаторы калиевых каналов). Примеры подходящих GLP-1 соединений описаны, например, в опубликованной заявке на патент США 20040037826, а подходящие соединения, ингибирующие бета-клетки, описаны в опубликованной заявке на патент США 20030235583, каждая из которых полностью включена здесь в виде ссылки.

В другом варианте осуществления композиции антитела huCD3, использовавшиеся для лечения нарушений, связанных с иммунитетом, вводили в комбинации с любым из различных известных противовоспалительных и/или иммуносупрессивных соединений. Приемлемые известные соединения включают в себя, но не ограничиваются ими, метотрексат, циклоспорин А (включающий в себя, например, микроэмульсию циклоспорина), такролимус, кортикостероиды, статины, интерферон бета, ремикад (инфликсимаб), энбрел (этанерцепт) и хумира (адалимумаб).

Например, в лечении ревматоидного артрита композиции антитела huCD3 по изобретению могут вводиться совместно с кортикостероидами, метотрексатом, циклоспроином А, статинами, ремикадом (инфликсимабом), энбромом (этанерцептом) и/или хумирой (адалимумабом).

В лечении увеита композиции антитела huCD3 могут вводиться в сочетании, например, с кортикостероидами, метотрексатом, циклоспроином А, циклофосфамидом и/или статинами. Аналогично, пациенты, страдающие такими заболеваниями, как болезнь Крона или псориаз, могут получать лечение комбинацией композиции антитела huCD3 по изобретению с ремикадом (инфликсимабом) и/или хумирой (адалимумабом).

Пациенты с множественным склерозом могут получать комбинацию композиции антитела huCD3 по изобретению в сочетании, например, с ацетатом глатирамера (копаксон), интерфероном бета-1a (авонекс), интерфероном бета-1a (ребиф), интерфероном бета-1b (бетасерон или бетаферон), митоксантроном (новантрон), дексаметазоном (декадрон), метилпреднизолоном (депомедрол) и/или преднизолоном (дельтазон) и/или статинами.

Настоящее изобретение также включает в себя способы лечения или облегчения симптомов, связанных с иммунозависимыми нарушениями, или симптомов, связанных с отторжением после трансплантации органов. Например, композиции по изобретению используют для лечения или облегчения симптомов любых аутоиммунных заболеваний и воспалительных нарушений, описанных здесь.

Терапевтические композиции по изобретению также используют как иммуносупрессивные агенты при трансплантации органа или ткани. Используемый здесь термин "иммуносупрессивный агент" относится к агенту, чье действие на иммунную систему ведет к немедленному или отсроченному снижению активности по меньшей мере одного пути, вовлеченного в иммунный ответ, независимо от того, является ли этот ответ естественным или патологическим, является ли этот ответ частью врожденной иммунной системы, адаптивной иммунной системы или обеих. Эти иммуносупрессивные композиции антитела huCD3 вводят субъекту до, в процессе и/или после трансплантации органа или ткани. Например, антитело huCD3 по изобретению используют в лечении или предотвращении отторжения после трансплантации органа или ткани.

В одном варианте осуществления иммуносупрессивные композиции антитела huCD3 по изобретению вводят в сочетании со вторым агентом, таким как, например, GLP-1 или соединением, ингибирующим бета-клетки, как описано выше.

В другом варианте осуществления эти иммуносупрессивные композиции антитела huCD3 вводят в сочетании с любым из различных известных противовоспалительных и/или иммуносупрессивных соединений. Приемлемые противовоспалительные и/или иммуносупрессивные соединения для использования с антителами huCD3 по изобретению включают в себя, но не ограничиваются ими, метотрексат, циклоспроин А (включающий в себя, например, микроэмульсию циклоспроина), такролимус, кортикостероиды и статины.

В другом варианте осуществления по изобретению, антитело huCD3 вводят человеку при определе-

нии присутствия аутореактивных антител у человека. Такие аутореактивные антитела известны в науке как антитела со сродством связывания к одному или более белкам, экспрессируемым эндогенно в организме человека. В одном аспекте по изобретению человека тестируют на наличие аутореактивных антител, специфично вовлеченных в одно или более аутоиммунное заболевание, как хорошо известно в науке. В одном специальном варианте осуществления человека тестируют на наличие антител против инсулина, декарбоксилазы глутаминовой кислоты и/или белка IA-2, после чего вводят антитело huCD3 при положительном результате определения одного или более таких аутореактивных антител.

В другом варианте осуществления по изобретению антитело huCD3 вводят человеку для предотвращения, уменьшения или снижения рекрутинга иммунных клеток в человеческие ткани. Антитело huCD3 по изобретению вводят субъекту при необходимости предотвращения и лечения состояний, связанных с ненормальным или нерегулируемым рекрутингом иммунных клеток в тканевые области, вовлеченные в заболевание человека.

В другом варианте осуществления по изобретению антитело huCD3 вводят человеку для предотвращения, уменьшения или снижения экстравазации и диапедеза иммунных клеток в человеческие ткани. Таким образом, антитела huCD3 по изобретению вводят для предотвращения и/или лечения состояний, связанных ненормальной или нерегулируемой инфильтрацией иммунных клеток в тканевые области, вовлеченные в заболевание человека.

В другом варианте осуществления по изобретению антитело huCD3 вводят человеку для предотвращения, уменьшения или снижения эффектов, опосредованных высвобождением цитокинов в организме человека. Термин «цитокины» относится ко всем человеческим цитокинам, известным в науке, которые связывают экстрацеллюлярные рецепторы на поверхности клеток и, таким образом, изменяют клеточную функцию и включают в себя, не ограничиваясь ими, IL-2, IFN-g, TNF-a, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 и IL-13.

Высвобождение цитокинов может вести к токсическому состоянию, известному как синдром высвобождения цитокинов (CRS), частое клиническое осложнение, которое развивается, например, при использовании анти-Т-клеточных антител, таких как ATG (анти-тимоцитарный глобулин) и ОКТ3 (мышинное антитело анти-CD3 человека). Этот синдром характеризуется избыточным высвобождением цитокинов, таких как TNF, IFN-гамма и IL-2, в циркуляцию. CRS развивается как результат одновременного связывания антител к CD3 (через различные области антитела) и рецепторов Fc и/или рецепторов комплемента (через константную область антитела) на других клетках, активируя, таким образом, Т-клетки к высвобождению цитокинов, вызывающих системный воспалительный эффект, характеризующийся гипотензией, лихорадкой и слабостью. Симптомы CRS включают в себя жар, ознобы, тошноту, рвоту, гипотензию и диспноэ. Таким образом, антитело huCD3 по изобретению содержит одну или более мутаций для предотвращения ненормального высвобождения и продукции одного или более цитокин(ов) *in vivo*.

