

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201692504 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2017.05.31

(51) Int. Cl. C07K 16/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2015.05.29

(54) ТРИСПЕЦИФИЧНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/004,571; 62/008,229; 62/107,824

(32) 2014.05.29; 2014.06.05; 2015.01.26

(33) US

(86) PCT/US2015/033076

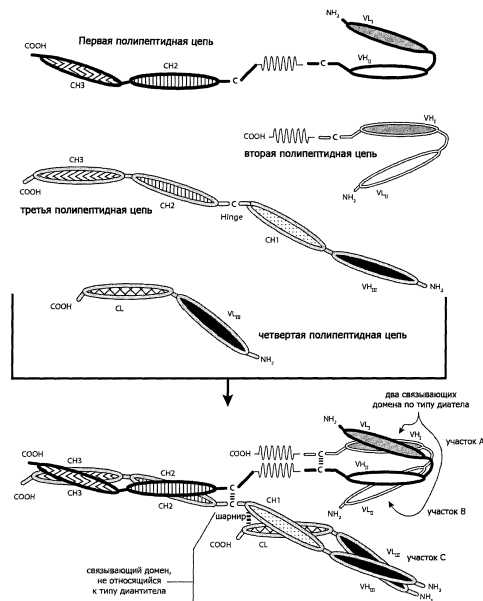
(87) WO 2015/184203 2015.12.03

(71) Заявитель:
МЭКРОУДЖЕНИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Джонсон Лесли С., Хуан Лин, Чичили
Гурунад Редди, Шах Калпана, Лам
Чиа-Ин Као, Бёрк Стивен Джеймс,
Лиу Лицинь, Мур Пол А., Бонвини
Эзео, Барат Бхасвати (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к три-специфичным связывающим молекулам, которые представляют собой мультицепочечные полипептидные молекулы, которые обладают тремя связывающими доменами и, таким образом, способны опосредовать скоординированное связывание с тремя эпитопами. Связывающие домены могут быть выбраны таким образом, чтобы триспецифичные связывающие молекулы были способны связываться с любыми тремя различными эпитопами. Такие эпитопы могут представлять собой эпитопы одного и того же антигена или эпитопы двух или трех различных антигенов. В предпочтительном воплощении один из таких эпитопов будет способен связываться с CD3, второй из таких эпитопов будет способен связываться с CD8, а третий из таких эпитопов будет способен связываться с эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием. В изобретении также предлагается новое ROR1-связывающее антитело, а также его производные и применения таких композиций.



A1

201692504

201692504

A1

ТРИСПЕЦИФИЧНЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ МОЛЕКУЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка претендует на приоритет патентных заявок США № 62/008229 (поданной 5 июня 2014 года; рассматривается), 62/004571 (поданной 29 мая 2014 года; рассматривается) и 62/107824 (поданной 26 января 2015 года), каждая из которых включена в настоящее описание ссылкой во всей полноте.

Ссылка на список последовательностей

Эта заявка включает один или несколько списков последовательностей в соответствии с 37 CFR 1.821 и далее, которые раскрыты в машиночитаемом носителе (Название файла: 1301_0114PCT_Sequence_Listing_ST25.txt, созданный 18 мая 2015 года, и имеющий размер 244 021 байт), этот файл включен в данное описание ссылкой во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к триспецифичным связывающим молекулам, которые представляют собой мультицепочечные полипептидные молекулы, которые обладают тремя связывающими доменами и, таким образом, способны опосредовать скоординированное связывание с тремя эпитопами. Связывающие домены могут быть выбраны таким образом, чтобы триспецифичные связывающие молекулы были способны связывать любые три различных эпитопа. Такие эпитопы могут быть эпитопами одного и того же антигена или эпитопами из двух или трех различных антигенов. В предпочтительном варианте один из таких эпитопов будет способен связываться с CD3, второй из таких эпитопов, будет способен связываться с CD8, а третий из таких эпитопов, будет способен связываться с эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием. В изобретении также предлагается новое ROR1-связывающее антитело, а также его производные, и применение таких композиций.

Предшествующий уровень техники

I. Иммунная система млекопитающих

Иммунная система млекопитающих служит защитой от различных состояний, в том числе, например, травмы, инфекции и новообразования. Эффективность, с которой у людей и других млекопитающих развивается иммунологический ответ на патогены, чужеродные вещества и антигены злокачественной опухоли опирается на две характеристики: изысканную специфичность иммунного ответа для распознавания

антигена, и иммунологическую память, которая позволяет быстрее и более энергично отвечать при повторной активации тем же антигеном (Portolés P. et al.(2009) “*The TCR/CD3 Complex: Opening the Gate to Successful Vaccination,*” Current Pharmaceutical Design 15:3290-3300; Guy, C.S. et al. (2009) “*Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex,*” Immunol Rev. 232(1):7-21).

Иммунная система млекопитающих опосредуется двумя отдельными, но взаимосвязанными системами: клеточной и гуморальной иммунными системами. Вообще говоря, гуморальная система опосредуется растворимыми продуктами (антитела или иммуноглобулины), которые имеют возможность комбинировать с продуктами, признанными системой как инородные организму, и нейтрализовать их. В противоположность этому, клеточная иммунная система предполагает мобилизацию определенных клеток, называемых «Т-клетки», которые выполняют различные терапевтические роли. Т-клетки представляют собой лимфоциты, которые происходят из тимуса и циркулируют между тканями, лимфатической системой и системой кровообращения. В ответ на присутствие и распознавание инородных структур (антигенов), Т-клетки становятся «активированными» для инициации иммунного ответа. Во многих случаях эти чужеродные антигены экспрессируются на клетках-хозяевах в результате неоплазии или инфекции. Хотя Т-клетки сами не секретируют антитела, они, как правило, требуются для секреции антитела вторым классом лимфоцитов, В-клетками (которые происходят из костного мозга). Чрезвычайно важно то, что Т-клетки проявляют необычайную иммунологическую специфичность таким образом, что способны различать один антиген от другого). Два типа Т-клеток, «Т-хелперные клетки» и «цитотоксические Т-клетки», имеют особое значение.

Т-хелперы характеризуются экспрессией гликопротеина, CD4 (т.е. они являются «CD4⁺»). CD4⁺ Т-клетки являются основными организаторами большинства иммунных и аутоиммунных реакций млекопитающих (Dong, C. et al. (2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,*” Immunolog. Res. 28(1):39-48). Было обнаружено, что активация CD4⁺ Т-клеток опосредована костимуляторными взаимодействиями между антигеном: молекулой главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), которые развернуты на поверхности антиген-презентирующей клетки (такой как В-клетка, макрофаг или дендритная клетка) и комплексом из двух молекул, Т-клеточного рецептора («TCR») и лиганда рецептора клеточной поверхности CD3, которые развернуты на поверхности наивных CD4⁺ Т-клеток. Активированные Т-хелперы способны пролиферировать в клетки Th1, которые способны опосредовать воспалительный ответ на клетки-мишени.

Цитотоксические Т-клетки характеризуются экспрессией CD8 (т.е. они являются «CD8⁺», и CD3⁺). Было обнаружено, что активация CD8⁺ Т-клеток опосредуется через костимуляторные взаимодействия антигеном: молекулой главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II), которые развернуты на поверхности клетки-мишени, и комплекса CD8 и Т-клеточного рецептора, которые развернуты на поверхности CD8⁺ Т-клетки. В отличие от молекул МНС II, которые экспрессируются только определенными клетками иммунной системы, молекулы МНС I экспрессируются очень широко. Таким образом, цитотоксические Т-клетки способны связываться с широким спектром типов клеток. Активированные цитотоксические Т-клетки опосредуют гибель клеток, высвобождая цитотоксины, перфорин, гранзимы и гранулизин. Благодаря действию перфорина гранзимы входят в цитоплазму клетки-мишени, и их серин-протеазная функция запускает каскад каспаз, которые представляют собой ряд цистеиновых протеаз, что в конечном итоге приводит к апоптозу (запрограммированной гибели клеток) клеток-мишеней.

Т-клеточный рецептор («TCR») представляет собой ковалентно связанный гетеродимер альфа и бета цепей («TCR $\alpha\beta$ »). Эти цепи представляют собой мембранные полипептиды класса I длиной 259 (α) и 296 (β) аминокислот. Молекула CD3 представляет собой Т-клеточный корецептор, состоящий из пяти различных полипептидных цепей (CD3 γ цепь, а CD3 δ цепь, две CD3 ϵ цепи и две зета-цепи). Отдельные полипептидные цепи, объединяясь, образуют комплекс из трех димеров ($\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$, $\zeta\zeta$) (Wucherpfennig, кВт et al. (2010) “*Structural Biology Of The T Cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, u Initiation of Signaling,*” Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2(4):a005140; pages 1-14; Chetty, R. et al. (1994) “*CD3: Structure, Function And The Role Of Immunostaining In Clinical Practice,*” J. Pathol. 173:303-307; Guy, C.S. et al. (2009) “*Organization of Proximal Signal Initiation at the TCR:CD3 Complex,*” Immunol Rev. 232(1):7-21; Call, M.E. et al. (2007) “*Common Themes In The Assembly And Architecture Of Activating Immune Receptors,*” Nat. Rev. Immunol. 7:841-850; Weiss, A. (1993) “*T Cell Antigen Receptor Signal Transduction: A Tale Of Tails And Cytoplasmic Protein-Tyrosine Kinases,*” Cell 73:209-212). CD3-комплекс ассоциируется с TCR для образования сигнала активации в Т-лимфоцитах. В отсутствие CD3, TCR не собирается должным образом и деградирует (Thomas, S. et al. (2010) “*Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T Cell Receptor Gene Transfer,*” Immunology 129(2):170–177). CD3 обнаруживается связанным с мембранами всех зрелых Т-клеток, и практически ни с одним другим типом клеток (см., Janeway, C.A. et al. (2005) In: IMMUNOBIOLOGY: THE IMMUNE SYSTEM IN HEALTH AND DISEASE,” 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216; Sun, Z. J. et al. (2001) “*Mechanisms Contributing To T Cell*

Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 ϵ : γ Heterodimer,” Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. *et al.* (2006) “*Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex,*” Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139).

Комплекс TCR и CD3, вместе CD3 ζ цепью дзета цепью (также известной как T3 дзета цепь Т-клеточного рецептора или CD247) составляют TCR-комплекс (van der Merwe, P.A. *et al.* (ePub Dec. 3, 2010) “Mechanisms For T Cell Receptor Triggering,” Nat. Rev. Immunol. 11:47-55; Wucherpfennig, K.W. *et al.* (2010) “*Structural Biology of the T cell Receptor: Insights into Receptor Assembly, Ligand Recognition, u Initiation of Signaling,*” Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2:a005140). Комплекс имеет особое значение, так как он содержит большое количество (десять) активационных тирозинсодержащих мотивов иммунорецепторов (ITAM).

Два взаимодействия необходимы для активации Т-клеток (Viglietta, B. *et al.* (2007) “*Modulating Co-Stimulation,*” Neurotherapeutics 4:666-675; Korman, A.J. *et al.* (2007) “*Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,*” Adv. Immunol. 90:297-339). В первом взаимодействии клетка должна демонстрировать релевантный антиген, связанный с главным комплексом гистосовместимости, так чтобы он мог связываться с Т-клеточным рецептором («TCR») наивного Т-лимфоцита. Во втором взаимодействии лиганд клетки должен связываться с корецептором Т-лимфоцита (Dong, C. *et al.* (2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,*” Immunolog. Res. 28(1):39-48; Lindley, P.S. *et al.* (2009) “*The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,*” Immunol. Rev. 229:307-321). Т-клетки, испытывающие оба стимулирующих сигнала, затем способны реагировать на цитокины (такие как интерлейкин-2 и интерлейкин-12). При отсутствии обоих костимулирующих сигналов во время взаимодействия TCR, Т-клетки входят функционально неуправляемое состояние, называемое клонойной толерантностью (Khawli, L.A. *et al.* (2008) “*Cytokine, Chemokine, u Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors,*” Exper. Pharmacol. 181:291-328). В патологических состояниях, Т-клетки являются ключевыми игроками различных орган-специфичных аутоиммунных заболеваний, таких как диабет типа I, Ревматоидный артрит и рассеянный склероз (Dong, C. *et al.* (2003) “*Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,*” Immunolog. Res. 28(1):39-48). E

Необходимость двух сигналов для активации Т-клеток, приводящей к адаптивному иммунному ответу, как полагают, обеспечивает механизм для избежания ответов на аутоантигены, которые могут присутствовать на антиген-презентирующих клетках в тех местах в системе, где они могут быть распознаны Т-клеткой. Там, где контакт Т-клетки с

клеткой приводит к образованию только одного из двух необходимых сигналов, Т-клетки не активируются и адаптивного иммунного ответа не происходит.

II. Антитела и другие эпитопсвязывающие молекулы

A. Антитела

«Антитела» представляют собой иммуноглобулиновые молекулы, способные специфически связываться с мишенью, например углеводом, полинуклеотидом, липидом, полипептидом, и т.п., По меньшей мере, один сайт распознавания антигена расположен в переменном домене иммуноглобулиновой молекулы. При использовании в данном описании термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но и их мутанты, встречающиеся в природе варианты, слитые белки, содержащие часть антитела с сайтом распознавания антигена требуемой специфичности, гуманизированные антитела и химерные антитела, и любую другую модифицированную конфигурацию иммуноглобулиновой молекулы, которая содержит участок распознавания антигена требуемой специфичности. В данной заявке, нумерация аминокислотных остатков легких и тяжелых цепей антител соответствует индексу EU как в Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication № 91-3242. При использовании в данном описании, «антигенсвязывающий фрагмент антитела» представляет собой часть антитела, имеющую по меньшей мере, один участок распознавания антигена. При использовании в данном описании термин охватывает фрагменты (например, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), и одноцепочечные молекулы (например, scFv).

Естественные антитела (такие как IgG-антитела), состоят из двух легких цепей, образующих комплекс с двумя тяжелыми цепями. Каждая легкая цепь содержит переменный домен (VL) и константный домен (CL). Каждая тяжелая цепь содержит переменный домен (VH), три константных доменов (CH1, CH2 и CH3), и шарнирный домен, расположенный между CH1 и CH2 доменами. Основная структурная единица природных иммуноглобулинов (например, IgG), таким образом, является тетрамером, имеющим две легкие цепи и две тяжелые цепи, как правило, экспрессируясь в виде гликопротеина около 150000 Да. Аминоконцевая («N») часть каждой цепи включает переменную область примерно от 100 до 110 или более аминокислот, в первую очередь, ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая («C») часть каждой цепи определяет константную область, при этом легкие цепи имеют один константный домен, а тяжелые цепи, как правило, имеют три константных домена и шарнирную область. Таким образом, структура легких цепей молекулы IgG представляет собой n-VL-CL-c, а структура тяжелых цепей IgG представляет собой n-VH-CH1-H-CH2-CH3-c (где H

представляет собой шарнирную область, а n и с представляют собой, соответственно, N-конец и С-конец полипептида).

Способность интактного, немодифицированного антитела (например, антитела IgG) к связыванию с эпитопом антигена зависит от наличия переменных доменов на легких и тяжелых цепях иммуноглобулина (то есть VL-домен и VH-домен, соответственно). Взаимодействие легкой цепи и тяжелой цепи антитела, и, в частности, взаимодействие ее VL и VH-доменов, образует один из эпитопсвязывающих участков антитела. Переменные области IgG молекулы состоят из гиперпеременных участков (CDR), которые содержат остатки в контакте с эпитопом, и не-CDR сегменты, называемые каркасными сегментами (FR), которые в целом поддерживают структуру и определяют позиционирование CDR-петель таким образом, чтобы осуществлять такой контакт (хотя определенные каркасные остатки могут также связываться с антигеном). Таким образом, VL- и VH-домены имеют структуру n-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-с. Полипептиды, которые являются (или могут служить в качестве) первого, второго и третьего CDR легкой цепи антитела в данном описании соответственно обозначены домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2}, и домен CDR_{L3}. Аналогичным образом, полипептиды, которые являются (или могут служить в качестве) первого, второго и третьего CDR тяжелой цепи антитела в данном описании, соответственно, обозначены домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2}, и домен CDR_{H3}. Таким образом, термины домен CDR_{L1}, домен CDR_{L2}, домен CDR_{L3}, домен CDR_{H1}, домен CDR_{H2}, и домен CDR_{H3} относятся к полипептидам, которые при введении в белок, приводят к тому, что белок становится способным связываться со специфическим эпитопом вне зависимости от того, является ли такой белок антителом, имеющим легкие и тяжелые цепи, или диателом, или одноцепочечной связывающей молекулой (например, ScFv, BiTe и *m.d.*), или белком другого типа. В отличие от таких антител конструкт ScFv содержит VL- и VH-домены антитела, находящиеся в одной полипептидной цепи, в которой домены отделены гибким линкером достаточной длины так, чтобы позволить самосборку двух доменов в функциональный участок связывания эпитопа. Если самосборка VL- и VH-доменов становится невозможной из-за недостаточной длины линкера (менее чем около 12 аминокислотных остатков), два из ScFv-конструктов могут взаимодействовать друг с другом с образованием двухвалентной молекулы, в которой VL одной цепи ассоциирован с VH другой (рассмотрено в Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," Acta Pharmacol. Sin. 26:649-658).

В дополнение к их известным применениям в диагностике, антитела, как было показано, могут быть полезными в качестве терапевтических агентов. За последние

несколько десятилетий наблюдается возрождение интереса к терапевтическому потенциалу антител, и антитела стали одним из ведущих классов биотехнологически получаемых лекарственных средств (Chan, CE et al.(2009) *“The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,”* Singapore Med. J. 50(7):663-666). Около 200 лекарственных средств на основе антител были одобрены для использования или находятся в стадии разработки.

Термин «моноклональное антитело» относится к гомогенной популяции антител, где моноклональное антитело состоит из аминокислот (встречающихся в природе и не встречающихся в природе), которые участвуют в избирательном связывании антигена. Моноклональные антитела являются высоко специфичными, направленными против одного эпитопа (или антигенного сайта). Термин «моноклональное антитело» охватывает не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), одиночные цепи (ScFv), их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела и любые другие модифицированные конфигурации иммуноглобулиновой молекулы, которые содержат участок распознавания антигена требуемой специфичности и имеют способность связываться с антигеном. Термин не должен быть ограничен в отношении источника антитела или способа, которым оно получено (например, с помощью гибридом, фагового отбора, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает цельные иммуноглобулины, и их фрагменты и т.д., описанные выше в соответствии с определением «антитела». Способы получения моноклональных антител известны в данной области техники. Один из способов, который может быть использован, представляет собой способ Kohler, G. et al. (1975) *“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,”* Nature 256:495-497 или его модификации. Как правило, моноклональные антитела получают в мышах, крысах и кроликах. Эти антитела получают путем иммунизации животного иммуногенным количеством клеток, клеточных экстрактов или белковых препаратов, которые содержат целевой эпитоп. Иммуноген может представлять собой, без ограничения перечисленным, перHIVные клетки, культивированные клеточные линии, злокачественные опухолевые клетки, белки, пептиды, нуклеиновые кислоты или ткани. Клетки, используемые для иммунизации, могут наращиваться в течение определенного периода времени (например, по меньшей мере, 24 часа) до их применения в качестве иммуногена. Клетки могут быть использованы в качестве иммуногенов сами по себе или в сочетании с неденатурирующим адъювантом, таким как RIBI (см., например, Jennings, V.M. (1995) *“Review of Selected Adjuvants Used in*

Antibody Production,” ILAR J. 37(3):119-125).