В другом варианте осуществления по изобретению антитело huCD3 вводят человеку для предотвращения, уменьшения или снижения эффектов, опосредованных высвобождением цитокиновых рецепторов в организме человека. Термин «цитокиновые рецепторы» относится ко всем человеческим цитокиновым рецепторам, известным в науке, которые связывают один или более цитокин(ов), описанных здесь, и включает в себя, не ограничиваясь ими, рецепторы вышеупомянутых цитокинов. Таким образом, антитело huCD3 по изобретению вводят для лечения и/или предотвращения состояний, опосредованных ненормальной активацией, связыванием или лигированием одного или более цитокинового рецептора(ов) в организме человека. В дальнейшем предполагается, что введение антитела huCD3 *in vivo* уменьшит внутриклеточную сигнализацию, опосредованную цитокиновым рецептором(ами) в организме человека.

В одном аспекте осуществления по изобретению антитело huCD3 вводят человеку при снижении функции панкреатических бета-клеток. В одном варианте осуществления пациента тестируют на функцию бета-клеток, секрецию инсулина или уровень с-белка, как это известно в науке. Затем, при обнаружении существенного снижения одного из показателей пациенту вводят в соответствии с определенным режимом дозирования антитело huCD3 для предотвращения дальнейшего прогрессирования аутоиммунного нарушения функции бета-клеток.

Диагностические и профилактические лекарственные формы

Полностью человеческие анти-CD3 MAb по изобретению используют в диагностических и профилактических лекарственных формах. В одном варианте осуществления huCD3 MAb по изобретению вводят пациентам, у которых есть риск развития одного из вышеуказанных аутоиммунных заболеваний.

Предрасположенность пациента к одному или более из вышеуказанных аутоиммунных заболеваний может быть определена с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров. Например, присутствие определенных подвидов HLA и серологических аутоантител (против инсулина, GAD65 и IA-2) показательны для диабета I типа.

В другом варианте осуществления по изобретению антитело huCD3 вводят человеку, у которого диагностированы одно или более из вышеуказанных аутоиммунных заболеваний. После диагностики антитело huCD3 вводят для устранения или обратного развития эффектов аутоиммунитета. В одном таком примере человеку с диагностированным диабетом I типа вводили достаточную дозу антитела huCD3

для восстановления функции поджелудочной железы и минимизации повреждения, вызванного аутоиммунной инфильтрацией поджелудочной железы. В другом варианте осуществления человеку с диагностированным ревматоидным артритом вводили антитело huCD3 для уменьшения инфильтрации иммунными клетками и разрушения суставов конечностей.

Антитела по изобретению также применимы для определения CD3 в образцах пациента и соответственно применимы в диагностике. Например, антитела huCD3 по изобретению применимы в анализах *in vitro*, например ELISA, для определения уровней CD3 в образцах пациента.

В одном варианте осуществления антитело huCD3 по изобретению иммобилизируют на твердом носителе (например, луночном планшете). Иммобилизованные антитела служат как антитела-ловушки для любых CD3, которые могут присутствовать в тестируемом образце. Перед контактом иммобилизованных антител с образцом пациента твердую подложку промывали и обрабатывали блокирующим агентом, таким как белок норки или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

В дальнейшем лунки обрабатывали тестируемым образцом, в котором ожидалось присутствие антигена, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Таким образом может быть, например, образец сыворотки субъекта, у которого ожидается присутствие уровней циркулирующего антигена, признанных диагностическими для патологии. После удаления тестируемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывали вторым антителом, меченным для детекции. Меченное второе антитело служит как детектируемое антитело. Измеряют уровень детектируемой метки и определяют в тестируемом образце концентрацию антигена CD3 путем сравнения со стандартной кривой, полученной для стандартного образца.

Ожидается, что на основе результатов, полученных с использованием антител huCD3 по изобретению в диагностических анализах *in vitro*, будет возможно определять стадию заболевания (например, аутоиммунного или воспалительного нарушения) у субъекта, основываясь на уровнях экспрессии антигена CD3. Для конкретного заболевания образцы крови берут у субъектов, у которых диагностированы разные стадии прогрессирования заболевания и/или на разных стадиях лечения заболевания. Используя группу образцов, позволяющую получить статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессирования или лечения, определяют концентрационные уровни антигена, которые могут быть признаны характерными для каждой стадии заболевания.

Все публикации и патентная документация, цитируемые здесь, включены в виде ссылки, если каждая такая публикация или документация были специфичными и показательными для включения здесь в виде ссылки. Цитирование публикаций и патентной документации не предполагает допущения, что они относятся к предшествующему уровню техники, и также не допускает указания на контекст или датировку данных источников. Что касается изобретения, описанного здесь в письменной форме, то специалисту в данной области ясно, что оно может воплощаться различными вариантами осуществления, и описанные ниже примеры служат только для иллюстративных целей и не ограничивают следующую формулу изобретения.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, включающие в себя проведенные эксперименты и полученные результаты, приведены только для иллюстративных целей и не являются лимитирующими по настоящему изобретению.

Пример 1. Получение антител huCD3.

Иммунизационные стратегии: для получения полностью человеческих антител huCD3 использовали две линии трансгенных мышей, мыши HuMab® и мыши KMTM (Medarex, Princeton NJ). Первоначальные иммунизационные стратегии следовали хорошо документированным протоколам, из литературы, для получения мышинных антител (см., например, Kung P, et al., *Science*; 206(4416):347-9 (1979); Kung PC, et al., *Transplant Proc.* (3 Suppl 1):141-6 (1980); Kung PC, et al., *Int J Immunopharmacol.* 3 (3):175-81). Стандартные протоколы, известные в науке, оказались непригодными для получения полностью человеческих антител анти-huCD в мышах HuMab® или KMTM. Например, следующие иммунизационные стратегии были безуспешны и не позволили получить функционирующие антитела как в мышах HuMab®, так и в KMTM:

- иммунизация только тимоцитами или только Т-клетками;
- иммунизация только рекомбинантным человеческим CD3 материалом;
- иммунизация рекомбинантным CD3 материалом в наполнителе Freund;
- иммунизация клетками в наполнителе Freund;
- иммунизация тимоцитами или Т-клетками, вводимыми в сочетании с растворенным CD3;
- иммунизация тимоцитами или Т-клетками, вводимыми в сочетании с рекомбинантными CD3-экспрессирующими клетками.

При использовании первоначальных иммунизационных стратегий на мышах BALB/c, а не в HuMab® или KMTM, эти стратегии позволяли получить мышинные антитела анти-CD3, а не человеческие антитела анти-CD3.

Одновременно разрабатывали новые иммунизационные стратегии, варьируя следующие параметры:

типы используемых антигенов;
 частота инъекций;
 типы используемых наполнителей;
 типы используемых способов совместного стимулирования;
 используемые пути иммунизации;
 типы вторичной лимфоидной ткани, используемой для слияния.

Разрабатывали серии новых иммунизационных стратегий, включающих в себя, например: (i) иммунизацию вирусными частицами, экспрессирующими только CD3, и (ii) иммунизацию костимуляторными сигналами (например, CD40, CD27 или их комбинациями), вводимыми совместно с Т-клетками, тимоцитами или с клетками, которые были трансфицированы для экспрессии рекомбинантного CD3.

В первой новой иммунизационной стратегии, обозначенной здесь как «протокол гиперстимуляции», мышью HuMAb® (Medarex, Inc., Princeton, NJ) или KM™ (Medarex, Inc., Kirin) иммунизировали первой инъекцией человеческих клеток, например тимоцитов или Т-клеток. В промежутках времени от 1 до 8 недель после инъекции тимоцитов и/или Т-клеток мыши получали одну или более последующих «гиперстимулирующих» инъекций.

Гиперстимулирующая инъекция включает в себя, например, растворимый белок CD3 (например, рекомбинантный растворимый белок CD3), дополнительные инъекции тимоцитов или Т-клеток, клетки, трансфицированные CD3, вирусные частицы, экспрессирующие высокие уровни CD3 и их комбинации. Например, гиперстимулирующая инъекция содержит комбинацию растворимого белка CD3 и клетки, трансфицированные CD3.

Преимущественно, в протоколах стимулирующей гипериммунизации, иммунизированные мыши получали две финальные гиперстимулирующие инъекции на 6 и 3 сутки перед слиянием лимфатических узлов и/или селезенки. Например, у мышей KM™ ткань слияния происходит из селезенки, у мышей HuMAb® ткань слияния происходит из лимфатических узлов и/или ткани селезенки.

В одном примере протокола стимулирующей гипериммунизации одну мышь HuMAb® иммунизировали трижды человеческими тимоцитами (~10⁶ клеток) в 0, 7 и 28 сутки. Китайскую линию клеток яичника (CHO), трансфицированных кДНК, кодирующей человеческие цепи CD3 δ и ε (CHO/CD3, ~10⁶ клеток), затем вводили на 47 и 65 сутки.

Другую стимуляцию вирусными частицами, экспрессирующими высокие уровни CD3δε на своей поверхности, проводили на 79 сутки. В итоге, мышам вводили растворимый рекомбинантный человеческий CD3δε на 121 и 124 сутки перед слиянием лимфатических узлов на 127 сутки.

Все иммунизации проводили подкожно с Ribi (Corixa Corp., Seattle WA) в качестве наполнителя. Всего в слиянии было задействовано 8,5×10⁶ клеток. Только семь из 470 исследованных гибридом вырабатывали полностью человеческие антитела анти-CD3, и все полностью человеческие антитела анти-CD3 были молекулами IgM. Два из этих антител анти-CD3 были отобраны как кандидаты для клинического терапевтического применения (фиг. 1-3).

Во втором примере протокола стимулирующей гипериммунизации одну мышь KM™ дважды иммунизировали растворимым рекомбинантным человеческим CD3δε на 0 и 25 сутки. Человеческие тимоциты (~10⁶ клеток) использовали затем для стимуляции на 40, 49 и 56 сутки. Растворимый рекомбинантный CD3δε инъецировали дважды на 70, 77, 84 и 91 сутки. Линию мышинных Т-клеток, трансфицированных кДНК, кодирующей δ и ε цепи человеческого CD3 (EL4/CD3, ~10⁶ клеток), инъецировали на 98 сутки. В конце мышам вводили растворимый рекомбинантный человеческий CD3δε на 101 сутки, перед слиянием селезенки на 104 сутки. Иммунизацию проводили интраперитонеально с Alum в качестве наполнителя, кроме 70 дня, когда в качестве наполнителя применяли Ribi. CpG использовали как костимуляторный агент на 0, 25, 84 и 91 сутки. В целом слиянию подвергали 1,27×10⁸ клеток. Только пять из 743 исследованных гибридом продуцировали полностью человеческие антитела анти-CD3, и все полученные антитела были молекулами IgG. Одно из этих антител анти-CD3 было отобрано как кандидат для клинического терапевтического применения (фиг. 4).

Критерии отбора: кандидатов на клиническое терапевтическое применение отбирали с использованием следующих критериев. Во-первых, анализировали связывание антител с CD3-позитивными клетками по сравнению с CD3-негативными клетками. Для этого Jurkat CD3-позитивные клетки (J+) и Jurkat-негативные клетки (J-) инкубировали с различными антителами и анализировали связывание путем проточной цитометрии (фиг. 9A). Во-вторых, конкурентный анализ, в котором способность антител-кандидата ингибировать связывание мышинных анти-человеческих моноклональных антител ОКТ3 с CD3-позитивными клетками, применяли с использованием клеток J+ и конкуренцию определяли путем проточной цитометрии (фиг. 9B). Затем, антигенную модуляцию CD3 и TCR на поверхности Т-клеток периферической крови человека изучали путем проточной цитометрии (фиг. 9C). В конце, предпринимали анализ пролиферации Т-cell с использованием Т-клеток периферической крови человека, окрашенных CFSE, и деление клеток определяли путем проточной цитометрии (фиг. 9D).

Пример 2. Изменение изотипа антител анти-CD3 человека.

Некоторые антитела huCD3, полученные с использованием новых протоколов, описанных в приме-

ре 1, были антителами IgM. Эти антитела IgM «преобразовывали» в антитела IgG, преимущественно в антитела IgG1. Например, антитела IgM преобразовывали путем способа клонирования, в котором область VDJ гена, кодирующего антитело IgM, клонировали в ген тяжелой цепи IgG1, полученный из вектора, содержащего ген, кодирующий аллотип F гамма 1. Для преобразования легкой цепи последовательность IgM клонировали в вектор, содержащий область каппа. В мышцах Medarex, например HuMAb®, получали множественные легкие цепи, благодаря дефициту аллельных исключений.

Каждую комбинацию тяжелых и легких цепей трансфицировали в клетки с использованием FuGENE 6 (Roche Diagnostics) трансфицирующего агента в соответствии с инструкцией производителя. Секретированные моноклональные антитела тестировали для оптимизации функционирования, например связывания с антигеном-мишенью, с использованием критериев отбора, описанных в примере 1.

Пример 3. Антигенная модуляция с использованием антител huCD3.

Антитела huCD3 по изобретению способны к антигенной модуляции, которую определяют как перераспределение и элиминацию комплекса, индуцированного связыванием антитела. Экспрессия других молекул на клеточной поверхности Т-клеток, включающая в себя, например, CD4, не меняется при экспозиции с антителами анти-СВ3 по изобретению (фиг. 9С).

Пример 4. Уменьшение синдрома высвобождения токсичных цитокинов с помощью антител huCD3.