В общем, клетки должны быть сохранены и предпочтительно быть жизнеспособными при использовании в качестве иммуногенов. Неповрежденные клетки позволяют иммунизированным животным лучше детектировать антигены, чем разрушенные клетки. Применение денатурирующих или жестких адъювантов, например, адъюванта Фрейнда, может привести к разрушению клеток и, следовательно, это не рекомендуется. Иммуноген может быть введен несколько раз через определенные промежутки времени, например, дважды в неделю, или еженедельно, или может быть введен таким образом, чтобы поддерживать жизнеспособность в животном (например, в тканевом рекомбинанте). В ином случае, существующие моноклональные антитела и любые другие эквивалентные антитела, которые являются иммуноспецифичными для требуемого патогенного эпитопа могут быть секвенированы и получены рекомбинантно любыми способами, известными в данной области техники. В одном воплощении, такое антитело секвенируют и полинуклеотидную последовательность затем клонируют в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, может быть сохранена в векторе в клетке-хозяине, и клетка-хозяин может быть затем размножена и заморожена для дальнейшего использования. Полинуклеотидная последовательность таких антител может быть использована для генетических манипуляций для создания химерного антитела, гуманизированного антитела или канинизированного антитела, или для улучшения аффинности или других характеристик антитела. Общий принцип гуманизации антитела включает сохранение основной последовательности антигенсвязывающей части антитела с заменой остальной части нечеловеческого антитела на последовательности человеческого антитела. Есть четыре основных стадии для гуманизации моноклонального антитела. К ним относятся: (1) определение нуклеотидной и прогнозируемой аминокислотной последовательности исходных переменных доменов легкой и тяжелой цепей антитела (2) конструирование гуманизированного антитела или канинизированного антитела, то есть определение того, каркасный участок какого антитела будет использоваться в ходе процессов гуманизации или канинизации (3) методологии/методы фактической гуманизации или канинизации и (4) трансфекция и экспрессия гуманизированного антитела. См., например, патенты США № 4816567, 5807715; 5866692; и 6331415.

Эпитопсвязывающий домен таких антител может включать либо полные переменные домены, слитые на константные домены или только гиперпеременные участки (CDR), привитые на соответствующие каркасные области в переменных

доменах. Антигенсвязывающие участки могут быть дикого типа или могут быть модифицированы с помощью одной или нескольких аминокислотных замен. Это исключает константную область как иммуноген у людей, но возможность иммунного ответа на инородные переменные области остается (LoBuglio, AF et al. (1989) “*Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Другой подход ориентирован не только на обеспечении константных областей из человека, но и на модификации переменных областей, а также на то, чтобы изменить их как можно ближе к человеческой форме. Известно, что переменные области как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гиперпеременных участка (CDR), которые изменяются в ответ на антигены, о которых идет речь, и определения способности связывания, между четырьмя каркасными областями (FRS), которые относительно консервативны в заданном виде и которые предположительно обеспечивают поддержку для CDR. Когда нечеловеческие антитела получают к конкретному антигену, переменные участки могут быть «видоизменены» или «гуманизированы» прививкой CDR, полученных из нечеловеческого антитела на FR, присутствующих в модифицируемом человеческом антителе. Применение такого подхода к различным антителам сообщалось Sato, K. et al. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) “*Reshaping Human Antibodies for Therapy,*” *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) “*Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,*” *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) “*Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,*” *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) “*Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,*” *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) “*Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) “*Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,*” *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) “*Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) “*Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,*” Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 89:4285-4289; and Co, M.S. et al. (1992) “*Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,*” *J. Immunol.* 148:1149-1154. В некоторых воплощениях гуманизированные антитела сохраняют все последовательности CDR (например, гуманизированное антитело мыши, которое содержит все шесть CDR из антител мыши). В других воплощениях, гуманизированные антитела имеют один или несколько CDR (один, два, три, четыре, пять, или шесть), которые различаются по последовательности

относительно исходного антитела.

В. Биспецифичные антитела, мультиспецифичные диатела и диатела DART™

Природные антитела, способны связываться только с одним видом эпитопа (т.е., они являются «моно-специфичными»), хотя они могут быть в состоянии связать несколько копий этого вида (то есть они могут демонстрировать бивалентность или мультивалентность). Было разработано широкое разнообразие форматов рекомбинантных биспецифичных антител (см., например, публ. РСТ № WO 2008/003116, WO 2009/132876, WO 2008/003103, WO 2007/146968, WO 2007/146968, WO 2009/018386, WO 2012/009544, WO 2013/070565), большинство из которых используют линкерные пептиды, либо для слияния антительного ядра (IgA, IgD, IgE, IgG или IgM) с дополнительным связывающим белком (например, scFv, VL VH, и т.д.), или в пределах антительного ядра, либо для слияния множественных антительных частей или для слияния (например, два Fab-фрагменты или ScFv) с доменом, способствующим гетеродимеризации, таким как домен CH2-CH3 или альтернативные полипептиды (WO 2005/070966, WO 2006/107786A WO 2006/107617A, WO 2007/046893). Как правило, такие подходы предусматривают компромиссы и уступки. Например, публ. РСТ № В WO 2013/174873, WO 2011/133886 и WO 2010/136172 раскрывают, что применение линкеров может вызвать проблемы в терапевтических планах, и сообщается, что триспецифичные антитела, в которых домены CL и CH1 переключаются из их соответствующих природных позиций, а VL- и VH-домены диверсифицируются (WO 2008/027236, WO 2010/108127) для того, чтобы дать им возможность связываться с более чем одним дополнительным антигеном. Таким образом, молекулы, описанные в этих документах, обменивают специфическое связывание на способность связывать дополнительные виды антигенов. Публикации РСТ № WO 2013/163427 и WO 2013/119903 раскрывают модификацию CH2-домена для включения слитого белкового аддукта, содержащего связывающий домен. В документе отмечается, что CH2-домен, вероятно, играет минимальную роль в опосредовании эффекторной функции. Публикации РСТ № В WO 2010/028797, WO WO2010028796 и 2010/028795 раскрывают рекомбинантные антитела, у которых Fc-домены были заменены дополнительными VL- и VH-доменами для получения трехвалентных связывающих молекул. Публикации РСТ № WO 2003/025018 и WO2003012069 раскрывают рекомбинантных диатела, чьи отдельные цепи содержат домены ScFv. Публикация РСТ № WO 2013/006544 раскрывает поливалентные молекулы Fab, которые синтезируют в виде единой полипептидной цепи и затем подвергают протеолизу с получением гетеродимерных структур. Таким образом, молекулы, описанные в этих документах обменивают все или некоторые способности опосредовать эффекторные функции на

способность связывать дополнительные виды антигенов. Публикации PCT № WO 2014/022540, WO 2013/003652, WO 2012/162583, WO 2012/156430, WO 2011/086091, WO 2007/075270, WO 1998/002463, WO 1992/022583 и WO 1991/003493 раскрывают добавление дополнительных связывающих доменов или функциональных групп с антителом или частью антитела (например, добавление диатела к легкой цепи антитела, либо добавления дополнительных VL- и VH-доменов к легким и тяжелым цепям антитела, либо добавление гетерологичного слитого белка или добавление в виде цепи множественных доменов Fab друг за другом). Таким образом, молекулы, описанные в этих документах обменивают нативную структуру антитела на способность связывать дополнительные виды антигенов.

В данной области дополнительно отмечена возможность продуцировать диатела, которые отличаются от таких естественных антител в способности связывать два или большее количество различных видов эпитопов (например, демонстрировать биспецифичность или мультиспецифичность в дополнение к бивалентности или мультивалентности) (см., например, Holliger et al. (1993) “*Diabodies*: Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; US 2004/0058400 (Hollinger et al.); US 2004/0220388 (Mertens et al.); Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672; WO 02/02781 (Mertens et al.); Olafsen, T. et al. (2004) “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,” Protein Eng Des Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) “Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single-chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange,” Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al. (2004) “A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) “Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy,” Cancer Res. 69(12):4941-4944).

Конструкция диатела основывается на структуре одноцепочечных фрагментов переменных доменов (scFv). Такие молекулы получают путем связывания переменных доменов легкой и/или тяжелой цепи друг с другом через короткий связующий пептид. Bird et al. (1988) (“*Single-Chain Antigen-Binding Proteins*,” Science 242:423-426) описывает пример связывающих пептидов, которые перекрывают приблизительно 3,5 нм между

карбокисильным концом одного вариабельного домена и аминоконцом другого вариабельного домена. Линкеры с другими последовательностями были разработаны и использованы (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," Science 242:423-426). Линкеры, в свою очередь, могут быть изменены для дополнительных функций, таких как прикрепление лекарственных средств или прикрепления к твердым носителям. Одноцепочечные варианты могут быть получены либо рекомбинантно, либо синтетически. Для синтетического производства ScFv может быть использован автоматизированный синтезатор. Для рекомбинантного получения ScFv подходящая плазмида, содержащая полинуклеотид, который кодирует ScFv, может быть введена в подходящую клетку-хозяин, либо эукариотическую, такую как дрожжи, клетка растений, насекомых или млекопитающих, либо прокариотическую, такую как *E.coli*. Полинуклеотиды, кодирующие представляющий интерес ScFv, можно получить с помощью обычных манипуляций, таких как лигирование полинуклеотидов. Полученный ScFv может быть выделен с использованием стандартных методов очистки белков, известных в данной области техники.

Пат. США 7585952 и пат. публикация США № 2010-0173978 относятся к молекулам scFv, которые иммуноспецифичны к ErbB2. Были описаны биспецифические активаторы Т-клеток (Bi-specific T cell engagers, "BiTEs"), тип молекулы scFv (WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) "BiTE: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells," Drugs of the Future 33: 137-147; Bargou, et al. 2008) "Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody," Science 321: 974-977). Такие молекулы состоят из одной молекулы полипептидной цепи, имеющей два антигенсвязывающих домена, один из которых иммуноспецифично связывается с эпитопом CD3, а второй из которых иммуноспецифично связывается с антигеном, присутствующим на поверхности клетки-мишени.

Предоставление немоноспецифичных диател обеспечивает существенное преимущество: способность к колигировать и колокализовать клетки, которые экспрессируют различные эпитопы. Бивалентные диатела, таким образом, имеют широкое применение, включая терапию и иммунодиагностику. Бивалентность допускает большую гибкость при проектировании и конструировании диатела в различных применениях, обеспечивая повышенную авидность к мультимерным антигенам, перекрестную связь различных антигенов и направленное нацеливание на специфические клеточные типы на основании наличия обоих антигенов-мишеней. Из-за их более высокой валентности, низкой скорости диссоциации и быстрого выведения из кровотока (для диатела малого размера, на уровне или ниже ~ 50 кДа), молекулы диатела, известные в данной области,

также показали конкретное применение в области визуализации опухолей (Fitzgerald et al. (1997) “*Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In Pichia pastoris*,” Protein Eng. 10:1221). Особое значение имеет совместное лигирование разных клеток, например, перекрестное сшивание цитотоксических Т-клеток с опухолевыми клетками (Staerz et al. (1985) “*Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells*,” Nature 314:628-631, and Holliger et al. (1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” Protein Eng. 9:299-305).

Двухвалентные эпитопсвязывающие домены могут быть направлены на поверхностную детерминанту любой иммунной эффекторной клетки, такой как CD3, CD16, CD32, CD64 и т.п., которые экспрессируются на Т-лимфоцитах, естественных киллерах (NK) или других мононуклеарных клетках. Во многих исследованиях также было обнаружено, что связывание диатела с детерминантами эффекторных клеток, например, Fc γ -рецепторами (Fc γ R), активирует эффекторные клетки (Холлигер et al. (1996) “*Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody*,” Protein Eng. 9:299-305; Holliger et al. (1999) “*Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3 x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7 x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins*,” Cancer Res. 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068). Как правило, активация эффекторных клеток инициируется связыванием антиген-связанного антитела с эффекторной клеткой через взаимодействие Fc-Fc γ R; таким образом, в связи с этим, двухвалентные молекулы могут проявлять Ig-подобную функциональность независимо от того, содержат ли они Fc-домен (например, на основе любого функционального эффекторного анализа, известного в данной области, или приведенного в качестве примера в данном документе (например, ADCC-анализ)). Перекрестной сшивкой опухолевых и эффекторных клеток диатело не только приводит эффекторные клетки в непосредственную близость к опухолевым клеткам, но и приводит к эффективному уничтожению опухоли (см., например, Kao et al. (2003) “*Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics*,” Adv. Drug. Deliv. Rev. 55:171-197).

Например, пат. США № 6171586 относится к производству биспецифичных антител путем протеолитического расщепления двух антител для получения их F(ab')₂-фрагментов, восстановления таких фрагментов в условиях, которые предотвращают образование межмолекулярных дисульфидных связей, а затем смешивания фрагментов для получения биспецифичных антител). Патенты США № 6551592; 6994853 и 8277806 и публ. РСТ № WO 2012/156430, WO 2002/020039, WO 2000/018806 и WO 1998/003670 касаются получения триспецифичных антител, способных одновременно связываться с Т-

клетками и другими антигенами на опухолевой клетке, и через Fc-часть биспецифичного антитела с Fc-рецептором клеток, обладающих таким рецептором. Публикации РСТ № WO 2000/018806, WO 1998/003670 и WO 2006/072152 касаются производства триспецифичных антител, способных одновременно связываться с Т-клетками и другими антигенами. Публикация пат. США № 2008-0057054 раскрывает биспецифичные конъюгаты, специфичные для связывающего элемента против олигомеров бета-амилоида и связывающего элемента против трансмембранного белка теленцефалина. Публикация пат. США № 2010-0291112 касается биспецифичных и триспецифичных одноцепочечных молекул Fv, которые специфически связываются с одним (или двумя) опухолевым антигеном(ами) и антигеном эффекторных клеток (например, CD3, CD16 CD32, CD64 и т.д.).

В публ. РСТ № WO 1999/042597 и WO 1998/006749 раскрывают производные антител, которые включают домены связывания главного комплекса гистосовместимости человека, вместе или без связанных МНС-связывающих пептидов. Публикация РСТ № WO 02/072141 касается мультиспецифичных связывающих молекул, чьи скорости ассоциации (скорости, с которыми они связываются с молекулами-мишенями) и скорости диссоциации (скорости, с которыми они высвобождают молекулы-мишени) отличаются тем, что преимущественно связываются с одной мишенью по сравнению с их связыванием с другой такой молекулой-мишенью. Триспецифичные молекулы, например, молекулы, имеющие одновалентную первую часть, которая представляет собой анти-CD3 или анти-CD28-антитело, и вторую часть, содержащую двухвалентную группу, демонстрирующую иммунную функцию, которая иммуноспецифично связывается с одним или несколькими целевыми лигандами на целевой пораженной клетке или иммунной клетке.

Пат. США N 7695936 и патентная публикация 2007/0196363 относятся к биспецифичным антителам, которые образуются из тяжелых цепей двух антител, одно из которых обладает выступающей частью, сконструированной на его тяжелой цепи, а второе из которых обладает комплементарной полостью, сконструированной на его тяжелой цепи. Присутствие таких дополнительных «выступов» и «углублений», как сообщается, преимущественно образует биспецифичные гетероантитела (имеющие одну тяжелую цепь каждого такого антитела) по сравнению с моноспецифичными гомоантителами, которые содержат две тяжелые цепи одного и того же антитела. Предложены различные биспецифичные гетероантитела, в том числе и те, которые являются иммуноспецифичными для CD3 и антигена опухолевых клеток. Также предложены различные триспецифичные гетероантитела, в том числе такие, которые являются иммуноспецифичными для CD3, CD8 и CD37 (трансмембранный белок,

экспрессируемый преимущественно на В-клетках, которые участвуют в регуляции пролиферации Т-клеток (Robak, T. et al. (2014) “*Anti-CD37 Antibodies For Chronic Lymphocytic Leukemia*,” *Expert Opin. Biol. Ther.* 14 (5): 651-661), однако, никакого механизма для их производства и раскрытия их структуры не предусмотрено.

Публикация РСТ WO2012-162561 касается биспецифических, тетравалентных связывающих молекул, которые включают два полипептида, каждый из которых состоит из двух двухвалентных структур, разделенных промежуточным CH₂-CH₃ доменом. Этот документ также относится к четырехвалентным связывающим молекулам, состоящим из четырех полипептидных цепей, в которых две из полипептидных цепей содержат переменные домены легкой и тяжелой цепей для двух антигенов, и где остальные две полипептидные цепи содержат комплементарные переменные домены тяжелой цепи и переменные домены легкой цепи для антигенов и концевой CH₂-CH₃-домен. Биспецифические, тетравалентные связывающие молекулы образуются через ассоциацию их соответствующих CH₂-CH₃-доменов. В конструкции из четырех полипептидных цепей, «легкие» цепи не ковалентно связаны с тяжелыми цепями, что приводит к нестабильности (см., Lu, D. et al. (2005) “*A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity*,” *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672). В этом документе описан третий конструкт, в котором цепи изменяются для того, чтобы обеспечить такую ковалентную связь, но за счет устранения их биспецифичности (т.е. молекулы являются моно-специфичными). Раскрыты молекулы, имеющие специфичность к CD2, CD3, CD4, CD8, CD161, рецептору хемокинов, CD95, CCR5 и т.д. Биспецифические молекулы, способные связываться как CD3, так и с CD8, не раскрыты.

Тем не менее, вышеуказанные преимущества подразумевают заметную стоимость. Формирование таких *не*-моноспецифических диател требует успешной сборки двух или более отдельных и различных полипептидов (то есть такое образование требует, чтобы диатела формировались через гетеродимеризацию различных видов полипептидной цепи). Это отличается от моноспецифических диател, которые образуются через гомодимеризации идентичных полипептидных цепей. Поэтому должно быть предусмотрено, по меньшей мере, два разнородных полипептида (например, два вида полипептидов) для того, чтобы сформировать немоноспецифическое диатело, и потому что из-за гомодимеризации таких полипептидов получают неактивные молекулы (Takemura S. et al. (2000) “*Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System*,” *Protein Eng.* 13(8):583-588), производство таких полипептидов должно быть выполнено таким образом, чтобы предотвратить ковалентную связь между полипептидами одного вида

(Takemura, S. et al. (2000) “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” *Protein Eng.* 13(8):583-588). В данной области, таким образом, сообщается о нековалентной ассоциации таких полипептидов (см., например, Olafsen et al. (2004) “Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications,” *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) “A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain,” Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) “Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System,” *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

Тем не менее, в данной области признано, что биспецифичные диатела, состоящие из нековалентно связанных полипептидов неустойчивы и легко распадаются на нефункциональные мономеры (см., например, Lu, D. et al. (2005) “A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity,” *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672).

Перед лицом этой проблемы, в данной области удалось создать стабильные, ковалентно связанные гетеродимерные немоноспецифичные диатела, обозначенные как DART™ (см., например, публикации пат. США № 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; публикации Европейских патентов № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и публ. PCT № WO 2012/162068, WO 2012/018687, WO 2010/080538, и Moore, P.A. et al. (2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) “Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ3 Receptor IiB (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,” *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) “Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,” *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449). Такие диатела содержат два или более полипептидов, ковалентно связанных с образованием комплекса, и включают конструирование одного или несколько остатков цистеина в каждый из используемых видов полипептидов, которые позволяют образование дисульфидных связей и тем самым образование ковалентной связи двух полипептидных цепей. Например, добавление остатка цистеина на С-конце таких конструкций, как было показано, обеспечивает

дисульфидную связь между полипептидными цепями, стабилизацию получаемого гетеродимера, не мешая при этом свойствам связывания двухвалентной молекулы.

Есть множество воплощений DART™. Каждый из двух полипептидов в простейшем воплощении DART™ состоит из трех доменов (фигура 1A). Первый полипептид содержит: (i) первый домен, который содержит связывающую область переменного домена легкой цепи первого иммуноглобулина (VL1), (ii) второй домен, который содержит связывающую область переменного домена тяжелой цепи второго иммуноглобулина (VH2), и (iii), третий домен, который содержит остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) и домен, способствующий гетеродимеризации, который служит для содействия гетеродимеризации со второй полипептидной цепью (фигура 1B). Остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) третьего домена служит для содействия ковалентного связывания первой полипептидной цепи со второй полипептидной цепью диатела. Второй полипептид содержит: (i) комплементарный первый домен (VL2-содержащий домен), (ii) комплементарный второй домен (VH1-содержащий домен) и (iii), третий домен, содержащий остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) и, необязательно, комплементарный домен, способствующий гетеродимеризации, который образует комплекс с доменом, способствующим гетеродимеризации первой полипептидной цепи, с тем, чтобы содействовать гетеродимеризации с первой полипептидной цепью. Остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) третьего домена второй полипептидной цепи служит для содействия ковалентному связыванию второй полипептидной цепи с первой полипептидной цепью диатела. Такие молекулы являются стабильными, сильнодействующими и обладают способностью связывать одновременно два или более антигенов. Они способны содействовать перенаправленному опосредованному Т-клетками уничтожению клеток, экспрессирующих антигены-мишени.

В одном воплощении третьи домены первого и второго полипептидов содержат остаток цистеина, который служит для связывания полипептидов через дисульфидную связь. Третий домен одного или обоих полипептидов могут дополнительно обладать последовательностью CH2-CH3-домена, так чтобы комплекс полипептидов диатела образует Fc-домен, который способен связываться с Fc-рецептором клеток (таких, как В-лимфоциты, дендритные клетки, естественные клетки-киллеры, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и тучные клетки) (фигуры 2A-2B).