Преимущественно, антитела huCD3 по изобретению включают в себя мутацию области Fc, такую как мутацию, изменяющую течение синдрома высвобождения цитокинов. Как описано выше, синдром высвобождения цитокинов (CRS) является частым осложнением, развивающимся при использовании анти-Т-клеточных антител, таких как ATG (антитимоцитарный глобулин) и ОКТ3 (мышинные антитела анти-CD3). Этот синдром характеризуется избыточным высвобождением цитокинов, таких как TNF, IFN-гамма и IL-2, в циркуляцию. Цитокины, выделяемые активированными Т-клетками, вызывают разновидность системного воспалительного ответа, сходного с наблюдаемым при тяжелых инфекциях и характеризующегося гипотензией, лихорадкой и слабостью. Симптомы CRS включают в себя, например, жар, ознобы, тошноту, рвоту, гипотензию и диспноэ.

Антитела huCD3 по изобретению содержат одну или более мутаций, которые предотвращают высвобождение одного или более цитокин(ов), опосредованное константной областью, содержащей тяжелые цепи, *in vivo*. В одном варианте осуществления антитела huCD3 по изобретению являются молекулами IgG, имеющими одну или более из следующих мутаций в модифицированном скелете IgG $\gamma 1$: " $\gamma 1$ N2 97A", в котором остаток аспарагина в положении 297 замещен остатком аланина; " $\gamma 1$ L234/A, L235/A", в котором остатки лейцина в положениях 234 и 235 замещены остатками аланина; " $\gamma 1$ L234/A, L235/E", в котором остаток лейцина в положении 234 замещен остатком аланина, тогда как остаток лейцина в положении 235 замещен остатком глутаминовой кислоты; " $\gamma 1$ L235/E", в котором остаток лейцина в положении 235 замещен остатком глутаминовой кислоты; и " $\gamma 1$ D2 65/A", в котором остаток аспартата в положении 265 замещен остатком аланина. Описанные здесь остатки, содержащие тяжелые цепи, взяты из индекса EU (смотри Kabat et al., "Proteins of Immunological Interest", US Dept. of Health & Human Services (1983)), как показано, например, в патентах США № 5624821 и 5648260, содержание которых полностью включено здесь в виде ссылки.

Другие модификации скелета IgG $\gamma 1$, которые могут быть использованы в антителах huCD3 по изобретению, включают в себя, например, "A330/S", в котором остаток аланина в положении 330 замещен остатком серина, и/или "P331/S", в котором остаток пролина в положении 331 замещен остатком серина.

Полностью человеческие антитела CD3 по изобретению, имеющие мутацию $L^{234}L^{235} \rightarrow A^{234}E^{235}$ в области Fc, имеют уникальную функцию - элиминацию высвобождения цитокинов в присутствии антител huCD3. Предшествующие исследования исключали из использования $L \rightarrow E$ мутации (см., например, Xu et al., Cellular Immunology, 200, pp. 16-26 (2000), на стр. 23). Однако именно эти две мутации в положениях 234 и 235 (т.е., $L^{234}L^{235} \rightarrow A^{234}E^{235}$) элиминируют синдром высвобождения цитокинов, как показано на *in vitro* аналитической системе мононуклеарных клеток периферической крови человека (фиг. 11A, 11B). В этом анализе мононуклеарные клетки периферической крови человека изолировали с использованием градиента фиколла, меченного CFSE, и клетки, меченные CFSE, высаживали затем на 96-луночные плашки. Различные моноклональные антитела добавляли в разных разведениях и инкубировали в течение 72 ч при 37°C. Через 6 ч 50 мкл супернатанта отбирали для изучения выделения TNF с помощью ELISA. Через 48 ч 50 мкл супернатанта отбирали для изучения выделения IFN- γ с помощью ELISA. Через 72 ч клетки собирали и анализировали пролиферацию с помощью FACS с использованием интенсивности CFSE-мечения.

Таким образом, в противоположность дикому типу тяжелых цепей и в противоположность сериям других мутаций, описанным другими исследователями (например, TolerX (мутации агликозилирования), Bluestone (мутации $L^{234}L^{235} \rightarrow A^{234}A^{235}$) (см., например, патент США № 5885573)), которые все показывали значительный уровень эффекта, связанного с выделением цитокинов, мутации $L^{234}L^{235} \rightarrow A^{234}E^{235}$ антител huCD3 по изобретению не проявляли феномен высвобождения цитокинов. Уровень проявления эффекта высвобождения цитокинов был 100% для дикого типа Fc, около 50-60% для мутаций Bluestone

(L²³⁴L²³⁵→A²³⁴A²³⁵) и неопределимым для мутаций Ala/Glu Fc, описанных здесь (фиг. 11A, 11B).

Пример 5. Пептидный анализ идентификации эпитопа связывания антител huCD3.

Синтез и исследование способом ELISA большого количества пептидов использовали для определения аминокислотных остатков, входящих в эпитоп, для различных моноклональных антител (см., например, Geysen et al., *J Immunol Methods*, vol. 102(2):259-74 (1987)). В экспериментах, описанных здесь, анализы перекрывающихся пептидов, происходящих из аминокислотной последовательности эписилона-цепи CD3, были получены от Jerini (Berlin, Germany) и затем протестированы на места связывания полностью человеческими анти-CD3 мAb по изобретению.

Пептиды в анализах получали с использованием способа "SPOT синтеза" для прямого химического синтеза на мембранной основе (см. Frank and Overwin, *Meth Mol Biol*, vol. 66:149-169 (1996); Kramer and Schneider-Mergener, *Meth Mol Biol*, vol. 87:25-39 (1998)). Линейные 14-мерные пептиды ковалентно связывали с целлюлозной основой Whatman 50 С-концами, оставляя N-концы свободными (т.е. несвязанными). При использовании стандартных способов вестерн-блоттинга с данными пептидами, связанными с твердой фазой, показано, что моноклональное антитело 28F11 распознавало перекрывающийся набор аминокислот поблизости от N-конца (фиг. 10).

Другие варианты осуществления

Поскольку изобретение было описано в сочетании с его подробным описанием, приведенное выше описание предназначено для иллюстрации и не ограничивают объем изобретения, который определяется прилагаемой формулой изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело имеет следующие характеристики:

a) связывается с CD3-положительными (CD3+) клетками, но не с CD3-отрицательными (CD3-) клетками;

b) модулирует уровень экспрессии CD3 на клеточной поверхности или его активность и

c) снижает уровень экспрессии T-клеточного рецептора на клеточной поверхности или его активность.

2. Антитело по п.1, где указанное антитело ингибирует связывание мышинового моноклонального антитела ОКТ3 против человеческого белка с Т-лимфоцитом.

3. Антитело по п.1, где указанное антитело связывается с эпитопом, который полностью или частично включает в себя аминокислотную последовательность EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67).