Было описано множество вариаций таких молекул (см., например, публикации пат. США № 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; Публикации Европейского патента № EP 2714079, EP 2601216, EP 2376109, EP 2158221 и публ. PCT № WO 2012/162068, WO

2012/018687, WO 2010/080538). Эти Fc-несущие DARTTM могут включать три полипептидные цепи (пример на фигуре 2B). Первая полипептидная цепь такого диатела содержит три домена: (i) а VL1-содержащий домен, (ii) а VH2-содержащий домен и (iii) домен, содержащий остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) и домен, способствующий гетеродимеризации, и (iv) остаток цистеин (или цистеинсодержащий домен и CH3-CH2-домен. Вторая полипептидная цепь такого DARTTM содержит: (i) а VL2-содержащий домен, (ii) а VH1-содержащий домен и (iii) домен, содержащий остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) и домен, способствующий гетеродимеризации, который способствует гетеродимеризации с первой полипептидной цепью. Остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) третьего домена второй полипептидной цепи служит для содействия ковалентному связыванию второй полипептидной цепи с первой полипептидной цепью диатела. Третий полипептид такого DARTTM содержит остаток цистеина (или цистеинсодержащий домен) и CH2-CH3-домен. Таким образом, первая и вторая полипептидные цепи такого DARTTM ассоциированы вместе для того, чтобы сформировать сайт связывания VL1/VH1, который способен связываться с эпитопом, и сайт связывания VL2/VH2, который способен связываться со вторым эпитопом. Первый и второй полипептиды связаны друг с другом через дисульфидную связь с участием остатков цистеина в пределах их соответствующих третьих доменов. Следует отметить, что первая и третья полипептидные цепи образуют комплекс друг с другом с образованием Fc-домена, который стабилизирован через дисульфидную связь. Такие диатела обладают повышенной активностью. Такие Fc-несущие DARTTM могут иметь любую из двух ориентаций (таблица 1):

Таблица 1		
Первая ориентация	3-я цепь	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1-я цепь	NH ₂ -VL1-VH2-Cys-домен, способствующий гетеродимеризации-CH ₂ -CH ₃ -COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-Cys-домен, способствующий гетеродимеризации-COOH
Вторая ориентация	3-я цепь	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
	1-я цепь	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-Cys-домен, способствующий гетеродимеризации-COOH
	2-я цепь	NH ₂ -VL2-VH1-Cys-домен, способствующий гетеродимеризации-COOH

Еще более сложные диатела DARTTM, названные Ig-DARTTM (фигуры 3A-3B) и диатела Fc-DARTTM (фигура 3C) были описаны (WO 2012/018687). Fc-DARTTM имеют четыре полипептидные цепи. Первая и третья полипептидные цепи такого диатела содержат три домена: (i) VL1-содержащий домен, (ii) VH2-содержащий домен и (iii),

домен, содержащую последовательность CH2-CH3. Второй и четвертый полипептид с Fc-DART™ содержат: (i) VL2-содержащий домен, (ii) VH1-содержащий домен и (iii) домен, способствующий гетеродимеризации и ковалентному связыванию с первой полипептидной цепью Fc-DART™. Третья и четвертая, и первая и вторая полипептидные цепи, могут быть одинаковыми или различными, с тем, чтобы сделать возможным четырехвалентное связывание, которое является либо моноспецифичным, биспецифичным или тетраспецифичным. Такие более сложные молекулы DART™ обладают также цистеинсодержащими доменами, функция которых заключается в образовании ковалентно связанного комплекса. Диатела Fc-DART™ содержат домены CH1 и CL.

Альтернативные конструкции известны в данной области техники для применений, где целевой является четырехвалентная молекула, в которой Fc не требуется, включая, без ограничения перечисленным, четырехвалентные тандемные антитела, которые также называют «TandAb» (см., например, публикации пат. США № 2005 -0079170, 2007-0031436, 2010-0099853, 2013-0189263 2011-020667, публикации Европейского патента № EP 1078004, EP 2371866, EP 2361936 и EP 1293514; публ. PCT № WO 1999/057150, WO 2003/025018, и WO 2013/013700), которые образуются при гомодимеризации двух идентичных цепей, каждая из которых несет домены VH1, VL2, VH2 и VL2.

III. Перенаправленное уничтожение

Как обсуждалось выше, взаимодействие между CD8, MHC I и T-клеточным рецептором приводят к активации цитотоксических T-клеток и их способности уничтожать соседние клетки. Биспецифичные диатела, которые связываются с CD3 и с антигеном злокачественной опухоли, могут быть использованы для колокализации цитотоксических CD8⁺ T-клеток в опухолевых клетках, приводя к «перенаправленному уничтожению» таких клеток (WO 2010/080538, WO 2012/018687, WO/2012/162068, US 2010/0174053, US 2013/0295121).

Тем не менее, усилия для лечения злокачественных опухолей или инфекционных заболеваний путем колокализации CD3⁺ T-клеток в очаге опухолевых или патогенных клеток не были полностью успешными. Антитела, которые нацелены на CD3, связываются как с CD3⁺CD8⁺ цитотоксическими T-клетками, так и с клетками CD3⁺CD4⁺ Т-хелперами, что приводит к активации обоих типов клеток. Цитокины, продуцируемые активированными CD3⁺CD4⁺ Т-хелперами, однако, вносят свой вклад в тяжелые побочные эффекты, например, опасные для жизни цитокиновые бури (Ferran, S. et al. (1990) “Cytokine-Related Syndrome Following Injection Of Anti-CD3 Monoclonal Antibody: Further Evidence For Transient In Vivo T Cell Activation,” Eur. J. Immunol. 20:509-515).

Кроме того, такие анти-CD3 антитела связываются с другими типами клеток, в том числе CD3⁺CD4⁻CD8⁻ двойными отрицательными Т-клетками, и *m.д.*, которые экспрессируют цитокины при активации (Johansson, Martina et al. (2003) “*A Unique Population of Extrathymically Derived $\alpha\beta$ TCR⁺ CD4⁻ CD8⁻ T Cells with Regulatory Functions Dominates the Mouse Female Genital Tract,*” J. Immunol. 170:1659-1666; Blank, C. et al. (2003) “*Absence of Programmed Death Receptor 1 Alters Thymic Development and Enhances Generation of CD4/CD8 Double-Negative TCR-Transgenic T Cells,*” J. Immunol. 171:4574-4581; McIntyre, M.S.F. et al. (2011) “*Consequences Of Double Negative Regulatory T Cell And Antigen Presenting Cell Interaction On Immune Response Suppression,*” Intl. Immunopharmacol. 11:597-603), и которые подавляют цитотоксичность, опосредованную CD3⁺CD8⁺ Т-клетками (Hillhouse, E.E. (2013) “*A Comprehensive Review Of The Phenotype And Function Of Antigen-Specific Immunoregulatory Double Negative T Cells,*” J. Autoimmun. 40:58-65).

Было высказано предположение, что выработки цитокинов, связанной с введением антител, которые нацелены на CD3, можно было бы избежать с помощью биспецифических антител, которые нацелены на CD8 и опухолевый антиген (Michalk, I. et al. (2014) “*Characterization of a Novel Single-Chain Bispecific Antibody for Retargeting of T Cells to Tumor Cells via the TCR Co-Receptor CD8,*” PLOS One 9(4):e95517, pages 1-8). Поэтому были изучены анти-CD8 антитела для того, чтобы определить, будут ли они способны вызывать эффекторную функцию при использовании по отдельности. Clement, M. et al. сообщили, что шести из семи протестированных антител против человеческого CD8 не удалось активировать CD8⁺ Т-клетки, но что такая активация может быть достигнута с использованием очень высоких концентрациях (10-100 мкг/мл) против антитела против человеческого CD8 «ОКТ8» (Clement, M. et al. (2011) “*Anti-CD8 Antibodies Can Trigger CD8⁺ T Cell Effector Function In The Absence Of TCR Engagement And Improve Peptide-MHCI Tetramer Staining,*” J. Immunol. 187(2):654-663). Для такого эффекта требовалось кооперативное связывание с двумя молекулами CD8⁺, так как было обнаружено, что фрагменты ОКТ8 F(ab)₂ способны опосредовать данный эффект, в то время как ОКТ8 Fab оказались неспособными сделать это.

Таким образом, несмотря на такие исследования, цитокин-опосредованная токсичность, при которой уделяется внимание применению анти-CD4 или анти-CD8 антител, не полностью изучена. Исследования показали, что цитокиновая токсичность, наблюдаемая при введении анти-CD3-антитела, не устраняется истощением CD3⁺ CD4⁺ Т-клеток или путем удаления CD3⁺ CD8⁺ Т-клеток. Таким образом, как CD3⁺ CD4⁺ Т-клетки, так и CD3⁺ CD8⁺ Т-клетки способствуют токсическому воздействию анти-CD3 антитела, и относительно небольшое количество клеток необходимо для опосредования полного

эффекта (Finck, B.K. et al. (1992) “*The Role Of T-Cell Subsets In The Response To Anti-CD3 Monoclonal Antibodies,*” Clin Immunol Immunopathol. 1992 Dec;65(3):234-41).

Кроме того, биспецифичные антитела, которые нацелены на CD8 и опухолевый антиген, не являются специфичными для CD3⁺ CD8⁺ Т-клеток и опухолевых клеток, но скорее специфичны только для CD8⁺-клеток и опухолевых клеток. В частности, подмножество CD3⁻ CD8⁺ естественных киллеров (NK) будет мишенью такого антитела. Такие клетки, которые представляют собой большинство NK-клеток, являются мощными производителями цитокинов, и их активация, вероятно, будет способствовать цитокиновой буре. CD3⁻ CD8⁺ NK-клетки являются основным источником IFN-гамма у HIV-1-инфицированных шимпанзе (Rodriquez, A.R. et al. (2007) “*Influence Of Interleukin-15 On CD8+ Natural Killer Cells In Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Chimpanzees,*” J. Gen. Virol. 88:641-651).

Следовательно, несмотря на все предыдущие достижения, остается потребность в улучшенных композициях, способных более энергично направлять иммунную систему организма на атаку клеток злокачественных опухолей или патоген-инфицированных клеток, особенно при более низких терапевтических концентрациях. Как подробно описано ниже, настоящее изобретение направлено на удовлетворение этой потребности путем предоставления триспецифичных связывающих молекул, которые связываются с: (1) эпитопом CD3, (2) эпитопом CD8, и (3) эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием, который экспрессируется на клетке-мишени (особенно клетке злокачественной опухоли, или патоген-инфицированной клетке) и опосредует скоординированному связыванию цитотоксических Т-клеток с клетками, презентующими антиген, ассоциированный с заболеванием.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к триспецифичным связывающим молекулам, которые являются полипептидными молекулами из нескольких цепей, и которые обладают тремя связывающими доменами и таким образом способны опосредовать скоординированное связывание с тремя эпитопами. Связывающие домены могут быть выбраны таким образом, что триспецифичные связывающие молекулы были способны связаться с любыми тремя различными эпитопами. Такие эпитопы могут представлять собой эпитопы одного и того же антигена или эпитопы из двух или трех различных антигенов. Изобретение также относится к новому ROR1-связывающему антителу и его производным и к применениям таких композиций.

Настоящее изобретение, в частности, относится к воплощению таких триспецифичных связывающих молекул, в которых три эпитопа выбраны таким образом,

что один или два из таких эпитопов являются эпитопом(ами) клетки иммунной системы, и, в особенности, клетки иммунной системы-цитотоксического лимфоцита (CTL), и в котором остальные эпитопы являлись эпитопами антигена, ассоциированного с заболеванием. Такие особенно предпочтительные триспецифичные связывающие молекулы способны локализовать цитотоксический лимфоцит на клетке, которая экспрессирует антиген, ассоциированный с заболеванием, и тем самым облегчают уничтожение клеток, которые экспрессируют антиген, ассоциированный с заболеванием. Антиген, ассоциированный с заболеванием, может быть антигеном злокачественной опухоли, или может представлять собой антиген, который характерен для патогена (например, бактериальной, грибной, вирусной или протозойной) инфекции. Более конкретно, изобретение относится к таким триспецифичным связывающим молекулам, которые способны опосредовать скоординированное связывание с: (1) эпитопом CD3, (2) эпитопом CD8, и (3) эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием. Путем связывания с CD3 и CD8, и с антигеном, ассоциированным с заболеванием, такие молекулы колокализуют цитотоксические Т-клетки и клетки, презентующие антиген, ассоциированный с заболеванием, что приводит к активации таких Т-клеток и инициации цитотоксической реакции против клеток, экспрессирующих антиген, ассоциированный с заболеванием.

Более подробно, настоящее изобретение относится к триспецифичной связывающей молекуле, способной иммуноспецифично связываться с тремя различными эпитопами, где связывающая молекула, содержащая четыре различных полипептидных цепи, ковалентно объединенных в комплекс, включает:

(I) антигенсвязывающий домен I, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом I, присутствующим на первом антигене, и антигенсвязывающий домен II, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом II на втором антигене, где антигенсвязывающий домен I и антигенсвязывающий домен II, оба являются связывающими доменами по типу диатела;

(II) антигенсвязывающий домен III, не принадлежащий к типу диатела, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом III на третьем антигене; и

(III) Fc-домен, который образуется за счет объединения друг с другом в комплекс двух CH2-CH3-доменов.

где первый, второй и третий антигены являются одинаковыми или независимо являются одинаковыми или отличными от других антигенов.

В частности, изобретение относится к воплощению такой триспецифичной связывающей молекулы, в которой один из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III

представляет собой эпитоп клеточного рецептора.

Кроме того, изобретение относится к воплощениям таких триспецифичных связывающих молекул, в которых один из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием (и в особенности, когда антиген, ассоциированный с заболеванием представляет собой антиген злокачественной опухоли, который расположен на поверхности злокачественной опухолевой клетки, или представляет собой патогенный антиген, который расположен на поверхности патогена или патоген-инфицированной клетки).

В частности, изобретение относится к воплощению таких триспецифичных связывающих молекул, где Fc-домен способен связываться с Fc-рецептором, расположенным на поверхности клетки.

Изобретение, в частности, касается воплощений таких триспецифичных связывающих молекул, в которых один из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп CD3, второй из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп CD8, и третий из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием, и где антигенсвязывающие домены I, II и III триспецифичной связывающей молекулы, опосредуют скоординированное связывание цитотоксической Т-клетки и клетки экспрессирующей антиген, ассоциированный с заболеванием. Изобретение в частности относится к воплощениям таких триспецифичных связывающих молекул, где CD3, CD8 презентированы на поверхности Т-клетки, и где антиген, ассоциированный с заболеванием презентирован на поверхности злокачественной опухолевой клетки, патогена или патоген-инфицированной клетки, и где иммуноспецифического связывания достаточно для колокализации CD3, CD8 и антигена, ассоциированного с заболеванием, тем самым облегчая активацию CD8⁺Т-клеток против клетки, презентирующей антиген, ассоциированный с заболеванием.

Кроме того, изобретение относится к воплощению вышеописанных триспецифичных связывающих молекул, где связывающий домен III, не относящийся к типу диател, включает связывающий домен Fab-типа (VL_{III}/VH_{III}), который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом III, и где молекула включает:

(A) первую полипептидную цепь:

(I), которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, способного связываться с первым из трех эпитопов (VL_I);

(2) переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способного связываться

со вторым из трех эпитопов (VH_{II});

(3) (а) первый цистеинсодержащий домен; и домен, способствующий гетеродимеризации; или

(b) цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации;

(5) второй цистеинсодержащий домена; и

(6) CH₂- и CH₃-домены IgG;

или

(II), который содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) первый цистеинсодержащий домен;

(2) CH₂- и CH₃-домены IgG;

(3) вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, способного связываться с первым из трех эпитопов (VL_I);

(4) вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способного связываться со вторым из трех эпитопов (VH_{II});

(5) (а) второй цистеинсодержащий домен; и домен, способствующий гетеродимеризации; или

(b) цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации;

(B) вторую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, способного связываться со вторым из трех эпитопов (VL_{II});

(2) вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способного связываться с первым из трех эпитопов (VH_I);

(3) (а) первый цистеинсодержащий домен; и домен, способствующий гетеродимеризации; или

(b) цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации;

в котором домен, способствующий гетеродимеризации, второй полипептидной цепи комплементарен домену, способствующему гетеродимеризации, первой полипептидной цепи;

(C) третью полипептидную цепь, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способного связываться с третьим из трех эпитопов (VH_{III}); и

(2) CH₁-домен, цистеинсодержащий шарнирный домен, и CH₂-CH₃-домен IgG;

и

(D), четвертую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, способного связываться с третьим из трех эпитопов (VL_{III}); и

(2) цистеинсодержащий константный домен легкой цепи (CL);

где:

(i) домены VL_I и VH_I ассоциируются с образованием домена, способного связываться с первым эпитопом;

(ii) домены VL_I и VH_{II} ассоциируются с образованием домена, способного связываться со вторым эпитопом;

(iii) домены VL_{III} и VH_{III} ассоциируют с образованием домена, способного связываться с третьим эпитопом;

(iv) CH2-CH3-домен первой полипептидной цепи и CH2-CH3-домен третьей полипептидной цепи ассоциируют с образованием Fc-домена;

(v) первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом;

(vi) первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом; и

(vii) третья и четвертая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом.

Кроме того, изобретение относится к воплощениям вышеописанных триспецифичных связывающих молекул, где:

(A) домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой E-спираль, а комплементарный домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой K-спираль; или

(B) домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой K-спираль, а комплементарный домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой E-спираль.

Кроме того, изобретение относится к воплощениям вышеописанных триспецифичных связывающих молекул, где:

(A) CH2-CH3-домены первой и третьей полипептидных цепей каждый имеют последовательность SEQ ID NO: 1, таким образом, что Fc-домен, образованный при их объединении проявляет нормальную FcγR-опосредованную эффекторную функцию; или

(B) CH2-CH3-домен первой и третьей полипептидных цепей содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену по отношению к последовательности SEQ ID NO: 1, таким образом, что Fc-домен, образованный при их объединении, демонстрирует видоизмененную FcγR-опосредованную эффекторную функцию.

Кроме того, изобретение относится к воплощению таких триспецифичных

связывающих молекул, где CH₂-CH₃-домены первой и третьей полипептидных цепей отличаются друг от друга и имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

Кроме того, изобретение относится к воплощениям вышеописанных триспецифичных связывающих молекул, где:

(A) эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III, соответственно, представляют собой эпитоп CD3, эпитоп CD8 и эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием;

(B) эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп CD3, эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием и эпитоп CD8;

(C) эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп CD8, эпитоп CD3, и эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием;

(D) эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп CD8, эпитоп антиген, ассоциированный с заболеванием и эпитоп CD3;

(E) эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием, эпитоп CD3, и эпитоп CD8; или

(F) эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием, эпитоп CD8, а эпитоп CD3.

Кроме того, изобретение относится к воплощениям вышеописанных триспецифичных связывающих молекул, где:

(A) эпитоп CD3 представляет собой эпитоп CD3, распознаваемый антителом ОКТ3, M291, YTH12.5, CD3 mAb 1 или CD3 mAb 2; или

(B) эпитоп CD8 представляет собой эпитоп CD8, распознаваемый антителом TRX2 или ОКТ8.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит описанную выше триспецифичную связывающую молекулу и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, который включает введение эффективного количества описанной выше фармацевтической композиции индивидууму, нуждающемуся в этом, где антиген, ассоциированный с заболеванием, является антигеном злокачественной опухоли.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения заболевания, ассоциированного с присутствием патогена, причем способ включает введение эффективного количества фармацевтической композиции по пункту 15 индивидууму, нуждающемуся в этом, где антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой антиген патогена.

Кроме того, изобретение относится к анти-ROR1 антителу или ROR1-связывающему фрагменту, где антитело содержит:

(А) вариабельный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 117, CDR_{L2}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 118, и CDR_{L3}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 119; и

(В) вариабельный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 120, CDR_{H2}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 121, и CDR_{H3}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 122.

Кроме того, изобретение относится к воплощениям такого анти-ROR1 антитела или ROR1-связывающего фрагмента, где антитело содержит вариабельный домен легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 51. Кроме того, изобретение дополнительно относится к воплощениям таких анти-ROR1 антител или ROR1-связывающих фрагментов, причем антитело содержит вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 52, или одновременно вариабельный домен легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 51, и вариабельный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 52.

Кроме того, изобретение относится к диателу, ViTe или одноцепочечному антителу, которые содержат ROR1-связывающий фрагмент по любому из таких пунктов анти-ROR1 антитела.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, которая содержит любое из описанных выше анти-ROR1 антител или ROR1-связывающих фрагментов и фармацевтически приемлемый носитель, наполнитель или разбавитель. Кроме того, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, который включает введение эффективного количества такой фармацевтической композиции индивидууму, нуждающемуся в этом.

Краткое описание чертежей

Фигуры 1А-1В демонстрируют схематическое представление областей диатела DART™. На фигуре 1А показано схематическое представление доменов основного диатела DART™. Фигура 1В представляет собой схему ковалентно связанного диатела, состоящего из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет домен, способствующий гетеродимеризации, VL- и VH-домены, которые распознают один и тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения.

Фигуры 2А-2В обеспечивают схематическое изображение ковалентно связанных диател, состоящих из двух полипептидных цепей, каждая из которых имеет CH2- и CH3-домен (фигура 2А) или в которых только одна имеет CH2- и CH3-домен (фигура 2В), так,

что связанные цепи образуют Fc-домен, который включает весь или часть встречающегося в природе Fc-домена. VL- и VH-домены, которые распознают один тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения.

Фигуры 3А-3С обеспечивают схематическое изображение, показывающие четырехвалентные диатела, состоящие из двух пар полипептидных цепей. Пары являются различными, что дает бикспецифичную молекулу, которая двухвалентна по отношению к каждому из двух эпитопов, в которых один эпитоп DR5, а другой эпитоп молекулы, присутствующей на поверхности эффекторной клетки. Один полипептид из каждой пары обладает CH2- и CH3-доменом, так что соответствующие цепи образуют Fc-домен, который включает все или часть встречающегося в природе Fc-домена. VL- и VH-домены, которые распознают один тот же эпитоп, показаны с использованием одинакового затенения. Только одна пара эпитопов (показаны одинаковой штриховкой) способна связываться с DR5. На фигуре 3А демонстрируется Ig-диатело. На фигуре 3В показано Ig-диатело, которое содержит E-спиральный и K-спиральный домены, способствующие гетеродимеризации. Фигура 3С демонстрирует диатело Fc-DART™, которое содержат антительные CH1- и CL-домены. Обозначение «VL1» и «VH1» обозначают соответственно переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связывают «первый» эпитоп. Аналогичным образом, обозначение «VL2» и «VH2» обозначают соответственно, переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи, которые связывают «второй» эпитоп.

Фигуры 4А-4L обеспечивают схематическое представление доменов предпочтительных триспецифичных связывающих молекул. Фигуры 4А и 4В, соответственно, схематически иллюстрируют домены предпочтительных триспецифичных связывающих молекул, в которых связывающий домен, не относящийся к типу диатела, из триспецифичных связывающих молекул представляет собой связывающий домен Fab-типа, или домен, связывающий T-клеточный рецептор. Фигуры 4С и 4D, соответственно, схематически иллюстрируют домены предпочтительных триспецифичных связывающих молекул, имеющих различные ориентации доменов, в которых связывающий домен, не принадлежащий к типу диател, представляет собой связывающий домен Fab-типа или связывающий домен по типу T-клеточного рецептора. Фигуры 4Е-4J изображают похожие молекулы, имеющие три полипептидные цепи. Молекула может обладать шарнирным и CL-доменами (фигуры 4Е, 4Н) или может содержать альтернативный линкерный пептид (фигура 4F, 4I). На фигурах 4К-4L изображены похожие молекулы, имеющие пять полипептидных цепей.

Фигуры 5А-5D демонстрируют способность триспецифичной связывающей

молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 связываться с клетками-мишенями А498 (фигура 5А) и клетками-мишенями JMT-1 (фигура 5В), РВМС, которые селектированы по CD5⁺/CD4⁻ (фигура 5С) и РВМС, которые селектированы по CD5⁺/CD4⁺ (фигура 5D).

Фигуры 6А-6С демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению опосредовать перенаправленное уничтожение клеток-мишеней. На фигуре 6А показаны результаты люциферазного анализа лизиса клеток JMT-1. На фигуре 6В показаны результаты LDH-анализа цитотоксичности на клетках JMT-1. На фигуре 6С показаны результаты LDH-анализа цитотоксичности на клетках А498.

Фигуры 7А-7D демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению опосредовать активацию Т-клеток при инкубации с клетками JMT-1 (фигура 7а: CD4/CD69 Т-клетки; фигура 7В: CD4/CD25, Т-клетки; фигура 7С: CD8/CD69 Т-клетки; фигура 7D: CD8/CD25 Т-клетки).

Фигуры 8А-8D демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению опосредовать активацию Т-клеток при инкубации с клетками А498 (фигура 8А: CD4/CD69 Т-клетки; фигура 8В: CD4/CD25 Т-клетки; фигура 8С: CD8/CD69 Т-клетки; фигура 8D: CD8/CD25, Т-клетки).

Фигуры 9А-9В демонстрируют клеточные популяции человеческих РМВС, селектированные по CD5⁺CD4⁺ (фигура 9А) или по CD5⁺CD4⁻ (фигура 9В) в зависимости от возрастающей концентрации триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 или триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2. В7-Н3 X CD3 DART™ (с и без Fc-домена) использовали в качестве контроля.

Фигуры 10А-10С демонстрируют влияние различных CD8-связывающих доменов на цитотоксичность триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8.

Фигуры 11А-11С демонстрируют способность модулировать связывание триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению путем выбора Сайта А, Сайта В или Сайта С для CD3-связывающего домена. Использованные триспецифичные связывающие молекулы были способны иммуноспецифично связываться с антигеном В7-Н3, ассоциированным с заболеванием. Цитотоксичность измеряли с помощью люциферазного анализа.

Фигуры 12А-12С демонстрируют влияние позиционного отбора (Сайт А, Сайт В или Сайт С) на цитотоксичность, опосредуемую триспецифичными связывающими молекулами по настоящему изобретению с использованием LDH-анализа.

Фигуры 13А-13Е демонстрируют влияние позиционной вариации на цитотоксичность с использованием триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, А CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/В7-Н3 mAb 1 и триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2. В7-Н3 X CD3 DART™ с Fc-доменом использовали в качестве контроля.

Фигуры 14А-14В, размещение CD3-связывающего домена на сайте С значительно уменьшает связывание как с CD5⁺ CD4⁺ клетками (фигура 14А), так и с CD5⁺ CD4⁻ клетками (фигура 14В).

Фигуры 15А-15В демонстрируют клеточные популяции человеческих РМБС, селектированных по CD5⁺ CD4⁺ (15А) или по CD5⁺ CD4⁻ (фигура 15В) в зависимости от возрастающей концентрации триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3-mAb 2/CD8 mAb 1 т или триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2. 5Т4 X CD3 DART™ (с и без Fc-домена) использовали в качестве контроля.

Фигуры 16А-16С демонстрируют, что наблюдаемый эффект позиционной вариации на цитотоксичность не зависит от используемого CD8-связывающего домена.

Фигуры 17А-17С демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению опосредовать перенаправленное уничтожение клеток-мишеней, экспрессирующих ROR1.

Фигуры 18А-18С демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 связываться с растворимым, иммобилизованным белком GP140 (фигура 18А), CD3 человека (фигура 18В) и с белком GP140 и CD3 человека одновременно (фигура 18С).

Фигуры 19А-19С демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, связывать HIV env-экспрессирующие клетки НЕК293/D375 в отличие от контрольной триспецифичной связывающей молекулы (фигура 19С).

Фигуры 20А-20В демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 связываться для проявления специфичного связывания с CD5⁺/CD5⁻ клеточной популяцией человеческих РВМС.

Фигуры 21А-21F демонстрируют цитотоксическую активность, опосредованную триспецифичной связывающей молекулой HIV mAb 1/CD3-mAb 2/CD8 mAb 1 или HIV-mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 на клетки Jurkat в присутствии или в отсутствие тетрациклина (фигуры 21А-21В; фигуры 21С-21D). Фигуры 21Е-21F демонстрируют цитотоксическую активность контрольного анти-RSV-антитела (Паливизумаб; RSV mAb

1) триспецифичной связывающей молекулы.

Фигуры 22А-22В демонстрируют процент живых HIV env-экспрессирующих клеток Jurkat 522 FУ на первый день и второй день после инкубации с очищенными пан-Т-клетками и триспецифичной связывающей молекулой HIV-mAb 1/CD3-mAb 2/CD8 mAb 1 или HIV-mAb 2/CD3-mAb 2/CD8 mAb 1.

Фигуры 23А-23С демонстрируют результаты оценки CTL-активности триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 на HIV env-экспрессирующих клетках Jurkat 522 FУ с использованием CD4⁺, CD8⁺ или пан-Т-клеток.

Фигуры 24А-24С демонстрируют результаты оценки CTL-активности триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 на HIV env-экспрессирующих клетках Jurkat 522 FУ с использованием CD4⁺, CD8⁺ или пан-Т-клеток.

Фигуры 25А-25С демонстрируют кинетику связывания для молекул DART™, имеющих CD3 mAb 2-связывающий домен (фигура 25А), и его низкоаффинного варианта CD3 mAb 2 Low (фигура 25b) и высокоаффинного варианта CD3 mAb 2 Fast (фигура 25С).

Фигуры 26А-26В демонстрируют клеточные популяции человеческих РМБС, селектированных по CD5⁺ CD4⁺ (фигура 26А) или по CD5⁺ CD4⁻ (фигура 26В) в зависимости от возрастающей концентрации триспецифичных связывающих молекул 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 и 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1. 5Т4 X CD3 DARTs™ (со специфичностями к CD3 дикого типа, низкой и высокой) использовали в качестве контроля.

Фигуры 27А-27С демонстрируют влияние вариантов CD3 mAb (CD3 mAb 2 Low и CD3 mAb 2 Fast) на цитотоксичность триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 с использованием LDH-анализа.

Фигуры 28А-28F демонстрируют уровень IFN-γ (фигура 28А), TNF-α (фигура 28В), IL-10 (фигура 28С), IL-6 (фигура 28D), IL-4 (фигура 28Е) и IL -2 (фигура 28F), высвобождаемых РМБС из донора 1 в присутствии возрастающих концентраций триспецифичных связывающих молекул 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 и 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1.

Фигуры 29А-29F демонстрируют уровень IFN-γ (фигура 29А), TNF-α (фигура 29В), IL-10 (фигура 29С), IL-6 (фигура 29D), IL-4 (фигура 29Е) и IL -2 (фигура 29F), высвобождаемых из РМБС от донора 2 в присутствии возрастающих концентраций триспецифичных связывающих молекул 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 и 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к триспецифичным связывающим молекулам, которые являются полипептидными молекулами из нескольких цепей, и которые обладают тремя связывающими доменами и, таким образом, способны опосредовать скоординированное связывание с тремя эпитопами. Связывающие домены могут быть выбраны, таким образом, что триспецифичные связывающие молекулы способны связываться с любыми тремя различными эпитопами. Такие эпитопы могут быть эпитопами одного и того же антигена или эпитопами из двух или трех различных антигенов. В изобретении также предлагается новое ROR1-связывающее антитело, а также его производные, и применения таких композиций.

I. Общие методы и общие определения

Практика настоящего изобретения будет использовать, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (в том числе рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе, такой как MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Third Edition (Sambrook *et al.* Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: METHODS AND APPLICATIONS (Methods in Molecular Biology), Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ; OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (Gait, M.J., Ed., 1984); METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Humana Press, Totowa, NJ; CELL BIOLOGY: A LABORATORY NOTEBOOK (Cellis, J.E., Ed., 1998) Academic Press, New York, NY; ANIMAL CELL CULTURE (Freshney, R.I., Ed., 1987); INTRODUCTION TO CELL AND TISSUE CULTURE (Mather, J.P. and Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York, NY; CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (Doyle, A. *et al.*, Eds., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.) New York, NY; WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (Herzenberg, L.A. *et al.* Eds. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Miller, J.M. *et al.* Eds., 1987) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, F.M. *et al.*, Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION, (Mullis, K. *et al.*, Eds., 1994) Birkhäuser, Boston MA; CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, J.E. *et al.*, eds., 1991) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; IMMUNOBIOLOGY 7 (Janeway, C.A. *et al.* 2007) Garland Science, London, UK; Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK; ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (D. Catty., ed., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY); MONOCLONAL

ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (Shepherd, P. *et al.* Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow, E. *et al.* Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; THE ANTIBODIES (Zanetti, M. *et al.* Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK); and DEVITA, HELLMAN, AND ROSENBERG'S CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, EIGHTH EDITION, DeVita, V. *et al.* Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

II. Предпочтительные триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению

A. Способности к связыванию

Предпочтительные триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению способны координированно и одновременно связываться с тремя различными эпитопами. Такие предпочтительные триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению содержат:

(I), «связывающий домен I», который способен иммуноспецифично связываться с «эпитопом I», присутствующем на первом антигене, и «связывающий домен II», который способен иммуноспецифично связываться с «эпитопом II», присутствующем на втором антигене, где указанный связывающий домен I и указанный связывающий домен II оба являются «связывающими доменами по типу диатела»;

(II), «связывающий домен III» «не относящийся к типу диатела», который способен иммуноспецифично связываться с «эпитопом III», присутствующем на третьем антигене; и

(III) Fc-домен, который формируется за счет объединения в комплекс друг с другом двух CH₂-CH₃-доменов;

Как правило, триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению будут включать четыре различных полипептидных цепи, каждая из которых имеет amino-конец и карбоксильный конец (см. фигуру 4A-4D, фигуру 5A и фигуру 5B), однако, молекулы могут включать меньшее или большее количество полипептидных цепей путем слияния таких полипептидных цепей друг с другом (например, через пептидную связь) или путем деления таких полипептидных цепей с образованием дополнительных полипептидных цепей. Фигуры 4E-4J иллюстрируют этот аспект настоящего изобретения путем схематического отображения таких молекул, имеющих три полипептидных цепи. Фигуры 4K-4L иллюстрируют этот аспект настоящего изобретения схематическим изображением молекулы, имеющей пять полипептидных цепей.

Хотя такие триспецифичные связывающие молекулы являются особенно предпочтительными, изобретение, в частности, предусматривает триспецифичные

связывающие молекулы, которые содержат любую комбинацию связывающих доменов, достаточную для получения молекулы, имеющей три специфичности связывания, две из которых являются обязательными для специфичности, направленные против антигенов злокачественной опухоли, и одна из них демонстрирует специфичность связывания направленную против антигена эффекторной клетки. Так, например, изобретение предусматривает: триспецифичную связывающую молекулу, которая включает три связывающих домена Fab-типа, триспецифичную связывающую молекулу, которая включает один двухвалентный, биспецифичный домен антитела (образованный, например, путем объединения в комплекс двух различных легких цепей и двух различных тяжелых цепей) и один связывающий домен Fab-типа, триспецифичную связывающую молекулу, которая включает два двухвалентных, биспецифичных домена антител (образованных, например, путем объединения в комплекс четырех различных легких цепей и двух различных тяжелых цепей), но в котором один из доменов антитела оказался неактивным, и т.д.

Термины «полипептид», «полипептидная цепь» и «пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины, но в особенности, длина которых превышает 3, 5, 10, 15, 20 или 25 аминокислотных остатков, в которых два, а более предпочтительно все, аминокислотные остатки соединены посредством амидной (пептидной) связи (-NH-C (O) -). Однако полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и они могут прерываться неаминокислотами. Термины также включают аминокислотный полимер, который был изменен естественным образом или путем вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидированием, ацетилированием, фосфорилированием, или любыми другими манипуляциями или модификациями, такими как конъюгация с меткой. Также включены в определение, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (включающие, например, неприродные аминокислоты и т.п.), и другие модификации, известные в данной области техники. Полипептиды по настоящему изобретению могут присутствовать в виде отдельных цепей или в виде собранных в комплекс цепей.

«Связывающий домен по типу диатела» является эпитоп-связывающим доменом диатела, и особенно, диатела DART®. Термины «диатело» и «диатело DART®» обсуждались выше, и относятся к молекуле, которая содержит, по меньшей мере, две полипептидные цепи, которые предпочтительно собираются в комплекс друг с другом через ковалентное взаимодействие с образованием, по меньшей мере, двух эпитопсвязывающих участков, которые могут распознать одинаковые или различные

эпитопы. Каждая из двух полипептидных цепей диатела или диатела DART® включает переменную область легкой цепи иммуноглобулина и переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, но эти области не взаимодействуют с образованием эпитопсвязывающего участка (т.е. они не являются взаимно «комплементарными»). Скорее, переменная область тяжелой цепи иммуноглобулина цепи одного (например, первого) диатела или диатела DART® взаимодействует с переменной областью легкой цепи иммуноглобулина, выделенной из другого (например, второго) диатела, или диатела DART® с образованием эпитопсвязывающего участка. Точно так же, полипептидные цепи переменной области легкой цепи иммуноглобулина одного (например, первого) диатела или диатела DART® взаимодействуют с переменной областью тяжелой цепи диатела, выделенной из другого (например, второго) диатела или диатела DART®, с образованием эпитопсвязывающего участка. Молекулы диатела DART® раскрыты в публикациях пат. США № 2013-0295121; 2010-0174053 и 2009-0060910; В публикациях Европейского патента № EP 2714079; EP 2601216; EP 2376109; EP 2158221 и публикациях PCT № WO 2012/162068; WO 2012/018687; WO 2010/080538; WO 2006/113665, WO 2008/157379 и Moore, P.A. et al. (2011) “*Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,*” Blood 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) “*Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ3 Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bi-specific Antibody Scaffold,*” Arthritis Rheum. 62(7):1933-1943; and Johnson, S. et al. (2010) “*Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,*” J. Mol. Biol. 399(3):436-449.

Связывающий домен III предпочтительно представляет собой связывающий домен, «который не относится к типу диатела», и который предназначен для обозначения того, что связывающий домен III не имеет структуру связывающего домена по типу диатела. Предпочтительно, связывающий домен III представляет собой связывающий домен, который не относится к типу диатела, который представляет собой связывающий домен Fab-типа или связывающий домен по типу рецептора. При использовании в данном описании термин «связывающий домен Fab-типа» относится к эпитопсвязывающему домену, который образован взаимодействием VL-домена легкой цепи иммуноглобулина и дополняющим VH-доменом тяжелой цепи иммуноглобулина. Связывающие домены Fab-типа отличаются от связывающего домена по типу диатела тем, что две полипептидные цепи, которые образуют связывающий домен Fab-типа, включают только один эпитопсвязывающий домен, в то время как две полипептидные цепи, которые образуют связывающий домен по типу диатела, содержат, по меньшей мере, два

эпитопсвязывающих домена. Таким образом, При использовании в данном описании связывающие домены Fab-типа отличаются от связывающего домена по типу диатела. При использовании в данном описании термин «связывающий домен по типу рецептора» относится к эпитопсвязывающему домену клеточного рецептора, который образуется в результате взаимодействия двух полипептидов. Связывающие домены рецепторного типа проиллюстрированы в данном описании ссылкой на связывающий домен по типу Т-клеточного рецептора, который образуется в результате взаимодействия альфа-цепи ввариабельного домена Т-клеточного рецептора и бета-цепи вариабельного домена Т-клеточного рецептора. Такие связывающие домены по типу Т-клеточного рецептора распознают пептиды, отображаемые в контексте МНС и, таким образом, способны распознавать внутриклеточные эпитопы. Хотя изобретение проиллюстрировано в отношении таких связывающих доменов рецепторного типа, следует принять во внимание, что могут быть использованы связывающие домены рецепторного типа, которые отличаются от связывающих доменов по типу Т-клеточного рецептора, и они охватываются настоящим изобретением. Другие примеры рецепторов, имеющих связывающие домены рецепторного типа, включают рецептор IL-2, рецептор IL-4, рецептор IL-7, рецептор IL-9, рецептор IL-15, рецептора инсулина IL-21, и тимусный стромальный лимфопоэтин.

Триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению, таким образом, отличаются от четырехвалентных связывающих молекул, таких, как те, что получают димеризацией бивалентного антитела, и предпочтительно обладают тремя, но не четырьмя связывающими доменами. Как будет описано ниже, триспецифичные молекулы по настоящему изобретению, могут обладать дополнительными связывающими доменами (например, альбумин-связывающим доменом, FcγR-связывающим доменом, и т.д.). Такие дополнительные связывающие домены не предназначены для того, чтобы рассматриваться или считаться как один из трех связывающих доменов из триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению.

При использовании в данном описании термины «ассоциация» или «ассоциирование» в отношении полипептидов (например, одного полипептида диатела с другим, легкая цепь иммуноглобулина с тяжелой цепью иммуноглобулина, одного СН2-СН3-домена с другим СН2-СН3-доменом, и т.д.) предназначены для обозначения нековалентного объединения полипептидов. Термины «комплексы» или «образование комплекса» предназначены для обозначения ковалентного объединения полипептидов.

При использовании в данном описании, связывающие домены триспецифичной связывающей молекулы настоящего изобретения упоминаются как опосредующие

«координированное связывание», если, по меньшей мере, два из ее связывающих доменов и, предпочтительно, все его связывающие домены способны одновременно быть связанными с их соответствующими распознаваемыми эпитопами или связываемым лигандом. Такое связывание может быть одновременным. Тем не менее, один аспект настоящего изобретения относится к модификации скорости «ассоциации» и/или «диссоциации», с которыми такие связывающие домены связываются с их распознаваемыми эпитопами. При использовании в данном описании, «скорость ассоциации» связывания является мерой аффинности, с которой такие связывающие домены распознают и инициируют связывание с их распознаваемыми эпитопами. В противоположность этому, «скорость диссоциации» связывания является мерой степени устойчивости комплекса связывающего домена: эпитопа. Скорости «ассоциации» и/или «диссоциации» связывания могут быть изменены путем изменения аминокислотной последовательности CDR из связывающего домена. Как будет описано ниже, независимо от каких-либо модификаций CDR, степень скоординированного связывания молекул по настоящему изобретению может быть модулирована путем изменения конфигурации их связывающего домена, так чтобы конкретный связывающий домен (т.е. VLx/VHx домен) присутствовал как связывающий домен III или в качестве внутреннего или внешнего связывающего домена по типу диатела по отношению к связывающему домену III (более подробно описано ниже).

Эти скорости ассоциации и диссоциации связывающих доменов триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению можно легко измерить с помощью методов, хорошо известных в данной области, например, путем анализа Biacore® (Jason-Moller, L. et al. (2006) "Overview Of Biacore Systems And Their Applications," Curr. Protoc. Protein Sci. Chapter 19:Unit 19.13; Swanson, S.J. (2005) "Characterization Of An Immune Response," Dev. Biol. (Basel). 122:95-101; Buijs, J. et al. (2005) "SPR-MS In Functional Proteomics," Brief Funct. Genomic Proteomic. 4(1):39-47; Karlsson, R. et al. (2004) "SPR For Molecular Interaction Analysis: A Review Of Emerging Application Areas," J. Mol. Recognit. 17(3):151-161; Van Regenmortel, M.H. (2003) "Improving The Quality Of BIACORE-Based Affinity Measurements," Dev. Biol. (Basel) 112:141-151; Malmqvist, M. (1999) "BIACORE: An Affinity Biosensor System For Characterization Of Biomolecular Interactions," Biochem. Soc. Trans. 27(2):335-340; Malmqvist, M. et al. (1997) "Biomolecular Interaction Analysis: Affinity Biosensor Technologies For Functional Analysis Of Proteins," Curr. Opin. Chem. Biol. 1(3):378-383; Fivash, M. et al. (1998) "Biacore For Macromolecular Interaction," Curr. Opin. Biotechnol. 9(1):97-101; Malmborg, A.C. et al. (1995) "Biacore As A Tool In Antibody Engineering," J. Immunol. Methods. 183(1):7-13). Эти скорости ассоциации и диссоциации

связывающих доменов триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению могут быть легко изменены путем случайного или направленного мутагенеза молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют такие связывающие домены, с последующим рутинным скринингом извлекаемых молекул нуклеиновых кислот по их способности кодировать мутантные белки, которые обладают такой измененной кинетикой связывания.

Связывающие домены триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению связываются с эпитопами «иммуноспецифическим» образом. При использовании в данном описании антитело, диатело или другая эпитопсвязывающая молекула упоминается как «иммуноспецифично» связывающая область другой молекулы (т.е. эпитоп), если она вступает в реакцию или ассоциируется чаще, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с этим эпитопом по сравнению с альтернативными эпитопами. Например, антитело, которое связывается иммуноспецифично с вирусным эпитопом, представляет собой антитело, которое связывает этот вирусный эпитоп с большей аффинностью, авидностью, более легко, и/или с большей длительностью, чем оно иммуноспецифично связывается с другими вирусными эпитопами или невирусными эпитопами. Также следует понимать, прочитав это определение, что, например, антитело (или фрагмент, или эпитоп), которое иммуноспецифично связывается с первой мишенью, может или не может специфично или преимущественно связываться со второй мишенью. Таким образом, «специфичное связывание» необязательно требует (хотя и может включать) исключительное связывание. Как правило, но необязательно, ссылка на связывание означает «специфичное» связывание. Считают, что две молекулы способны связываться друг с другом в «физиоспецифичным» образом, если такое связывание демонстрирует специфичность, с которой рецепторы связывают с их соответствующими лигандами.

Таким образом, в наиболее простом воплощении, предпочтительные связывающие молекулы по настоящему изобретению, по меньшей мере, триспецифичные-способны опосредовать скоординированное связывание с тремя различными эпитопами. Важно отметить, что такие молекулы имеют, по меньшей мере, три участка, которые способны связывать антиген: «внешний» связывающий домен по типу диатела, который находится на противоположной стороне от связывающего домена III, «внутренний» связывающий домен по типу диатела, который расположен ближе к связывающему домену III, и связывающий домен III сам по себе. Положения таких доменов, соответственно, обозначены как Сайт А, Сайт В и участок С (фигуры 4А-4D).

Связывающие домены, которые связываются с эпитопами I, II и III, выбираются

так, чтобы отличаться друг от друга. Тем не менее, эпитопы I, II и III могут быть эпитопами одного и того же антигена, двух различных антигенов, или из трех различных антигенов. Таким образом, триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению, могут быть способны координировано связывать 1, 2, или 3 различных антигенных молекул. Триспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть использованы в отношении любого возможного эпитопа и любого возможного антигена. Например, триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению, могут иметь 1, 2 или 3, связывающих домена, которые связываются с эпитопом эффекторной клетки (например, CD2, CD3, CD16, CD19, CD20, CD22, CD32B, CD64 В-клеточным рецептором (BCR), Т-клеточным рецептором (TCR), и рецептором NKG2D), или с эпитопом цитотоксичной Т-клетки (например, CD8, присутствующим на цитотоксических Т-клетках), или с эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием, или любой комбинацией таких потенциальных связывающих доменов.

При использовании в данном описании термин «антиген, ассоциированный с заболеванием» представляет собой антиген, который характерно экспрессируется на «патоген-инфицированных» клетках или на «злокачественной опухолевой клетке», но, как правило, не экспрессируется на нормальных клетках.

Используемый в настоящем описании термин «патоген-инфицированная» клетка относится к клетке, которая была инфицирована бактерией (например, *E. coli*, *C. difficile*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Streptococcus pneumoniae*, и т.д.), грибом (например, *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Pneumocystis*, *Stachybotrys* и т.д.), простейшим (*Amoebozoa*, *Excavata*, *Chromalveolata*, *Entamoeba*, *Plasmodium*, *Giardia*, *Trypanosoma*, *Coccidia*, *Besnoitia*, *Dicrocoelium*, *Leishmania* и т.д.) или вирусом (и особенно аденовирусом, аденоассоциированным вирусом, В-вирусом (macacine herpesvirus I), ВК вирусом а буньявирусом, вирусом чикунгунья, вирусом Коксаки, коронавирусом, цитомегаловирусом, восточным лошадиным вирусом энцефалита, вирусом Эбола, энтеровирусом, вирусом Эпштейна-Барр, хантавирусом, вирусом гепатита А, вирусом гепатита В, вирусом гепатита С, вирусом гепатита D, вирусом гепатита Е, вирусом простого герпеса 1, вирусом простого герпеса 2, пенящим вирусом человека, вирусом герпеса человека 3, вирусом герпеса человек 5, вирусом герпеса человек 6, вирусом герпеса человек 7, вирусом иммунодефицита человека, вирусом папилломы человека, человеческим β -лимфотропным вирусом, человеческим вирусом Т-клеточного лейкоза I,

человеческим вирусом Т-клеточного лейкоза II, вирусом гриппа, вирусом JC, JEV, вирусом, ассоциированным с саркомой Капоши, вирусом Ласса, вирусом лимфоцитарного хориоменингита, вирусом Марбург, вирусом кори, вирусом эпидемического паротита, вирусом Нипах, норовирусом, вирусом Норуолк, ортореовирусом, вирусом парагриппа, парвовирусом, полиовирусом, вирусом бешенства, реовирусом, респираторным синцитиальным вирусом, риновирусом, вирусом лихорадки долины Рифт, ротавирусом, вирусом краснухи, вирусом оспы, вирусом энцефалита Сент-Луис, вирусом натуральной оспы, вирусом малой оспы, вирусом опоясывающего лишая, вирусом Западного Нила, вирусом лошадиного западного энцефалита, или вирусом желтой лихорадки).

При использовании в данном описании термин «клетка злокачественной опухоли» относится к злокачественной клетке: опухоли надпочечников, СПИД-ассоциированных злокачественных новообразований, альвеолярной саркомы мягких тканей, астроцитарной опухоли, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного и спинного мозга, метастатической опухоли головного мозга, рака молочной железы, опухолей каротидного гломуса, рака шейки матки, хондросаркомы, хордомы, хроматофобного почечноклеточного рака, светлоклеточного рака, рака толстой кишки, колоректальный рак, кожной доброкачественной фиброзной гистиоцитомы, десмопластической мелкокруглоклеточной опухоли, эпендимомы, опухоли Юинга, внескелетной миксоидной хондросаркомы, несовершенного костного фиброгенеза, фиброзной дисплазии кости, рака желчного пузыря или желчных протоков, рака желудка, гестационной трофобластической болезни, герминомы, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, опухоли островковых клеток, саркомы Капоши, рака почки, лейкоза, липомы/доброкачественной липоматозной опухоли, липосаркомы/злокачественной липоматозной опухоли, рака печени, лимфомы, рака легкого, медуллобластомы, меланомы, менингиомы, множественных эндокринных неоплазий, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, нейробластомы, нейроэндокринной опухоли, рака яичника, поджелудочной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, опухоли паращитовидной железы, педиатрического рака, опухоли оболочки периферического нерва, феохромоцитомы, опухоли гипофиза, рака предстательной железы, задней увеальной меланомы, редкого гематологического заболевания, почечного метастатического рака, палочковидной опухоли, рабдомиосаркомы, саркомы, рака кожи, саркома мягких тканей, плоскоклеточного рака, рака желудка, синовиальной саркомы, рака яичек, карциномы тимуса, тимомы, метастатического рака щитовидной железы, и рака матки.

Примеры антигенов, которые характерно экспрессируются клетками

злокачественных опухолей включают «антиген злокачественной опухоли», такой как антиген рака молочной железы, антиген рака яичника, антиген рака предстательной железы, антиген рака шейки матки, антиген панкреатической карциномы, антигена рака легкого, антиген рака мочевого пузыря, антиген рака толстой кишки, антиген рака яичка, антиген глиобластомы, антиген, ассоциированный с В-клеточной неоплазией, антиген, ассоциированный с множественной миеломой, антиген, ассоциированный с неходжкинской лимфомой, или антиген, ассоциированный с хроническим лимфолейкозом. Примерные антигены, которые экспрессируются клетками злокачественных опухолей, включают антигены: антиген 19,9 рака толстой кишки; антиген муцина 4.2 рака желудка; антиген А33 колоректального рака (Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998); ADAM-9 (Публ. пат. США № 2006/0172350; публ. РСТ WO 06/084075; карциноэмбриональный АФР антиген-альфа-фетопропротеина (Malaguarnera, G. et al. (2010) “Serum markers of hepatocellular carcinoma,” Dig. Dis. Sci. 55(10):2744-2755); ALCAM (Публ. РСТ № WO 03/093443); BAGE (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); бета-катенин (Prange W. et al. 2003 *J Pathol.* 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 *Int J Gynecol Cancer* 15 Suppl 3:274-81); Карбоксипептидаза М (Публ. пат. США No. 2006/0166291); B1 (Egloff, A.M. et al. 2006, *Cancer Res.* 66(1):6-9); CD5 (Calin, G.A. et al. 2006 *Semin Oncol.* 33(2):167-73; CD19 (Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD20 (Thomas, D.A. et al. 2006 *Hematol Oncol Clin North Am.* 20(5):1125-36); CD20 (Cang, S. et al. (2012) “Novel CD20 Monoclonal Antibodies For Lymphoma Therapy,” *J. Hematol. Oncol.* 5:64 pp.1-9); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 *AAPS J.* 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. et al. 2005 *Curr Top Microbiol Immunol.* 5;294:91-107); CD25 (Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD30 (Muta, H. et al. (2013) “CD30: From Basic Research To Cancer Therapy,” *Immunol. Res.* 57(1-3):151-158); CD33 (Walter, R.B. et al. (2012) “Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy,” *Blood* 119(26):6198-6208); CD36 (Ge, Y. 2005 *Lab Hematol.* 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. et al. 2005 *Ann N Y Acad Sci.* 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 *Haematologica* 91(9):1234-40); CD46 (пат. США № 7,148,038; Публ. РСТ № WO 03/032814; Russell, S. et al. (2004) “CD46: A Complement Regulator And Pathogen Receptor That Mediates Links Between Innate And Acquired Immune Function,” *Tissue Antigens* 64(2):111-118); CD52 (Hoelzer, D. et al. (2013) “Targeted therapy with monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia,” *Curr. Opin. Oncol.* 25(6):701-706); CD79a/CD79b (Troussard, X. et al. 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 *Appl Immunohistochem Mol Morphol.*

9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. *et al.* 1998 *Hematol Cell Ther.* 40(4):139-48); CD317 (Palma, G. *et al.* (2012) “*Plasmacytoids Dendritic Cells Are A Therapeutic Target In Anticancer Immunity*,” *Biochim. Biophys. Acta.* 1826(2):407-414; CDK4 (Lee, Y.M. *et al.* 2006 *Cell Cycle* 5(18):2110-4); CEA (карциноэмбрионального антигена; Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. *et al.* 2005 *Rev Invest Clin.* 57(6):814-9); CEACAM5 и CEACAM6 (Публ. РСТ № WO 2011/034660; Zheng, C. *et al.* (2011) “*A Novel Anti-CEACAM5 Monoclonal Antibody, CC4, Suppresses Colorectal Tumor Growth and Enhances NK Cells-Mediated Tumor Immunity*,” *PLoS One* 6(6):e21146, pp. 1-11); CO17-1A (Adkins, J.C. *et al.* (1998) “*Edrecolomab (Monoclonal Antibody 17-1A)*,” *Drugs* 56(4):619-626; CO-43 (группа крови Leb) и CO-514 (группа крови Lea) (Garratty, G. (1995) “*Blood Group Antigens As Tumor Markers, Parasitic/Bacterial/Viral Receptors, And Their Association With Immunologically Important Proteins*,” *Immunol. Invest.* 24(1-2):213-232; CTLA-1 и CTLA-4 (Peggs, K.S. *et al.* 2006 *Curr Opin Immunol.* 18(2):206-13); цитокератин 8 (Публ. РСТ № WO 03/024191); антиген D1.1 (Dao, T. *et al.* (2009) “*Identification Of A Human Cyclin D1-Derived Peptide That Induces Human Cytotoxic CD4 T Cells*,” *PLoS One.* 4(8):e6730); DR5 (Abdulghani, J. *et al.* (2010) “*TRAIL Receptor Signaling And Therapeutics*,” *Expert Opin. Ther. Targets* 14(10):1091-1108; Andera, L. (2009) “*Signaling Activated By The Death Receptors Of The TNFR Family*,” *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.* 153(3):173-180; Carlo-Stella, C. *et al.* (2007) “*Targeting TRAIL Agonistic Receptors for Cancer Therapy*,” *Clin. Cancer* 13(8):2313-2317; Chaudhari, B.R. *et al.* (2006) “*Following the TRAIL to Apoptosis*,” *Immunologic Res.* 35(3):249-262); E1-серии (группа крови B); EGF-R (рецептора эпидермального фактора роста; Adenis, A. *et al.* 2003 *Bull Cancer.* 90 Spec No:S228-32); рецепторов эфрина (и, в частности, EphA2 (пат. США № 7,569,672; Публ. РСТ № WO 06/084226); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. *et al.* 2002 *Oncogene* 21(57):8732-40; Rimon, E. *et al.* 2004 *Int J Oncol.* 24(5):1325-38); антиген F3 аденокарциномы легкого (Greulich, H. *et al.* (2012) “*Functional analysis of receptor tyrosine kinase mutations in lung cancer identifies oncogenic extracellular domain mutations of ERBB2*,” *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)* 109(36):14476-14481); антиген FC10.2 (Loveless, W. *et al.* (1990) “*Developmental Patterning Of The Carbohydrate Antigen FC10.2 During Early Embryogenesis In The Chick*,” *Development* 108(1):97-106); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. *et al.* 2006 *Int J Cancer.* 118(1):123-8); GD2/GD3/GD49/GM2/GM3 (Livingston, P.O. *et al.* 2005 *Cancer Immunol Immunother.* 54(10):1018-25); GICA 19-9 (Herlyn *et al.* (1982) “*Monoclonal Antibody Detection Of A Circulating Tumor-Associated Antigen. I. Presence Of Antigen In Sera Of Patients With Colorectal, Gastric, And Pancreatic Carcinoma*,” *J. Clin. Immunol.* 2:135-140); gp37 (антиген Т-клеточного лейкоза человека ((Bhattacharya-Chatterjee *et al.* (1988)

“*Idiotype Vaccines Against Human T Cell Leukemia. II. Generation And Characterization Of A Monoclonal Idiotype Cascade (Ab1, Ab2, and Ab3),*” J. Immunol. 141:1398-1403); gp75 (антиген меланомы) (Vijayasardahl *et al.* (1990) “*The Melanoma Antigen Gp75 Is The Human Homologue Of The Mouse B (Brown) Locus Gene Product,*” J. Exp. Med. 171(4):1375-1380); gp100 (Lotem, M. *et al.* 2006 *J Immunother.* 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S *et al.* 2006 *Semin Oncol.* 33(4):386-91); антиген В-лимфомы человека, CD20 (Reff *et al.* (1994) “*Depletion Of B Cells In Vivo By A Chimeric Mouse Human Monoclonal Antibody To CD20,*” Blood 83:435-445); антиген жировых глобул молока человека; папилломавируса человека-Е6/папилломавируса человека-Е7 (DiMaio, D. *et al.* 2006 *Adv Virus Res.* 66:125-59); HMW-МАО (высокомолекулярный антиген меланомы) (Natali *et al.* (1987) “*Immunohistochemical Detection Of Antigen In Human Primary And Metastatic Melanomas By The Monoclonal Antibody 140.240 And Its Possible Prognostic Significance,*” Cancer 59:55-63; Mittelman *et al.* (1990) “*Active Specific Immunotherapy In Patients With Melanoma. A Clinical Trial With Mouse Antiidiotypic Monoclonal Antibodies Elicited With Syngeneic Anti-High-Molecular-Weight-Melanoma-Associated Antigen Monoclonal Antibodies,*” J. Clin. Invest. 86:2136-2144); I антиген (антигена дифференцировки) (Feizi (1985) “*Demonstration By Monoclonal Antibodies That Carbohydrate Structures Of Glycoproteins And Glycolipids Are Onco-Developmental Antigens,*” Nature 314:53-57) такой, как антиген I(Ma) обнаруженный в аденокарциномах желудка; Интегрин альфа-V-бета-6 интегринβ6 (ITGB6) (Публ. РСТ № WO 03/087340); JAM-3 (Публ. РСТ № WO 06/084078); рецептора α2 интерлейкина-13 (IL13Rα2) (Bodhinayake, I. *et al.* (2014) “*Targeting A Heterogeneous Tumor: The Promise Of The Interleukin-13 Receptor α2,*” Neurosurgery 75(2):N18-9); JAM-3 (Публ. РСТ № WO 06/084078); KID3 (Публ. РСТ № WO 05/028498); KID3 (Публ. РСТ № WO 05/028498); KID31 (Публ. РСТ № WO 06/076584); KID31 (Публ. РСТ № WO 06/076584); KS 1/4 антиген пан-карциномы (Perez *et al.* (1989) “*Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,*” J. Immunol. 142:3662-3667; Möller *et al.* (1991) “*Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes,*” Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); KS 1/4 антиген пан-карциномы (Perez *et al.* (1989) “*Isolation And Characterization Of A cDNA Encoding The Ks1/4 Epithelial Carcinoma Marker,*” J. Immunol. 142:3662-3667; Möller *et al.* (1991) “*Bispecific-Monoclonal-Antibody-Directed Lysis Of Ovarian Carcinoma Cells By Activated Human T Lymphocytes,*” Cancer Immunol. Immunother. 33(4):210-216; Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); KSA (17-1A) (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); антигены карциномы легкого человека, L6 и L20 (Hellström *et al.* (1986) “*Monoclonal Mouse Antibodies Raised*