4. Антитело по п.1, где указанное антитело включает в себя мутацию в тяжелой цепи в аминокислотном остатке в положении 234, 235, 265 или 297 или сочетания таких мутаций и снижает высвобождение цитокинов из Т-клетки.

5. Антитело по п.4, где указанная мутация приводит к появлению в указанном положении аланина или глутаминовой кислоты.

6. Антитело по п.1, где указанное антитело имеет изотип IgG1 и содержит по меньшей мере первую мутацию в положении 234 и вторую мутацию в положении 235, где указанная первая мутация приводит к появлению остатка аланина в положении 234, а указанная вторая мутация приводит к появлению остатка глутаминовой кислоты в положении 235.

7. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело, где указанное антитело имеет тяжелую цепь с тремя CDR, содержащими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей GYGMH (SEQ ID NO: 27); VIWYDGSKKY YVDSVKG (SEQ ID NO: 28); QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 29); SYGMH (SEQ ID NO: 33); IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 34); GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35) и AIWYNGRQDY ADSVKG (SEQ ID NO: 44), и легкую цепь с тремя CDR, которые включают в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей RASQS VSSYLA (SEQ ID NO: 30); DASNRAT (SEQ ID NO: 31); QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32); RASQS-VSSSYLA (SEQ ID NO: 36); GASSRAT (SEQ ID NO: 37); QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); YASSLQS (SEQ ID NO: 40); QQYYSTLT (SEQ ID NO: 41); DASSLGS (SEQ ID NO: 42); WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43); QQRSNWPWT (SEQ ID NO: 45); DASSLES (SEQ ID NO: 46) и QQFNSYPIT (SEQ ID NO: 47), где указанное антитело связывается с CD3.

8. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело, где указанное антитело имеет тяжелую цепь с тремя CDR, содержащими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей GYGMH (SEQ ID NO: 27); VIWYDGSKKY YVDSVKG (SEQ ID NO: 28); QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 29); SYGMH (SEQ ID NO: 33); IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 34); GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 35); и AIWYNGRQDY ADSVKG (SEQ ID NO: 44), где указанное антитело связывается с CD3.

9. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело, где указанное антитело включа-

ет в себя вариабельную аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 6, 10 и 22, где указанное антитело связывается с CD3.

10. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело, где указанное антитело имеет легкую цепь с тремя CDR, содержащими аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей RASQSVSSYLA (SEQ ID NO: 30); DASNRAT (SEQ ID NO: 31); QQRSNWPPLT (SEQ ID NO: 32); RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 36); GASSRAT (SEQ ID NO: 37); QQYGSSPIT (SEQ ID NO: 38); RASQGISSALA (SEQ ID NO: 39); YASSLQS (SEQ ID NO: 40); QQYYSTLT (SEQ ID NO: 41); DASSLGS (SEQ ID NO: 42); WASQGISSYLA (SEQ ID NO: 43); QQRSNWPWT (SEQ ID NO: 45); DASSLES (SEQ ID NO: 46) и QQFNSTYPIT (SEQ ID NO: 47), где указанное антитело связывается с CD3.

11. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело, где указанное антитело включает в себя вариабельную аминокислотную последовательность легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 8, 16-20, 25 и 26, где указанное антитело связывается с CD3.

12. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя вариабельную область тяжелой цепи (V_H), включающую в себя CDR1 и CDR2, где указанная область кодируется генной последовательностью DP50 V_H человеческой зародышевой линии или последовательностью нуклеиновой кислоты, гомологичной в отношении генной последовательности DP50 V_H человеческой зародышевой линии.

13. Антитело по п.12, в котором указанная последовательность нуклеиновой кислоты, гомологичная в отношении последовательности DP50 V_H зародышевой линии, гомологична в отношении генной последовательности DP50 V_H зародышевой линии по меньшей мере на 90%.

14. Антитело по п.12, где указанное антитело далее включает в себя вариабельную область легкой цепи (V_L), кодируемую генной последовательностью L6 V_L человеческой зародышевой линии или последовательностью нуклеиновой кислоты, гомологичной в отношении генной последовательности L6 V_L зародышевой линии.

15. Антитело по п.14, в котором указанная последовательность нуклеиновой кислоты, гомологичная в отношении последовательности L6 V_L зародышевой линии, гомологична в отношении генной последовательности L6 V_L зародышевой линии по меньшей мере на 90%.

16. Антитело по п.12, где указанное антитело далее включает в себя вариабельную область легкой цепи (V_L), кодируемую генной последовательностью L4/18a V_L человеческой зародышевой линии, или последовательностью нуклеиновой кислоты, гомологичной в отношении генной последовательности L4/18a V_L зародышевой линии.

17. Антитело по п.16, в котором указанная последовательность нуклеиновой кислоты, гомологичная в отношении последовательности L4/18a V_L зародышевой линии, гомологична в отношении генной последовательности L4/18a V_L зародышевой линии по меньшей мере на 90%.

18. Выделенное, полностью человеческое антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя CDR1-область V_H , содержащую аминокислотную последовательность YGMH (SEQ ID NO: 58).

19. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя CDR2-область V_H , содержащую аминокислотную последовательность DSVKG (SEQ ID NO: 59).

20. Антитело по п.19, в котором указанная CDR2-область V_H включает в себя аминокислотную последовательность IWYX₁GX₂X₃X₄X₅YX₆DSVKG (SEQ ID NO: 60).

21. Антитело по п.20, в котором X₁, X₂, X₃, X₄, X₅ и X₆ представляет собой любую аминокислоту.

22. Антитело по п.20, в котором X₁, X₂, X₃ и X₄ представляют собой гидрофильные аминокислоты.

23. Антитело по п.20, в котором X₁ представляет собой аспарагин или аспарагиновую кислоту.

24. Антитело по п.20, в котором X₂ представляет собой аргинин или серин.

25. Антитело по п.20, в котором X₃ представляет собой лизин или аспарагин.

26. Антитело по п.20, в котором X₄ представляет собой лизин или глутамин.

27. Антитело по п.20, в котором X₅ представляет собой аспартат, аспарагин или тирозин.

28. Антитело по п.20, в котором X₆ представляет валин или аланин.

29. Антитело по п.20, в котором указанная CDR2-область V_H включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из AIWYNGRKQDYADSVKG (SEQ ID NO: 69), IIWYDGSKKNYADSVKG (SEQ ID NO: 70), VIWYDGSKKYYVDSVKG (SEQ ID NO: 71) и VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 72).

30. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя CDR3-область V_H , содержащий аминокислотную последовательность X_AX_BGYX_CX_DFDX_E (SEQ ID NO: 61).

31. Антитело по п.30, в котором X_A, X_B, X_C, X_D и X_E представляют собой любую аминокислоту.

32. Антитело по п.30, в котором X_A и X_B представляют собой нейтральные аминокислоты.

33. Антитело по п.30, в котором X_D представляет собой ароматическую аминокислоту.

34. Антитело по п.30, в котором X_E представляет собой гидрофобную аминокислоту.

35. Антитело по п.30, в котором X_A представляет собой глицин или глутамин.
36. Антитело по п.30, в котором X_B представляет собой треонин или метионин.
37. Антитело по п.30, в котором X_C представляет собой аспарагин или триптофан.
38. Антитело по п.30, в котором X_D представляет собой триптофан или гистидин.
39. Антитело по п.30, в котором X_E представляет собой пролин или лейцин.
40. Антитело по п.30, в котором указанная CDR₃-область V_H включает в себя аминокислотную последовательность GTGYNWFDP (SEQ ID NO: 62) или аминокислотную последовательность QMGYWHFDL (SEQ ID NO: 63).
41. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя каркасную область 2 (FWR2), содержащую аминокислотную последовательность WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 73).
42. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя каркасную область 3 (FWR3), содержащую аминокислотную последовательность RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 74).
43. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело включает в себя вариательную область, расположенную в С-концевом направлении от CDR3-области, где указанная вариательная область содержит аминокислотную последовательность VTVSS (SEQ ID NO: 64) в положении, которое находится в С-концевом направлении от CDR3-области.
44. Антитело по п.43, где указанное антитело включает в себя вариательную область, расположенную в С-концевом направлении от CDR3-области, где указанная вариательная область содержит аминокислотную последовательность GTLVTVSS (SEQ ID NO: 65) в положении, которое находится в С-концевом направлении от CDR3-области.
45. Антитело по п.43, где указанное антитело включает в себя вариательную область, расположенную в С-концевом направлении от CDR3-области, где указанная вариательная область содержит аминокислотную последовательность WGRGTLTVSS (SEQ ID NO: 66) в положении, которое находится в С-концевом направлении от CDR3-области.
46. Выделенное, полностью человеческое моноклональное антитело против CD3 или его фрагмент, где указанное антитело связывает эпитоп, который полностью или частично включает в себя аминокислотную последовательность EMGGITQTPYKVSISGT (SEQ ID NO: 67).
47. Выделенное антитело по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело включает в себя мутацию в тяжелой цепи в аминокислотном остатке в положении 234, 235, 265 или 297 или комбинацию таких мутаций и где высвобождение цитокинов из Т-клетки в присутствии указанного антитела снижено по сравнению с высвобождением цитокинов из Т-клетки в присутствии антитела, которое не включает в себя мутацию в тяжелой цепи в положении 234, 235, 265 или 297, или комбинацию таких мутаций.
48. Антитело по п.47, в котором указанная мутация приводит к появлению остатка аланина или глутаминовой кислоты в указанном положении.
49. Антитело по п.47, где указанное антитело содержит по меньшей мере первую мутацию в положении 234 и вторую мутацию в положении 235, где указанная первая мутация приводит к появлению остатка аланина в положении 234, а указанная вторая мутация приводит к появлению остатка глутаминовой кислоты в положении 235.

010350

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

<210> 3

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60

ctctcctgca gggccagtca gagtggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgct cactttcggc
 300

ggagggacca aggtggagat caaa
 324

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

010350

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 7

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
 180

aggttcagtg gcagtggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggctccgct cactttcggc
 300

ggagggacca aggtggagat caaa
 324

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

010350

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 Pro
 85 90 95
 Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 354

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 9

caggtgcagc tgggtggagtc cgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc
60

tctgtgagc cgtctggatt caccttcaga agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atatggtatg atggaagtaa aaaaaactat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggaact
300

gggtacaact ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

010350

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 11

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 11

gaaattgtgt tgacacagtc tccacgcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
 60

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
 180

gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggac
 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgat caccttcggc
 300

caagggacac gactggagat taaa
 324

<210> 12

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 12

gacatcctga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagctc ctaagctcct gatctattat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat tacactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagta cctcacttt cggcggaggg
300

accaaggtgg agatcaaa
318

<210> 13

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 13

gacatogtga tgaccagtc tccatctccc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgctttag cctggtatca gcagaaacca
120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcatccagtt tgggaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagta cctcacttt cggcggaggg
300

accaaggtgg agatcaaa
318

<210> 14

<211> 318

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 14

gacatccaga tgaccagtc tccattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcacttget gggccagtca gggcattagc agttatttag cctggtatca gcaaaaacca
120

gcaaaagccc ctaagctctt catctattat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat tacactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagta ccctcacttt cggcggaggg
300

accaaggtgg agatcaaa
318

<210> 15
<211> 318
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 15

gacatcgaga tgaccagtc tccattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc
60

atcaacttgct gggccagtca gggcattagc agttatttag cctgggatca gcaaaaacca
120

gcaaaagccc ctaagctctt catctattat gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacggat tacactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tattatagta ccctcacttt cggcggaggg
300

accaaggtgg agatcaaa
318

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Arg 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 Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Asp
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

010350

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Gly Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

010350

	50					55						60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75					80
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Leu	Thr
				85					90					95	
Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys						
			100					105							

<210> 19
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

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

<210> 20
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Asp	Ile	Glu	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Phe	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

010350

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

<210> 21
 <211> 354
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 21

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc gtgggtccagc ccgggagggtc cctgagactc
60

tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct
120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtata atggaagaaa acaagactat
180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat
240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtac gagggggaact
300

gggtacaatt ggttcgaccc ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca
354

<210> 22
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

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

010350

atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgcttag cctgggatca gcagaaacca
120

gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca
180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct
240

gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acctatcac cttcggccaa
300

gggacacgac tggagattaa a
321

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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 Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

010350

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 28

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu
 1 5

210> 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr .
 1 5 10

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 34
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 35

211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5

<210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ile Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
 1 5 10

<210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu Thr
1 5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Asp Ala Ser Ser Leu Gly Ser
1 5

<210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 44
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Ile Trp Tyr Asn Gly Arg Lys Gln Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Trp Thr
1 5

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

<210> 47
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Ile Thr
 1 5

<210> 48
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys
 1 5 10 15

Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 35

<210> 49
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 1 5 10 15

Ser

<210> 51

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 53

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 1 5 10 15

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn
 20 25 30

Ser Tyr Pro
 35

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 55

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 56
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 1 5 10 15

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 20 25 30

Gly Ser Ser Pro
 35

<210> 57
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 58
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Tyr Gly Met His
 1

<210> 59
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59

Asp Ser Val Lys Gly
 1 5

211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 62

Gly Thr Gly Tyr Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5

<210> 63
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63

Gln Met Gly Tyr Trp His Phe Asp Leu
 1 5

<210> 64
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64

Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 65
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5