Against Human Lung Carcinoma,” *Cancer Res.* 46:3917-3923); LEA (Velázquez-Márquez, N. *et al.* (2012) “Sialyl Lewis x expression in cervical scrapes of premalignant lesions,” *J. Biosci.* 37(6):999-1004); LUCA-2 (United States Patent Publication No. 2006/0172349; Публ. PCT № WO 06/083852); M1:22:25:8, M18, M39 (Cambier, L. *et al.* (2012) “*M19 Modulates Skeletal Muscle Differentiation And Insulin Secretion In Pancreatic B-Cells Through Modulation Of Respiratory Chain Activity*,” *PLoS One* 7(2):e31815; Pui, C.H. *et al.* (1991) “Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse,” *Blood* 78(5):1327-1337); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. *et al.* 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82; Myl, MUC-1 (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. *et al.* 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31); N-ацетилглюкозаминилтрансфераза (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34); неогликопротеин (Legendre, H. *et al.* (2004) “*Prognostic Stratification Of Dukes B Colon Cancer By A Neoglycoprotein*,” *Int. J. Oncol.* 25(2):269-276); NS-10; OFA-1 и OFA-2 (Takahashi, M. (1984) “A Study On Clinical Significance Of Oncofetal Antigen-1 In Gynecologic Tumors,” *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.* 36(12):2613-2618); Онкостатин М (бета-рецептора Онкостатина)(пат. США № 7,572,896; Публ. PCT № WO 06/084092); p15 (Gil, J. *et al.* 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77); PSA (простат-специфический антиген; Cracco, C.M. *et al.* 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); PEMA (антиген полиморфного эпителиального муцина) (Chu, N.J. *et al.* (2015) “*Nonviral Oncogenic Antigens and the Inflammatory Signals Driving Early Cancer Development as Targets for Cancer Immunoprevention*,” *Clin. Cancer Res.* 21(7):1549-1557); PIPA (пат. США № 7,405,061; Публ. PCT № WO 04/043239); фосфата простатической кислоты (Tailor *et al.* (1990) “*Nucleotide Sequence Of Human Prostatic Acid Phosphatase Determined From A Full-Length cDNA Clone*,” *Nucl. Acids Res.* 18(16):4928); R24 (Zhou, M. *et al.* (2008) “*Constitutive Overexpression Of A Novel 21 Kda Protein By Hodgkin Lymphoma And Aggressive Non-Hodgkin Lymphomas*,” *Mol. Cancer* 7:12); ROR1 (пат. США № 5,843,749); Rabbani, H. *et al.* (2010) “*Expression Of ROR1 In Patients With Renal Cancer--A Potential Diagnostic Marker*,” *Iran Biomed. J.* 14(3):77-82); сфинголипидов (Накомори, S. (1998) “*Cancer-Associated Glycosphingolipid Antigens: Their Structure, Organization, And Function*,” *Acta Anat. (Basel)* 161(1-4):79-90); SSEA-1, SSEA-3 и SSEA-4 (Muramatsu, T. *et al.* (2004) “*Carbohydrate Antigens Expressed On Stem Cells And Early Embryonic Cells*,” *Glycoconj. J.* 21(1-2):41-45); sTn (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5):881-91); пептид, выделенный из Т-клеточного рецептора (Edelson (1998) “*Cutaneous T-Cell Lymphoma: A Model For Selective Immunotherapy*,” *Cancer J Sci Am.* 4:62-71); Т₅А₇ (Hogg, R.J. *et al.* (1991) “*A monoclonal*

antibody exhibiting reactivity with both X-hapten- and lactose-bearing glycolipids,” Tissue Antigens 37(1):33-38); TAG-72 (Yokota *et al.* (1992) “*Rapid Tumor Penetration Of A Single-Chain Fv And Comparison With Other Immunoglobulin Forms,*” Cancer Res. 52:3402-3408); TL5 (группа крови А) (Gooi, H.C. *et al.* (1983) “Monoclonal antibody reactive with the human epidermal-growth-factor receptor recognizes the blood-group-A antigen,” Biosci. Rep. 3(11):1045-1052); TNF-рецептора (TNF- α рецептора, TNF- β рецептора; или TNF- γ рецептора (van Horssen, R. *et al.* 2006 *Oncologist.* 11(4):397-408; Gardnerova, M. *et al.* 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64); TRA-1-85 (группа крови H) (Williams, B.P. *et al.* (1988) “Biochemical and genetic analysis of the OKa blood group antigen,” Immunogenetics 27(5):322-329); рецептора трансферрина (пат. США № 7572895; Публ. PCT № WO 05/121179); TSTA опухолеспецифичного трансплантационного антигена (Hellström *et al.* (1985) “*Monoclonal Antibodies To Cell Surface Antigens Shared By Chemically Induced Mouse Bladder Carcinomas*” Cancer. Res. 45:2210-2188); VEGF-R (O’Dwyer. P.J. 2006 *Oncologist.* 11(9):992-8); и Y-гаптена, Le^y (Durrant, L.G. *et al.* (1989) “*Development Of An ELISA To Detect Early Local Relapse Of Colorectal Cancer,*” Br. J. Cancer 60(4):533-537).

Примеры антител, которые иммуноспецифично связываются с эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием, которые могут быть использованы для получения переменных доменов легкой цепи, переменных доменов тяжелой цепи, легких цепей антитела или тяжелых цепей антитела триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению, представлены в таблице 2.

Таблица 2

Название антитела	Антиген, ассоциированный с Заболеванием	Терапевтическая мишень для применения
3F8	Gd2	Нейробластома
8H9	B7-H3	Нейробластома, саркома, метастатические раки мозга
Абаговомаб	CA-125	Рак яичников
Абциксимаб	CD41	Ингибитор агрегации тромбоцитов
Актоксумаб	<i>Clostridium Difficile</i>	Инфекция <i>Clostridium Difficile</i>
Адалимумаб	TNF-A	Ревматоидный артрит, болезнь Крона, бляшковидный псориаз, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит, ювенильный идиопатический артрит, гемолитическая болезнь новорожденных

Адекватумаб	ErCam	Рак предстательной железы и молочной железы
Адукаумаб	Бета-амилоид	Болезнь Альцгеймера
Афелимомаб	TNF-A	Сепсис
Афутузумаб	CD20	Лимфома
Алацизумаб	VEGFR2	Злокачественная опухоль
Ald518	IL-6	Ревматоидный артрит
Алемтузумаб	CD52	Рассеянный склероз
Алирокумаб	NARP-1	Гиперхолестеринемия
Альтумомаб	CEA	Колоректальный рак
Аматуксимаб	мезотелин	Злокачественная опухоль
Анатумомаб мафенатокс	TAG-72	Немелкоклеточный рак легкого
Анифролумаб	рецептор интерферон А/В	Системная красная волчанка
Анрукинзумаб	IL-13	Злокачественная опухоль
Аполизумаб	HLA-DR	Гематологические злокачественные новообразования
Арцитумомаб	CEA	Рак желудочно-кишечного тракта
аселизумаб	L-селектин (CD62L)	пациенты с тяжелыми поражениями
Атимумаб	RTN4	Злокачественная опухоль
Атальгизумаб	рецептор IL-6	Ревматоидный артрит
Аторолимумаб	резус-фактор	Гемолитическая болезнь новорожденных
Бапинеизумаб	Бета-амилоид	Болезнь Альцгеймера
Базиликсимаб	CD25	Предотвращение отторжения трансплантатов органов
Бавитуксимаб	фосфатидилсерин	Злокачественная опухоль, вирусные инфекции
Бектумомаб	CD22	Неходжкинская Лимфома (обнаружение)
Белимумаб	BAFF	Неходжкинская лимфома
Бенрализумаб	CD125	Астма
Бертилимумаб	CCL11 (Эотаксин-1)	Тяжелые аллергические заболевания
Безилесомаб	CEA-сопутствующий Антиген	Воспалительные поражения и Метастазы (обнаружение)
Бевацизумаб	VEGF-A	Метастатические злокачественные опухоли, ретинопатия недоношенных
Безлтоксумаб	<i>Clostridium difficile</i>	Инфекция <i>Clostridium difficile</i>
Бициромаб	Фибрин II, бета-цепь	Тромбоземболия (диагностика)
Бимагрумаб	ACVR2B	Ингибитор Миостатина
Биватузумаб	CD44 V6	Плоскоклеточная карцинома
Блинатумомаб	CD19	Злокачественная опухоль
Блосозумаб	SOST	Остеопороз

Брентуксимаб	CD30 (TNFRSF8)	Гематологические злокачественные новообразования
Бриакинумаб	ИЛ-12, ИЛ-23	Псориаз, Ревматоидный артрит, воспалительные заболевания кишечника, рассеянный склероз
Бродалумаб	IL-17	Воспалительные заболевания
Канакинумаб	IL-1	Ревматоидный артрит
Кантузумаб мертанзин	муцин CanAg	Колоректальный рак
Кантузумаб	MUC1	Злокачественные опухоли
Каплацизумаб	VWF	Злокачественные опухоли
Капромаб	Клетки рака предстательной железы	Рак предстательной железы (обнаружение)
Карлумаб	MCP-1	Онкология/иммунные показания к применению
Катумаксомаб	ErCam, CD3	Рак яичников, злокачественный асцит, рак желудка
СС49	Tag-72	Обнаружение опухоли
Цертолизумаб	TNF-A	Болезнь Крона
Цетуксимаб	EGFR	Метастатический колоректальный рак и рак головы и шеи
Ch. 14.18	неопределено	Нейробластома
Цитатузумаб	ErCam	Рак яичников и другие солидные опухоли
Цитуксумумаб	Рецептор IGF-1	Солидные опухоли
Клазакизумаб	<i>Oryctolagus Cuniculus</i>	Ревматоидный артрит
Кливатузумаб	MUC1	Рак поджелудочной железы
Конатумумаб	TRAIL-R2	Злокачественная опухоль
Концизумаб	TFPI	Кровотечение
Кренезумаб	1-40-В-амилоид	Болезнь Альцгеймера
Cr6261	Гемагглютинин гриппа А	Инфекционное заболевание/Грипп А
Дацетузумаб	CD40	Гематологические злокачественные новообразования
Даклизумаб	CD25	Предотвращение отторжения трансплантатов органов
Далотузумаб	рецептор инсулиноподобного фактора роста I	Злокачественная опухоль
Даратумомаб	CD38	Злокачественная опухоль
Демцизумаб	DLL4	Злокачественная опухоль
Деносумаб	RANKL	Остеопороз, костные метастазы
Детумомаб	В-клеточная лимфома	Лимфома
Дорлимомаб аритокс	неопределено	Злокачественная опухоль
Дрозитумаб	DR5	Злокачественная опухоль

Долиготумаб	HER3	Злокачественная опухоль
Дупилумаб	IL4	Атопические заболевания
Дусигитумаб	ILGF2	Злокачественная опухоль
Экромексимаб	Ганглиозид GD3	Злокачественная меланома
Экулизумаб	C5	Пароксизмальная ночная гемоглобинурия
Эдобакомаб	эндотоксин	Сепсис, вызванный грамотрицательными бактериями
Эдреколомаб	ErCam	Колоректальная карцинома
Эфализумаб	LFA-1 (CD11a)	Псориаз (блок миграции Т-клеток)
Эфунгумаб	Hsp90	Инвазивный кандидоз
Элделумаб	Интерферон-гамма-индуцированный белок	Болезнь Крона, язвенный колит
Элотузумаб	SLAMF7	Множественная миелома
Элсилимамаб	IL-6	Злокачественная опухоль
Энаватузумаб	рецептор TWEAK	Злокачественная опухоль
Энлимомаб	ICAM-1 (CD54)	Злокачественная опухоль
Энокузумаб	IL9	Астма
Энотикумаб	DLL4	Злокачественная опухоль
Энситуксимаб	5AC	Злокачественная опухоль
Эпитумомаб цитуксетан	эписиалин	Злокачественная опухоль
Эпратузумаб	CD22	Злокачественная опухоль, SLE
Эрлизумаб	ITGB2 (CD18)	Инфаркт, инсульт, травматический шок
Эртумаксимаб	HER2/Neu, CD3	Рак молочной железы
Этарацизумаб	Интегрин $\alpha_v \beta_3$	Меланома, рак предстательной железы, рак яичников
Этролизумаб	Интегрин $\alpha_7 \beta_7$	Воспалительное заболевание кишечника
Эволокумаб	PCSK9	Гипохолестеринемия
Эксбивирумаб	Поверхностный антиген вируса гепатита	Гепатит В
Фанолесомаб	CD15	Аппендицит (диагностика)
Фаралимомаб	рецептор Интерферона	Злокачественная опухоль
Фарлетузумаб	рецептор фолата 1	Рак яичников
Фасинумаб ^[51]	HNGF	Злокачественная опухоль
Fbta05	CD20	Хронический лимфоцитарный лейкоз
Фелвизумаб	Респираторно-синцитиальный вирус	Инфекция респираторно-синцитиального вируса
Фезаклинумаб	IL-22	Ревматоидный артрит, псориаз
Фиклатузумаб	HGF	Злокачественная опухоль

Фигитумумаб	Рецептор IGF-1	Адренокортикальная карцинома, немелкоклеточный рак легкого
Фалнвотумаб	TYRP1 (гликопротеин 75)	Меланома
Фонтолизумаб	IFN- γ	Болезнь Крона
Форавирумаб	гликопротеин вируса бешенства	Бешенство (профилактика)
Фресолимумаб	TGF- β	Идиопатический легочный фиброз, фокальный сегментарный гломерулосклероз, злокачественная опухоль
Фулранумаб	NGF	Боль
Футуксимаб	EGFR	Злокачественная опухоль
Галиксимаб	CD80	В-клеточная лимфома
Ганитумаб	IGF-I	Злокачественная опухоль
Гантенерумаб	Бета-амилоид	Болезнь Альцгеймера
Гавилимомаб	CD147 (Басигин)	Реакция «трансплантат против хозяина»
Гемтузумаб озогамицин	CD33	Острый миелолейкоз
Гевокизумаб	IL-1 β	Диабет
Гирентуксимаб	Карбоангидраза 9 (CA-IX)	Светлоклеточная почечно-клеточная карцинома [64]
Глембатумумаб Ведотин	GPNMB	Меланома, рак молочной железы
Голимумаб	TNF- α	Ревматоидный артрит, псориатический артрит, анкилозирующий спондилит
Гомиликсимаб	CD23 (рецептор Ige)	Аллергическая астма
Гуселкумаб	IL13	Псориаз
Ибритумомаб Тюксетан	CD20	Неходжкинская лимфома
Икруцумаб	VEGFR-1	Злокачественная опухоль
Иговомаб	CA-125	Рак яичников (диагностика)
Имаб362	Cldn18.2	Желудочно-кишечные аденокарциномы и опухоль поджелудочной железы
Имгатузумаб	EGFR	Злокачественная опухоль
Инклацумаб	селектин Р	Злокачественная опухоль
Индатуксиимаб Равтансин	sdc1	Злокачественная опухоль
Инфликсимаб	TNF- α	Ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, псориаз, Болезнь Крона, язвенный колит
Интетумумаб	CD51	Солидные опухоли (рак предстательной железы, меланома)
Инолимумаб	CD25 (А-цепь рецептора IL-2)	Реакция «трансплантат против хозяина»

Инотузумаб озогамицин	CD22	Злокачественная опухоль
Ипилимумаб	CD152	Меланома
Аиратумумаб	CD30 (TNFRSF8)	Лимфома Ходжкина
Итолизумаб	CD6	Злокачественная опухоль
Иксекизумаб	IL-17A	Аутоиммунные заболевания
Келиксимаб	CD4	Хроническая Астма
Лабетузумаб	CEA	Колоректальный рак
Ламбролизумаб	PDCD1	Противоопухолевые агент
Лампализумаб	CFD	Злокачественная опухоль
Лебрикизумаб	IL-13	Астма
Лемалесомаб	NCA-90 (Антиген гранулоцитов)	Диагностический агент
Лерделимумаб	TGF бета 2	Уменьшение рубцевания после хирургии глаукомы
Лехатумумаб	TRAIL-R2	Злокачественная опухоль
Либивирумаб	Поверхностный антиген гепатита В	Гепатит В
Лигелизумаб	IGHE	Злокачественная опухоль
Линтузумаб	CD33	Злокачественная опухоль
Лирилумаб	KIR2D	Злокачественная опухоль
Лоделцизумаб	PCSK9	Гиперхолестеринемия
Лорвотузумаб	CD56	Злокачественная опухоль
Лусатумумаб	CD40	Множественная миелома, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина
Лумиликсимаб	CD23	Хронический лимфолейкоз
Мапатумумаб	TRAIL-R1	Злокачественная опухоль
Маргетуксимаб	Ch4d5	Злокачественная опухоль
Маврилимумаб	А-цепь рецептора GMCSF	Ревматоидный артрит
Матузумаб	EGFR	Колоректальный рак, рак легких и желудка
Меполизумаб	IL-5	Астма и болезни лейкоцитов
Метелимумаб	TGF бета-1	Системная склеродермия
Милатузумаб	CD74	Множественная миелома и другие гемобластозы
Минретумомаб	TAG-72	Злокачественная опухоль
Митумомаб	Ганглиозид GD3	Мелкоклеточный рак легкого
Могамулизумаб	CCR4	Злокачественная опухоль
Моролимумаб	резус-фактор	Злокачественная опухоль
Мотавизумаб	Респираторно- синцитиальный вирус	Респираторно-синцитиальный вирус (профилактика)
Моксетумомаб Пасудотокс	CD22	Злокачественная опухоль

Муромонаб-CD3	CD3	Предотвращение отторжения трансплантатов органов
Насоломаб Тафенатокс	Антиген C242	Колоректальный рак
Намилумаб	CSF2	Злокачественная опухоль
Наптумомаб Естафенатокс	5T4	Немелкоклеточный рак легких, рак почки
Нарнатумаб	RON	Злокачественная опухоль
Натализумаб	Интегрин А4	Рассеянный склероз, болезнь Крона
Небацумаб	эндотоксин	Сепсис
Нецитумумаб	EGFR	Немелкоклеточный рак легкого
Нерелимомаб	TNF-А	Злокачественная опухоль
Несвацумаб	Ангиопоэтин 2	Злокачественная опухоль
Нимотузумаб	EGFR	Плоскоклеточный рак, Рак головы и шеи, рак носоглотки, глиома
Ниволумаб	IgG4	Злокачественная опухоль
Нофетумомаб Мерпентан	неопределено	Злокачественная опухоль
Окаратузумаб	CD20	Злокачественная опухоль
Окрелизумаб	CD20	Ревматоидный артрит, красная волчанка
Одулимомаб	LFA-1 (CD11a)	Предотвращение трансплантации органов, браковке иммунологических заболеваний
Офатумумаб	CD20	Хронический лимфолейкоз
Оларатумаб	PDGF-R А	Злокачественная опухоль
Олокизумаб	IL6	Злокачественная опухоль
Онартузумаб	человеческая рецептор-киназа рассеивающего фактора	Злокачественная опухоль
Онтуксизумаб	TEM1	Злокачественная опухоль
Опортузумаб Монатокс	ErCam	Злокачественная опухоль
Ореговомаб	CA-125	Рак яичников
Ортисумаб	Oxldl	Злокачественная опухоль
Отлертузумаб	CD37	Злокачественная опухоль
Охелумаб	OX-40	Астма
Озанезумаб	NOGO-A	ALS и рассеянный склероз
Озорализумаб	TNF-А	Воспаление
Пагибахимаб	липотейхоевая кислота	Сепсис (<i>Staphylococcus</i>)
Паливизумаб	F-белок респираторного синцитиального вируса	Респираторно-синцитиальный вирус (профилактика)
Панитумумаб	EGFR	Колоректальный рак
Панкомаб	опухоль-специфическое	Рак яичников

	ликозилирование MUC1	
Панобасумаб	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	Инфекция <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
Парсатузумаб	EGFL7	Злокачественная опухоль
Пассолизумаб	IL-4	Астма
Патеклизумаб	LTA	TNF
Патритумаб	HER3	Злокачественная опухоль
Пемтумомаб	MUC1	Злокачественная опухоль
Перакизумаб	IL17A	Артрит
Пертузумаб	HER2/Neu	Злокачественная опухоль
Пекселизумаб	C5	Снижение побочных эффектов кардиохирургии
Пидилизумаб	PD-1	Рак и инфекционные заболевания
Пинатузумаб Ведотин	CD22	Злокачественная опухоль
Пинтумомаб	Антиген Аденокарциномы	Аденокарцинома
Пласулумаб	человеческий TNF	Злокачественная опухоль
Полатузумаб Ведотин	CD79B	Злокачественная опухоль
Понезумаб	Человеческий бета-амилоид	Болезнь Альцгеймера
Притохахимаб	токсин Шиги 1 типа <i>E. Coli</i>	Злокачественная опухоль
Притумумаб	Виментин	Рак мозга
Рго 140	CCR5	НIV-инфекция
Квилизумаб	IGHE	Злокачественная опухоль
Ракотумомаб	N-гликолилнейраминная кислота	Злокачественная опухоль
Радретумаб	экстрадомен-В Фибронектина	Злокачественная опухоль
Рафивирумаб	гликопротеин вируса бешенства	Бешенство (профилактика)
Рамусирумаб	VEGFR2	Солидные опухоли
Ранибизумаб	VEGF-A	Макулярная дегенерация (Влажная форма)
Раксибацумаб	Токсин сибирской язвы, защитный антиген	Сибирская язва (профилактика и лечение)
Регавирумаб	гликопротеин В цитомегаловируса	Цитомегаловирусная инфекция
Реслизумаб	IL-5	Воспаления Airways, кожи и желудочно-кишечного тракта
Рилотумумаб	HGF	Солидные опухоли
Ритуксимаб	CD20	Лимфомы, лейкозы, некоторые аутоиммунные расстройства

Робатумумаб	Рецептор IGF-1	Злокачественная опухоль
Роледумаб	RHD	Злокачественная опухоль
Ромосозумаб	Склеростин	Остеопороз
Ронтализумаб	IFN- α	Системная красная волчанка
Ровелизумаб	CD11, CD18	Геморрагический шок
Руплизумаб	CD154 (CD40L)	Ревматические заболевания
Самализумаб	CD200	Злокачественная опухоль
Сарилумаб	IL6	Ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилит
Сатумомаб Пендетид	TAG-72	Злокачественная опухоль
Сесукинумаб	IL-17A	Увеит, ревматоидный артрит, псориаз
Серибантумаб	ErbB3	Злокачественная опухоль
Сетоксаксимаб	токсин Шиги 1 типа <i>E. Coli</i>	Злокачественная опухоль
Севирумаб	цитомегаловирус	Цитомегаловирусная инфекция
Сибротузумаб	FAP	Злокачественная опухоль
Sgn-CD19a	CD19	Острый лимфобластный лейкоз и В-клеточная неходжкинская лимфома
Sgn-CD33a	CD33	Острый миелоидный лейкоз
Сифалимумаб	IFN-A	SLE, дерматомиозит, полимиозит
Силтуксимаб	IL-6	Злокачественная опухоль
Симтузумаб	LOXL2	Фиброз
Сиплизумаб	CD2	Псориаз, трансплантат против хозяина (профилактика)
Сирукумаб	IL-6	Ревматоидный артрит
Соланезумаб	Бета-амилоид	Болезнь Альцгеймера
Солитомаб	ErCam	Злокачественная опухоль
Сонепсизумаб	Сфингозин-1-фосфат	Хориоидальная м ретинальная неоваскуляризация
Сонтузумаб	эписиалин	Злокачественная опухоль
Стамулумаб	Миостатин	Мышечная дистрофия
Сулесомаб	NCA-90 (гранулоцитов Антиген)	Остеомиелит
Сувизумаб	HIV-1	Вирусные инфекции
Табалумаб	BAFF	В-клеточные злокачественные неоплазии
Такатузумаб Тетраксетан	Альфа-фетопроtein	Злокачественная опухоль
Тадоцизумаб	Интегрин А1В β 3	Черезкожное коронарное вмешательство
Танезумаб	NGF	Боль
Таплитумомаб паптокс	CD19	Злокачественная опухоль

Тефибазумаб	фактор агглютинации А	Инфекция <i>Staphylococcus Aureus</i>
Телимомаб	неопределено	Злокачественная опухоль
Тенатумомаб	тенасцин С	Злокачественная опухоль
Тенеликсимаб	CD40	Злокачественная опухоль
Тепротумумаб	CD221	Гематологические Опухоли
Тицилимумаб	CTLA-4	Злокачественная опухоль
Тилдракизумаб	IL23	Иммунологически опосредованные воспалительные расстройства
Тигатузумаб	TRAIL-R2	Злокачественная опухоль
Тпх-650	IL-13	Лимфома Ходжкина
Тоцилизумаб	рецептор IL-6	Ревматоидный артрит
Торализумаб	CD154 (CD40L)	Ревматоидный артрит, волчаночный нефрит
Тозитумомаб	CD20	Фолликулярная лимфома
Товетумаб	CD140a	Злокачественная опухоль
Тралокинумаб	IL-13	Астма
трастузумаб	HER2/Neu	Рак молочной железы
Trbs07	Gd2	Меланома
Тремелимумаб	CTLA-4	Злокачественная опухоль
Тукотузумаб Целмолейкин	ЕpCam	Злокачественная опухоль
Тувирумаб	Вирус гепатита В	Хронический гепатит В
Ублитуксимаб	MS4A1	Злокачественная опухоль
Урелумаб	4-1BB	Злокачественная опухоль
Уртоксазумаб	Escherichia Coli	Диарея, вызванная <i>E. Coli</i>
Устекинумаб	IL-12, IL-23	Рассеянный склероз, псориаз, псориатический артрит
Вантистумаб	рецептор Frizzled	Злокачественная опухоль
Вапаликсимаб	АОС3 (VAP-1)	Злокачественная опухоль
Вателизумаб	ITGA2	Злокачественная опухоль
Ведолизумаб	Интегрин A4β7	Болезнь Крона, язвенный колит
Велтузумаб	CD20	Неходжкинская лимфома
Вепалимомаб	АОС3 (VAP-1)	Воспаление
Весенцумаб	NRP1	Злокачественная опухоль
Волосиксимаб	Интегрин A5β1	Солидные опухоли
Ворсетузумаб	CD70	Злокачественная опухоль
Вотумумаб	Опухолевый антиген СТАА16.88	Колоректальные опухоли
Залутумумаб	EGFR	Плоскоклеточный рак головы и шеи
Затуксимаб	HER1	Злокачественная опухоль
Зиралимумаб	CD147	Злокачественная опухоль
Золимомаб Аритокс	CD5	Системная красная волчанка, трансплантат против хозяина

Антиген, ассоциированный с заболеванием, может характерно экспрессироваться в патоген-инфицированной клетке или в клетках злокачественных опухолей и

процессироваться и презентироваться на клеточной поверхности в контексте комплекса МНС, но не экспрессироваться характерным образом в нормальной клетке. Антитела, которые распознают такие пептидные фрагменты, известны в данной области техники или могут быть получены с использованием хорошо известных способов, в том числе тех, которые описаны в публикации WO 2002/014870.

Полипептиды триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению могут быть адаптированы для включения варибельного домена легкой цепи и варибельного домена тяжелой цепи (в случае первой и второй полипептидных цепей таких молекул) или тяжелой или легкой цепей (в случае третьей и четвертой полипептидных цепей таких молекул) таких антител. Таким образом, описанные выше антитела могут быть использованы для получения триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, чей сайт А, сайт В или сайт С способен связываться с эпитопом таких антигенов, ассоциированных с заболеванием].

В. Предпочтительные структурные атрибуты

Как правило, триспецифичные связывающие молекулы рассматриваемых молекул будут включать четыре различные полипептидных цепи, каждая из которых имеет аминоконец и карбоксильный конец (см. фигуры 4А-4D), при этом молекулы могут содержать меньшее или большее количество полипептидных цепей путем слияния таких полипептидных цепей друг с другом (например, через пептидную связь) или путем деления таких полипептидных цепей с образованием дополнительных цепей полипептидов, или путем ассоциации меньшего или большего количества дополнительных полипептидных цепей с помощью дисульфидных связей. Фигуры 4Е-4J иллюстрируют этот аспект настоящего изобретения путем схематического отображения таких молекул, имеющих три полипептидных цепи. Фигуры 4К-4L иллюстрируют этот аспект настоящего изобретения путем схематического отображения молекул, имеющие пять полипептидных цепей.

Различные иммуноглобулиновые домены таких молекул могут быть получены из иммуноглобулинов любого изотипа или аллотипа в том числе, без ограничения перечисленным, IgA, IgD, IgG, IgE и IgM. В предпочтительных воплощениях, как описано ниже, такие иммуноглобулины получены из иммуноглобулинов IgG. В конкретных воплощениях настоящего изобретения используемый изотип IgG представляет собой IgG1, однако могут быть использованы IgG других изотипов (например, IgG2, IgG3 или IgG4 или их аллотипы). Если согласно настоящему изобретению используется Fc-домен IgG4, то настоящее изобретение охватывает введение стабилизирующей мутации, такой как S228P, согласно нумерации по индексу EU, как указано у Kabat (Lu et al., (2008) "The

Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation,” J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969), для того, чтобы уменьшить частоту обмена цепей. Другие стабилизирующие мутации, известные в данной области могут быть введены в Fc-домен IgG4 (Peters, P et al., (2012) “*Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability*,” J. Biol. Chem., 287:24525-24533; PCT Patent Publication No: WO 2008/145142). Так как замены N297A, L234A, L235A и D265A отменяют эффекторную функцию, в обстоятельствах, при которых эффекторная функция является желательной, будет предпочтительно не использовать эти замены.

Фигуры 4A-4D обеспечивают схематическое представление доменов предпочтительных триспецифичных связывающих молекул. Фигуры 4A и 4B, соответственно, схематически иллюстрируют домены предпочтительных триспецифичных связывающих молекул, в которых связывающий домен, не относящийся к типу диатела, представляет собой связывающий домен Fab-типа или связывающий домен рецепторного типа. Фигуры 4C и 4D, соответственно, схематически иллюстрируют домены предпочтительных триспецифичных связывающих молекул, имеющих различные ориентации доменов, где связывающий домен, не относящийся к типу диатела, представляет собой связывающий домен Fab-типа или связывающий домен рецепторного типа.

Как было указано выше, один из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III, которые связаны со связывающими доменами таких примерных предпочтительных триспецифичных связывающих молекул, может быть эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием. Наиболее предпочтительно, если связывающий домен такой примерной предпочтительной триспецифичной связывающей молекулы, которая связывается с таким эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием, представляет собой связывающий домен Fab-типа. Полипептиды таких триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, могут быть адаптированы для включения переменного легкого и переменного тяжелого доменов (в случае первой и второй полипептидных цепей таких молекул) или тяжелой или легкой цепей (в случае третьей и четвертой полипептидных цепей таких молекул). Таким образом, такие антитела могут быть использованы для получения триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, чей сайт А, сайт В или сайт С способен связываться с эпитопом таких антигенов, ассоциированных с заболеванием.

1. Предпочтительная первая полипептидная цепь

Первая полипептидная цепь предпочтительной триспецифичной связывающей

молекулы по настоящему изобретению будет содержать переменный домен легкой цепи, способный связываться с эпитопом I (VL_I), переменный домен тяжелой цепи, способный связываться с эпитопом II (VH_{II}), цистеиновый остаток или цистеинсодержащий домен, домен, способствующий гетеродимеризации, и CH3-CH2-домен.

Поскольку переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи первого полипептида направлены на различные эпитопы, они не могут ассоциировать друг с другом, образуя связывающий домен, который способен связывать либо эпитоп I, либо эпитоп II. Переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи первого полипептида разнесены друг от друга с помощью промежуточного пептидного линкера, который является достаточно коротким, чтобы по существу предотвратить ассоциацию этих доменов. Примерный линкер, называемый «линкер 1», имеет последовательность (SEQ ID NO: 33): GGGSGGGG.

Переменный домен тяжелой цепи первого полипептида и домен, способствующий гетеродимеризации, из этого полипептида предпочтительно разнесены друг от друга с помощью промежуточного линкерного пептида, который содержит 1, 2, 3 или более остатков цистеина. Предпочтительный цистеинсодержащий домен («линкер 2») имеет последовательность, которая представляет собой SEQ ID NO: 2: GGCGGG. В ином случае или дополнительно, может быть использован цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации, как описано ниже.

Таким образом, в некоторых воплощениях один или несколько остатков цистеина (или цистеинсодержащий домен, например цистеинсодержащий пептидный линкер) будут включены в первую полипептидную цепь (и/или во вторую, третью, четвертую или дополнительные цепи полипептида триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению), чтобы ковалентно связывать две таких полипептидные цепи вместе, в то время как в эквивалентных воплощениях такой цистеиновый остаток(ки) может быть введен в виде домена, способствующего гетеродимеризации, или в другой домен с целью достижения того же результата.

Домен, способствующий гетеродимеризации, первого полипептида и домен, способствующий гетеродимеризации, второго полипептида выбираются скоординированно. Домены отличаются друг от друга и предназначены для того, чтобы связываться друг с другом с тем, чтобы содействовать объединению первой и второй полипептидных цепей. Например, один из доменов, способствующих гетеродимеризации, будет разработан так, чтобы он имел отрицательный заряд при pH 7, в то время как другой из второй полипептидной цепи, будет сконструирован так, чтобы иметь положительный заряд при pH = 7. Наличие таких заряженных доменов способствует связи между первым

и вторым полипептидами, и, таким образом, способствует гетеродимеризации. Несущественно, который из доменов, способствующих гетеродимеризации, предлагается каждой из цепей, при условии, что домены, используемые в первой и второй полипептидных цепях, отличаются так, чтобы способствовать гетеродимеризации между этими цепями.

В предпочтительном воплощении домен, способствующий гетеродимеризации, первой полипептидной цепи является либо Доменом с «Е-спиралью» (SEQ ID NO: 3): **E VAAL E K E VAAL E K E VAAL E K E VAAL E K**, либо доменом с «К-спиралью» (SEQ ID NO: 4): **K VAAL K E K VAAL K E K VAAL K E K VAAL K E**. Более предпочтительно, если первая полипептидная цепь будет иметь домен с «Е-спиралью». Первая полипептидная цепь может содержать только один такой спиральный разделитель, или может содержать более одного такого спирального разделителя (например, два разделителя), и может иметь одинаковый заряд, а предпочтительно-противоположный заряд.

В предпочтительном воплощении домен, способствующий гетеродимеризации, первой полипептидной цепи будет содержать либо четыре тандемных спиральных домена «Е-спираль» (SEQ ID NO: 3: **E VAAL E K- E VAAL E K- E VAAL E K- E VAAL E K**), чьи остатки глутамата дают отрицательный заряд при pH 7, либо четыре тандемных домена «К-спираль» (SEQ ID NO: 4: **k VAAL k E- k VAAL k E- k VAAL k E- k VAAL k E**), чьи остатки лизина дают положительный заряд при pH = 7. Присутствие таких заряженных доменов способствует связи между первой и второй полипептидными цепями, и, таким образом, способствует гетеродимеризации. Особенно предпочтительным является домен, способствующий гетеродимеризации, в котором один из четырех тандемных спиральных доменов «Е-спираль» SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4 был модифицирован включением остатка цистеина: **E VAA CE K- EVAALE K- E VAAL E K- E VAAL EK** (SEQ ID NO: 115), или в котором один из четырех тандемных спиральных доменов «К-спираль» SEQ ID NO: 4 был модифицирован, включением остатка цистеина: **K VAA CK E- K VAAL K E- K VAAL K E- K VAAL K E** (SEQ ID NO: 116). Другие домены с Е-спиралью и К-спиралью, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, описаны в: Woolfson, DN (2005) “*The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies,*” Adv. Prot. Chem. 70:79-112, Straussman, R. et al. (2007) “*Kinking the Coiled Coil – Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface,*” J. Molec. Biol. 366:1232-1242; Apostolovic, B. et al. (2008) “*pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil,*” Biomacromolecules 9:3173-3180; Arndt, K.M. et al. (2001) “*Helix-stabilized Fv (hsFv) Antibody Fragments: Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain,*” J. Molec.

Biol. 312:221-228; Steinkruger, J.D. *et al.* (2012) “The d’--d--d’ Vertical Triad is Less Discriminating Than the a’--a--a’ Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif,” J. Amer. Chem. Soc. 134(5):2626–2633; Ghosh, T.S. *et al.* (2009) “End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures,” Acta Crystallographica D65:1032-1041; Grigoryan, G. *et al.* (2008) “Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions,” Curr. Opin. Struc. Biol. 18:477-483; Boucher, C. *et al.* (2010) “Protein Detection By Western Blot Via Coiled–Coil Interactions,” Analytical Biochemistry 399:138-140; Cachia, P.J. *et al.* (2004) “Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy,” J. Mol. Recognit. 17:540-557; De Crescenzo, G.D. *et al.* (2003) “Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded *de novo* Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding,” Biochemistry 42:1754-1763; Fernandez-Rodriquez, J. *et al.* (2002) “Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance,” J. Molec. Biol. 323:345–362; и Zeng, Y. *et al.* (2008) “A Ligand-Pseudoreceptor System Based On *de novo* Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism,” J. Gene Med. 10:355-367).

Предпочтительно, если используемые домен, способствующий гетеродимеризации, и CH2-CH3-домен первой полипептидной цепи разнесены друг от друга промежуточным цистеинсодержащим линкерным пептидом, который обеспечивает улучшенную стабилизацию домена, содействующего гетеродимеризации. Предпочтительный цистеинсодержащий линкерный пептид («Линкер 3») имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 5): DKTHTCPPCP.

Аминокислотная последовательность CH2-CH3-домена дикого типа выглядит следующим образом (нумерация, как в индексе EU, по Kabat *et al.* (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No. 91-3242) (SEQ ID NO:6):

| CH2 →

APELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV

DGVEVHNAKT

231 240 250 260 270 280

←CH2 | CH3→

KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA K

GQPREPQVY

290 300 310 320 330 340

TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLYSK

350 360 370 380 390 400

←CH3 |

LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

410 420 430 440

В некоторых системах экспрессии, С-концевой аминокислотный остаток CH3-домена может быть посттрансляционно удален. Соответственно, С-концевой остаток CH3-домена является необязательным аминокислотным остатком.

CH2-CH3-домен первой полипептидной цепи, предпочтительно, может быть модифицирован так, чтобы способствовать гетеродимеризации между CH2-CH3-доменом третьей полипептидной цепи (см. ниже). Например, аминокислотная замена (предпочтительно замена аминокислотой, содержащей объемную боковую группу, образующую «выпуклость», например, триптофан) может быть введена в CH2- или CH3-домен таким образом, чтобы стерические помехи предотвращали взаимодействие с доменом со схожей мутацией, и помогала спаривание с доменом, в который была введена комплементарная или вмещающая мутация, то есть "углубление" (например, замена глицином). Такие наборы мутаций могут быть сконструированы в любой паре полипептидов, содержащихся в молекуле диатела, и более того, могут быть сконструированы в любой части полипептидных цепей указанной пары. Методы белковой инженерии, способствующие гетеродимеризации относительно гомодимеризации, хорошо известны в данной области техники, в частности, в отношении инженерии иммуноглобулин-подобных молекул, и охвачены в данном описании (см., например, пат. США № 7,695,936 и пат. публ. 2007/ 0196363, Ridgway et al. (1996) “*Knobs-Into-Holes Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization*,” Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) “*Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library*,” J. Mol. Biol. 270: 26-35, и Xie et al. (2005) “*A New Format Of Bi-specific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis*,” J. Immunol. Methods 296:95-101; каждый из которых включен в описание данного документа ссылкой во всей полноте). Предпочтительная выпуклость создается путем изменения нативного Fc-домена IgG модификацией T366W. предпочтительное углубление создается путем модификации нативного Fc-домена IgG модификациями T366S, L368A и Y407V. Для облегчения очистки гомодимера полипептидной цепи «углубление-выпуклость» из конечных триспецифичных

связывающих молекул, полипептидная цепь, содержащая мутации углубления, дополнительно включает замену в положении 435 (H435R) для того, чтобы удалить участок связывания с протеином А. Таким образом, гомодимеры полипептидов, содержащих мутации углубления, не будут связываться с протеином А, в то время как триспецифичные связывающие молекулы, которые образуют в результате гомодимеры, содержащие выпуклость и углубление, будут сохранять способность связывать протеин А через участок связывания протеина А на полипептидной цепи, содержащей мутацию выпуклости (knob).