<210> 66
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66

Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67

Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly
 1 5 10 15

Thr

<210> 68

<211> 412

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 68

tgattcatgg agaaatagag agactgagtg tgagtgaaca tgagtgagaa aaactggatt
 60

tgtgtggcat tttctgataa cgggtgcctt ctgtttgcag gtgtccagtg tcaggtgcag
 120

ctgggtggagt ctgggggagg cgtgggtccag cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca
 180

gcgtctggat tcaccttcag tagctatggc atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag
 240

gggctggagt ggggtggcagt tatatggtat gatggaagta ataaatacta tgcagactcc
 300

gtgaagggcc gattcaccat ctccagagac aattccaaga acacgctgta tctgcaaatg
 360

aacagcctga gagccgagga cacggctgtg tattactgtg cgagagacac ag
 412

<210> 69

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 20 25 30

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45

Glu Trp Val Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 50 55 60

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75 80

>28F11 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 1)
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATACTATGTAGAC
 TCCGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAATGGGCTACTGGC
 ACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

Фиг. 1А

>28F11 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 2)
 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFKFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGSKKYYVD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR QMGYWHFDLWGRGTLVTVSS

Фиг. 1В

>28F11 VL нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 3)
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCSTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
 CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCC
 AGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTC
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTT
 TGCAGTTTATTACTGTCCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCA
 AGGTGGAGATCAAA

Фиг. 1С

>28F11 VL аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 4)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPPLTFGGGTKVEIK

Фиг. 1D

>23F10 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 5)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGTCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCGTCTGGATTCAAGTTCAGTGGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAAGAAATACTATGTAGAC
 TCCGTGAAGGGCCGCTTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAAATGGGCTACTGGC
 ACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA

Фиг. 2А

>23F10 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 6)
 QVQLVQSGGGVVQSGRSLRLSCAASGFKFS GYGMHWVRQAPGKGLEWVA LWYDGSKKYYVD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRGEDTAVYYCAR QMGYWHFDLWGRGTLVTVSS

Фиг. 2В

>23F10 VL нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 7)
 GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCSTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
 CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCC
 AGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTC
 AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTT
 TGCAGTTTATTACTGTCCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCA
 AGGTGGAGATCAAA

Фиг. 2С

>23F10 VL аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 8)
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIY DASNRATGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPPLTFGGGTKVEIK

Фиг. 2D

>27H5 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 9)
 CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCCGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGCAGCGTCTGGATTCACTTCCAGAAAGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAATTATGGTATGATGGAAGTAAAAAACTATGCAGAC
 TCCGTGAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGAACCTGGGTACAAC
 GGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCTCTCCTCA

Фиг. 3А

>27H5 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 10)
 QVQLVESGGGVVQPRSLRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGSKKNYAD
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARGTGYNWFDPLWGQGLTIVTSS

Фиг. 3В

>27H5 VL1 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 11)
 GAAATTGTTGACACAGTCTCCACGCACCCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCT
 CTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTG
 GCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGG
 TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGACCCCTGAAGA
 TTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAGTATGGTAGCTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACAC
 GACTGGAGATTAАА

>27H5 VL2 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 12)
 GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 AAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
 TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
 AGATCAAA

>27H5 VL3 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 13)
 GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA
 AAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
 TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
 AGATCAAA

>27H5 VL4 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 14)
 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGCAA
 AAGCCCTAAGCTCTTCACTATGATGCATCCAGTTTGGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
 TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
 AGATCAAA

>27H5 VL5 нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 15)
 GACATCGAGATGACCCAGTCTCCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
 CACTTGCTGGGCCAGTCAGGGCATTAGCAGTTATTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGCAA
 AAGCCCTAAGCTCTTCACTATGATGCATCCAGTTTGGGAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
 AGCGGCAGTGGATCTGGGACGGATTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
 TGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTACCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG
 AGATCAAA

Фиг. 3С

>27H5 VL1 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 16)
 EIVLTQSPRFTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
 PFGSGSGTDFTLTISRLLDPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIK

>27H5 VL2 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 17)
 DILMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQOKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPSRF
 SGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>27H5 VL3 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 18)
 DIVMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQOKPGKAPKLLIYDASSLQSGVPSRF
 SGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>27H5 VL4 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 19)
 DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQOKPAKAPKLFYVASSLQSGVPSRF
 SGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

>27H5 VL5 аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 20)
 DIEMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISSYLAWYQOKPAKAPKLFYVASSLQSGVPSRF
 SGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYSTLTFGGGKVEIK

Фиг. 3D

27H5 VL4	DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISS-YLAWYQOKPAKAPKLFYVASSLQSGVP	59
27H5 VL5	DIEMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISS-YLAWYQOKPAKAPKLFYVASSLQSGVP	59
27H5 VL2	DILMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISS-ALAWYQOKPGKAPKLLIYVASSLQSGVP	59
27H5 VL3	DIVMTQSPFSSLSASVGDRTITCRASQGISS-ALAWYQOKPGKAPKLLIYDASSLQSGVP	59
27H5 VL1	EIVLTQSPRFTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQOKPGQAPRLLIYGASSRATGIP	60
KEY	:* :**** :* * * :* :* * * :* * * :* * * * * :* :* * * :* * * :* * *	
27H5 VL4	SRPFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGKVEIK	106 (SEQ ID NO: 19)
27H5 VL5	SRPFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGKVEIK	106 (SEQ ID NO: 20)
27H5 VL2	SRPFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGKVEIK	106 (SEQ ID NO: 17)
27H5 VL3	SRPFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST-LTFGGGKVEIK	106 (SEQ ID NO: 18)
27H5 VL1	DRPFGSGSGTDFTLTISRLLDPEDFAVYYCQQYGSSPITFGQGRLEIK	108 (SEQ ID NO: 16)
KEY	.*****;***** *:*****.***** *: :*** **;***	

Фиг. 3E

>15C3 VH нуклеотидная последовательность: (SEQ ID NO: 21)
 CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCCGGGAGGTCCCTGAGACTCTC
 CTGTGTAGCGTCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
 GCAAGGGGCTGGAGTGGTGGCAGTATATGGTATAATGGAAGAAAACAAGACTATGCAGAC
 TCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAAT
 GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGGGGAACCTGGGTACAAT
 GGTTGACCCCTGGGGCCAGGAACCCTGGTCACTCTCTCTCA

Фиг. 4A

>15C3 VH аминокислотная последовательность: (SEQ ID NO: 22)
 QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCVASGFTFSYGMHWVRQAPGKLEWVAIWIYNGRKQDYAD
 SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGTGYNWFDWGGQTLVTVSS

Фиг. 4B

Выравнивание последовательностей V_L связывающих CD3 антител

VκI

```

                                CDR1                                CDR2
                                -----                                -----
27H5 (19)  DILMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYVASSLQSGVPS
15C3 VL2   AIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPS
L4/18a     AIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPS
          *..*****
                                -----                                -----
                                CDR3
                                -----
                                J
                                -----
27H5 (19)  RFGSGSGTDYTLTISSLPEDFATYYCQQYYST.LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:17)
15C3 VL2   RFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNSYPITIFGQGRLEIK (SEQ ID NO:26)
L4/18a     RFGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQFNSYP----- (SEQ ID NO:53)
          *****
Соединение цепи каппа человеческого антитела 4 LTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:54)
Соединение цепи каппа человеческого антитела 5 ITFGQGRLEIK (SEQ ID NO:55)
    
```

Фиг. 7

Выравнивание последовательностей V_L связывающих CD3 антител

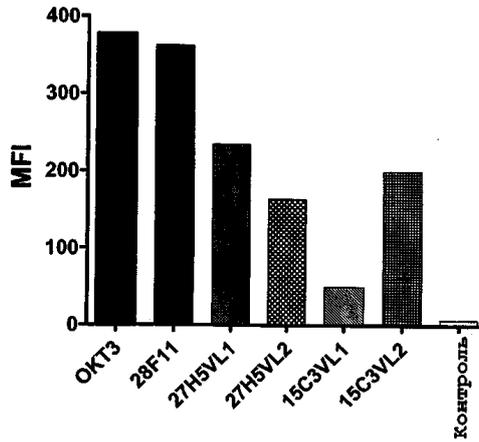
VκII

```

                                CDR1                                CDR2
                                -----                                -----
27H5 (13.17) EIVLTQSPRTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
DPK22        EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
          *****
                                -----                                -----
                                CDR3
                                -----
                                J
                                -----
27H5        DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPIITIFGQGRLEIK (SEQ ID NO:16)
DPK22       DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPI----- (SEQ ID NO:56)
          *****
Соединение цепи каппа человеческого антитела 5 ITFGQGRLEIK (SEQ ID NO:57)
    
```

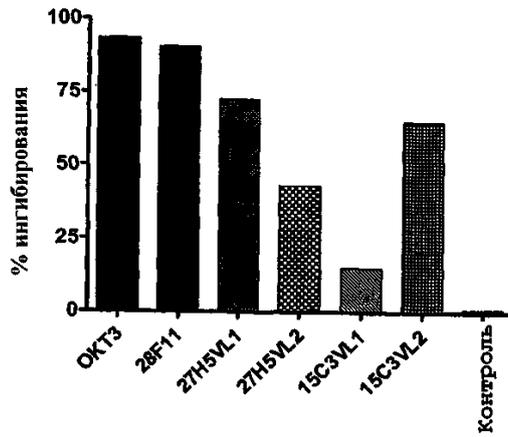
Фиг. 8

Анализ связывания CD3



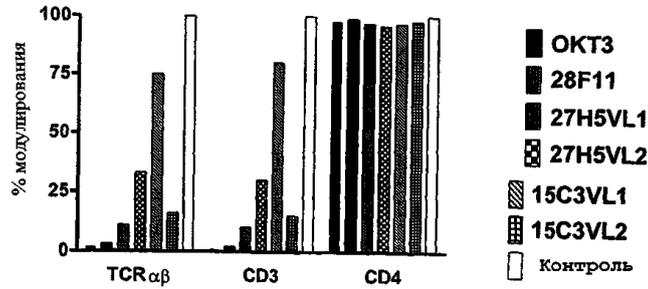
Фиг. 9А

Конкурентный анализ ОКТ3



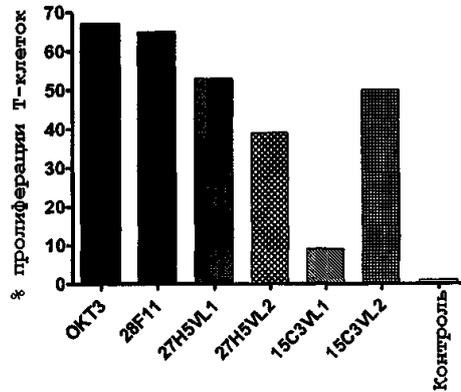
Фиг. 9В

Анализ антигенного модулирования CD3 и TcR



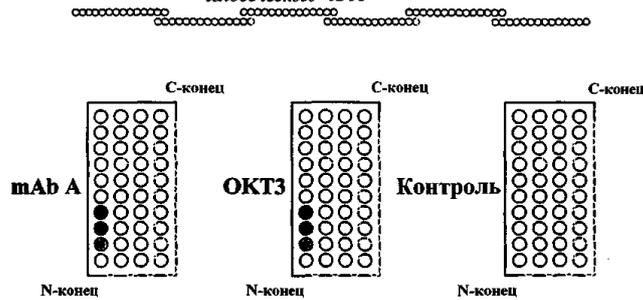
Фиг. 9С

Анализ пролиферации человеческих Т-клеток

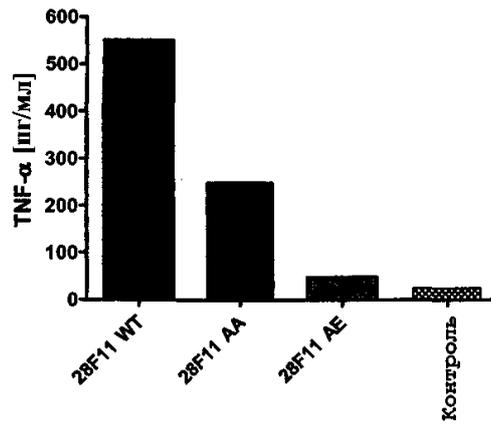


Фиг. 9D

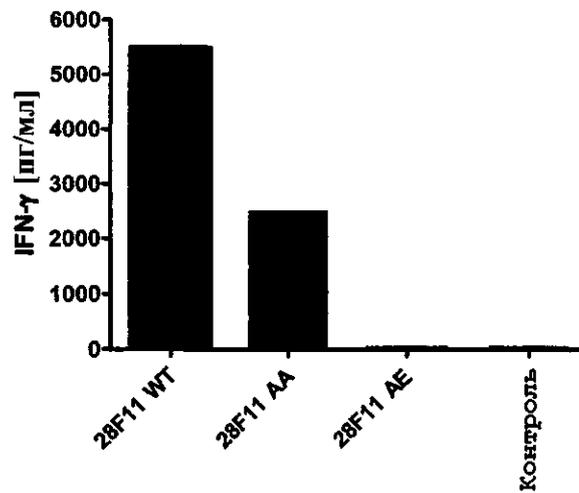
Пептидный чип: перекрывающиеся пептиды на протяжении внеклеточного домена человеческого CD3ε



Фиг. 10

Анализ высвобождения TNF- α 

Фиг. 11А

Анализ высвобождения IFN- γ 

Фиг. 11В