CH2-CH3-домен первой полипептидной цепи, предпочтительно, будет модифицирован для того, чтобы уменьшить или отменить связывание Fc с Fc-рецепторами. Такие мутации хорошо известны в данной области и включают замены в положениях 234, 235, 265 и 297 (см. пат. США № 5624821). Предпочтительные замены включают одну или несколько из числа L234A и L235A, D265A и N297Q.

Предпочтительно, следовательно, если CH2-CH3-домен первой полипептидной цепи будет иметь последовательность с «выпуклостью», (SEQ ID NO: 7):

```

APEAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA
PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK  NQVSLWCLVK  GFYPSDIAVE
WESNGQPENN  YKTTPPVLDL  DGSFFLYSKL  TVDKSRWQQG  NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK

```

или последовательность с «углублением» с заменой H435R для отмены связывания с протеином А (SEQ ID NO: 8):

```

APEAAGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK  PREEQYNSTY  RVVSVLTVLH  QDWLNGKEYK  CKVSNKALPA
PIEKTISKAK  GQPREPQVYT  LPPSREEMTK  NQVSLSCAVK  GFYPSDIAVE
WESNGQPENN  YKTTPPVLDL  DGSFFLLYSKL  TVDKSRWQQG  NVFSCSVMHE
ALHNRYTQKS LSLSPGK

```

Предпочтительно, если первая полипептидная цепь будет иметь последовательность CH2-CH3, «несущую выпуклость», как, например, SEQ ID NO:7.

Как будет понятно, CH2-CH3-домен с «углублением» (например, SEQ ID NO: 8), можно использовать в третьей полипептидной цепи, и в этом случае, CH2-CH3-домен с «выпуклостью» (например, SEQ ID NO: 7) будет использоваться в первой полипептидной цепи.

Таким образом, резюмируя, предпочтительная первая полипептидная цепь предпочтительной триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению

будет содержать домены и линкеры: (VL_I-домен) — (линкер 1) — (VH_{II} домен) — (цистеинсодержащий домен (линкер 2)) — (домен E-спирали, способствующий гетеродимеризации) — (Линкер 3) — (CH₂-CH₃-домен, несущий выпуклость) или (VL_I-домен) — (линкер 1) — (VH_{II} домен) — (линкер 2) — (домен E-спирали, способствующий гетеродимеризации) — (Линкер 3) — (CH₂-CH₃-домен, несущий выпуклость).

2. Предпочтительная вторая полипептидная цепь

Вторая полипептидная цепь таких предпочтительных триспецифичных связывающих молекул будет включать, в направлении от N-конца к C-концу, переменный домен легкой цепи, способный связываться с эпитопом II (VL_{II}), переменный домен тяжелой цепи, способный связываться к эпитопу I (VH_I), остаток цистеина или цистеинсодержащий домен и домен, способствующий гетеродимеризации.

Поскольку переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи второго полипептида направлены на различные эпитопы, они не могут ассоциировать друг с другом, образуя связывающий домен, который способен связывать либо эпитоп I, либо эпитоп II. Переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи второго полипептида разнесены друг от друга с помощью промежуточного линкерного пептида, который является достаточно коротким, чтобы по существу предотвратить ассоциацию этих доменов. «Линкер 1», имеющий последовательность (SEQ ID NO: 1): GGGSGGGG, является примерным линкером для этой цели.

Как и в случае первой полипептидной цепи, переменный домен тяжелой цепи второго полипептида и домен, способствующий гетеродимеризации, этого полипептида предпочтительно разнесены друг от друга с помощью промежуточного цистеинсодержащего домена, который содержит 1, 2, 3 или более остатков цистеина. «Линкер 2», имеющий последовательность (SEQ ID NO: 2) GGCGGG, является примерным линкером для этой цели. Такие остатки цистеина могут образовывать дисульфидные связи с остатками цистеина в цистеинсодержащем спейсерном пептиде, отделяющем переменный домен тяжелой цепи первого полипептида и домен, способствующий гетеродимеризации, этого полипептида. Таким образом, первый и второй полипептиды триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению ковалентно связаны друг с другом. В ином случае может быть использован цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации, как описано выше.

Как уже обсуждалось выше, домен, способствующий гетеродимеризации, на второй полипептидной цепи выбирают таким образом, чтобы он координировался с доменом, способствующим гетеродимеризации, на первой полипептидной цепи. Таким образом, в предпочтительном воплощении изобретения домен, способствующий

гетеродимеризации, первой полипептидной цепи является либо доменом с «К-спиралью» (например, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:116) либо доменом с «Е-спиралью» (например, SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:115). Так как первая полипептидная цепь будет предпочтительно включать домен с «Е-спиралью», то вторая полипептидная цепь предпочтительно будет содержать домен с «К-спиралью».

Поскольку первая и вторая полипептидные цепи являются полипептидными цепями диатела, то они способны связываться вместе, с образованием домен I-связывающего домена (VLA/VHA), который распознает и иммуноспецифично связывается с эпитопом, I, и домен II-связывающий домен (VLB/VHB), который распознает и иммуноспецифично связывается с эпитопом II.

Таким образом, резюмируя, предпочтительная вторая полипептидная цепь предпочтительной триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению будет содержать домены и линкеры: (VL_{II} домен) — (линкер 1) — (VH_I домен) — (цистеинсодержащий домен (линкер 2)) — (домен К-спирали, способствующий гетеродимеризации) или (VL_{II} домен) — (линкер 1) — (VH_I домен) — (линкер 2) — (цистеин-содержащий домен К-спирали, способствующий гетеродимеризации).

3. Предпочтительная третья полипептидная цепь

Третья полипептидная цепь предпочтительной триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению представляет собой полипептид, который включает, в направлении от N-конца к С-концу, связывающий домен, цистеинсодержащий домен, который необязательно может включать СН1-шарнирный домен и СН2-СН3-домен. Связывающий домен третьей полипептидной цепи предпочтительной триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению, может представлять собой переменный домен тяжелой цепи, способной связываться с эпитопом III (VH_{III}), и в этом случае, четвертая полипептидная цепь предпочтительной триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению (обсуждается ниже), представляет собой полипептид, который содержит переменный домен легкой цепи, способный связываться с эпитопом, III (VL_{III}), таким образом, что связывающий домен способен иммуноспецифично связываться с антигеном, обладающим эпитопом III. В ином случае, связывающий домен третьей полипептидной цепи предпочтительных триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению может включать связывающий домен по типу Т-клеточного рецептора, и в этом случае, четвертая полипептидная цепь предпочтительных триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению (обсуждается ниже) представляет собой полипептид, который включает комплементарный связывающий домен по типу Т-клеточного рецептора, таким

образом, что взаимодействие двух полипептидных цепей образует связывающий домен, способный физиоспецифически связывать молекулу антигена, презентированную комплексом МНС, расположенным на поверхности клетки. Третья полипептидная цепь может быть выделена из естественных антител. В ином случае она может быть сконструирована рекомбинантным способом. Примерный CH1-домен представляет собой CH1-домен IgG1 человека, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 9):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDDKV

Примерный шарнирный домен представляет собой шарнирный домен IgG1 человека, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 10): EPKSCDKTHTCPPCP. Как будет понятно, примерный шарнирный домен содержит несколько остатков цистеина (Elkabetz et al.(2005) “*Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains,*” J. Biol. Chem. 280:14402-14412), которые могут участвовать в ковалентной связи между цепями. В ином случае, может быть использован другой цистеинсодержащий домен (например, пептид, имеющий аминокислотную последовательность: VEPKSC (SEQ ID NO: 12), AEPKSC (SEQ ID NO: 127), GVEPKSC (SEQ ID NO: 133) или GGCGGG (SEQ ID NO: 2)).

Хотя может быть использован CH2-CH3-домен дикого типа, предпочтительно, как описано выше, использовать модифицированный CH2-CH3-домен, который способствует гетеродимеризации с CH3-CH2-доменом первой полипептидной цепи.

Предпочтительно, следовательно, если CH2-CH3-домен третьей полипептидной цепи будет CH2-CH3-доменом с «углублением», чья аминокислотная последовательность является комплементарной CH2-CH3-домену с «выпуклостью» (SEQ ID NO: 7) реализуемому в первом полипептиде. Как уже обсуждалось выше, CH2-CH3-домен с «углублением» предпочтительно должен содержать замену в положении 435 (H435R) для удаления участка связывания с протеином А. Примерный CH2-CH3-домен CH2-CH3-домен с «углублением» с заменой H435R для третьего полипептида представляет собой SEQ ID NO: 8.

Как будет понятно, CH2-CH3-домен с «выпуклостью» (например, SEQ ID NO: 7), можно использовать в третьей полипептидной цепи, и в этом случае, CH2-CH3-домен с «углублением» (например, SEQ ID NO: 8) будет использоваться в первой полипептидной цепи.

В воплощении, в котором третья (и четвертая) полипептидные цепи предпочтительных триспецифических связывающих молекул по настоящему изобретению,

каждая содержит полипептидную цепь связывающего домена по типу Т-клеточного рецептора, который распознает антиген, презентированный на клеточной поверхности в контексте МНС I класса. Способы получения таких связывающих доменов по типу Т-клеточного рецептора хорошо известны (например, US2012/0294874A1).

Таким образом, резюмируя, третья полипептидная цепь из предпочтительных триспецифичных связывающих молекул настоящего изобретения включает домены и линкеры: (VH_{III} домен) – (Цистеинсодержащий домен (Необязательно CH1-домен и/или шарнирный домен) – (CH2-CH3 домен с «углублением»), или (связывающий домен рецепторного типа; его первый или второй полипептид) – цистеинсодержащий домен (необязательно CH1-домен и/или шарнирный домен) – (CH2-CH3 домен с «углублением»).

4. Предпочтительная четвертая полипептидная цепь

Четвертая полипептидная цепь предпочтительных триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению представляет собой либо полипептид связывающего домена рецепторного типа, (в котором третий и четвертый полипептиды образуют связывающий домен рецепторного типа), или, более предпочтительно, полипептидную часть легкой цепи вышеуказанного антитела, которая иммуноспецифично связывается с эпитопом III и/или которая комплементарна связывающему домену третьей полипептидной цепи.

Таким образом, если третий и четвертый полипептиды образуют связывающий домен Fab-типа, такая четвертая полипептидная цепь содержит в направлении от N-конца к C-концу, вариабельный домен легкой цепи, способный связываться с эпитопом III (VL_{III}), и цистеинсодержащий домен, содействующий ковалентному связыванию с третьей полипептидной цепью или связывающий домен и такой цистеинсодержащий домен, содействующий ковалентному связыванию с третьей полипептидной цепью. Такой цистеинсодержащий домен может быть CL-доменом или его цистеинсодержащей частью, например, (SEQ ID NO: 11) FNRGEC или (SEQ ID NO:128) GFNRGEC или линкером, таким как линкер 2 (имеющим последовательность (SEQ ID NO: 2) GGCGGG. Примерный цистеинсодержащий пептид, который образует дисульфидные связи с таким линкером 2, содержит аминокислотную последовательность VEPKSC (SEQ ID NO: 12) или шарнирный домен.

Четвертая полипептидная цепь может быть выделена из природных антител. В ином случае она может быть сконструирована рекомбинантным способом. Предпочтительный CL-домен представляет собой CL каппа домен IgG1 человека, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 13):

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC

В ином случае, примерный CL-домен представляет собой CL Лямбда2 домен IgG1 человека, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 14):

QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAHTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS

Как можно заметить, CL-домен или другой цистеинсодержащий домен четвертой полипептидной цепи содержит остатки цистеина, которые способны ковалентно связываться с остатками цистеина цистеинсодержащего домена третьей полипептидной цепи (например, CH1-домена), чтобы, таким образом, образовать ковалентный комплекс третьей и четвертой полипептидных цепей триспецифичных связывающих молекул настоящего изобретения друг с другом. Таким образом, третья и четвертая полипептидной цепи ковалентно связаны друг с другом.

Кроме того, остатки цистеина CH2-CH3-домена первой полипептидной цепи могут образовывать дисульфидные связи с остатками цистеина в CH2-CH3-доме третьей полипептидной цепи. Таким образом, первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом.

Таким образом, резюмируя, четвертая полипептидная цепь из предпочтительных триспецифичных связывающих молекул настоящего изобретения включает домены и линкеры: (VL_{III} домен) — (Цистеинсодержащий домен (необязательно CL-домен) или (связывающий домен рецепторного типа; его первый или второй полипептид) — цистеинсодержащий домен (необязательно CL-домен).

С. Альтернативная первая полипептидная цепь

В одном из воплощений, ориентации описанных выше доменов будут находиться в направлении от N-конца к C-концу. Настоящее изобретение, однако, предусматривает также изменение, в котором ориентации доменов первой полипептидной цепи следующие: NH₂-(CH3-CH2-домен, несущий выпуклость)-(VL_I-домен) — (линкер 1) — (VH_{II} домен) — (цистеинсодержащий домен, Линкер 2) — (домен E-спирали, способствующий гетеродимеризации). Предпочтительно, если присутствует цистеин-содержащий пептид, N-концевой к такому CH2 -CH3-дому. Последовательность примерного пептида представляет собой (SEQ ID NO: 5): DKTHTCPPCP, однако могут быть использованы альтернативные линкеры, например, EPKSCDKTHTCPPCP (SEQ ID NO: 129) или LEPKSSDKTHTCPPCP; SEQ ID NO: 130). Предпочтительно в этом воплощении, если CH3-домен отделен от VL_I-домена промежуточным пептидным линкером, таким как линкер, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 15): APSSS, а более

предпочтительно, имеющий аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 16) APSSSPME, однако могут быть использованы альтернативные линкеры, например, ASTKG (SEQ ID NO: 131), LEPKSS (SEQ ID NO: 132), GGC или GGG.

D. Альбумин-связывающий домен

Как раскрыто в WO 2012/018687, для того, чтобы улучшить фармакокинетические свойства диател *in vivo*, диатело может быть модифицировано для включения полипептидной части сывороточного связывающего белка на одном или нескольких концах диатела. Такие соображения также применимы к триспецифичным связывающим молекулам по настоящему изобретению. Наиболее предпочтительно, если необходимо включить полипептидную часть белка, связывающего сыворотку, в триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению, то такая полипептидная часть будет установлена на С-конце одной из полипептидных цепей триспецифичной связывающей молекулы.

Альбумин является наиболее распространенным белком в плазме и имеет период полужизни 19 дней в организме человека. Альбумин обладает несколькими участками связывания малых молекул, которые позволяют ему нековалентно связываться с другими белками и тем самым увеличивать их периоды полужизни в сыворотке. Альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) белка G из штамма *Streptococcus* G148 состоит из 46 аминокислотных остатков, образующих устойчивый трехспиральный пучок и имеет широкую специфичность связывания альбуминов (Johansson, MU et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120. Таким образом, особенно предпочтительная полипептидная часть белка для связывания сыворотки для улучшения фармакокинетических свойств диатела *in vivo* представляет собой Альбумин-связывающий домен (ABD) стрептококкового протеина G, а более предпочтительно, альбумин-связывающий домен 3 (ABD3) протеина G штамма *Streptococcus* G148 (SEQ ID NO: 123): LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALP.

Как раскрыто в WO 2012/162068 (включен в данный документ ссылкой), «деиммунизированные» варианты SEQ ID NO: 123 обладают способностью ослаблять или устранять связывание с МНС класса II. На основе результатов комбинаторных мутаций, следующие комбинации замен считаются предпочтительными заменами для формирования такого деиммунизированного альбумин-связывающего домена: 66S/70S +71A; 66S/70S +79A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E. Вариантные ABD имеют модификации L64A, I65A и D79A или модификации N66S, T70S и D79A. Вариантный

деиммунизированный ABD, имеющий аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNA_{A64}A_{A65}NNAKT VEGVKALIA_{A79}E ILAALP (SEQ ID NO:124),

или аминокислотную последовательность:

LAEAKVLANR ELDKYGVSDY YKNLIS_{S66}NAKS_{S70} VEGVKALIA_{A79}E ILAALP (SEQ ID NO:125),

являются предпочтительными в качестве деиммунизированных альбумин-связывающих доменов, демонстрирующих по существу связывание дикого типа, при этом обеспечивая ослабленное связывание с МНС класса II. Хотя такие альбумин-связывающие домены могут быть включены в любую из полипептидных цепей триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, предпочтительно расположить такой домен на С-конце домена с Е-спиралью (или К-спиралью) первой или третьей полипептидных цепей (через линкер, который проходит между доменом с Е-спиралью (или К-спиралью) и альбумин-связывающим доменом (который предпочтительно представляет собой деиммунизированный альбумин-связывающий домен)). Предпочтительная последовательность для такой линкера представляет собой SEQ ID NO: 126: GGGG.

Е. Функциональность Fc-домена

В одном из воплощений CH2-CH3-домен первой полипептидной цепи и CH2-CH3-домен третьего полипептида будет объединяться в комплекс с образованием Fc-домена, который, по существу, не способен связываться с Fc-рецептором (т.е. имеет связывание на уровне менее 10% от уровня Fc-домена дикого типа. В ином случае Fc-домен таких молекул будет способен связываться с Fc-рецептором в физиологических условиях, так что такие триспецифичные связывающие молекулы будут тетраспецифичными, способными опосредовать скоординированные связывания с четырьмя молекулами (эпитопом I, эпитопом II и эпитопом III, и Fc-рецептором). Наиболее предпочтительно, если такие молекулы, способные связываться с Fc-рецептором, дополнительно опосредуют зависимую от Fc-рецептора эффекторную функцию.

Изобретение также охватывает молекулы, включающие варианты Fc-домены, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, вставок или делеций по отношению к сопоставимому Fc-домену дикого типа. Молекулы, содержащие варианты Fc-домены, обычно имеют измененные фенотипы по отношению к молекулам, содержащим Fc-домены дикого типа. Вариантный фенотип может быть выражен измененным периодом полужизни в сыворотке, измененной стабильностью, измененной восприимчивостью к клеточным ферментам или измененной эффекторной функцией,

проанализированных в NK-зависимом или макрофаг-зависимом анализе. Модификации Fc-домена, идентифицированные как изменяющие эффекторную функцию, известны в данной области техники, в том числе и модификации, которые увеличивают его связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и уменьшающие связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B) (см., например, Stavenhagen, J.B. et al. (2007) “*Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ Receptors,*” *Cancer Res.* 57(18):8882-8890). Примерные варианты Fc-доменов человеческого IgG1 с пониженной способностью к связыванию с CD32B и/или повышенным связыванием с CD16A содержат замены F243L, R292P, Y300L, V305I или P296L. Эти аминокислотные замены могут присутствовать в Fc-домене IgG1 человека в любой комбинации. В одном из воплощений вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замены F243L, R292P и Y300L. В другом воплощении изобретения вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замены F243L, R292P, Y300L, V305I и P296L. В другом воплощении изобретения вариант Fc-домена IgG1 человека содержит замену N297Q, замены L234A и L235A или замену D265A, так как эти мутации отменяют связывание с FcR.

III. Примеры триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению: триспецифичные связывающие молекулы, содержащие связывающие домены, которые связываются с эпитопами CD3 и CD8 и эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием

Как было указано выше, настоящее изобретение, в частности, относится к воплощению триспецифичных связывающих молекул, в которых три эпитопа выбраны таким образом, чтобы один или два из этих эпитопов представляли собой эпитоп(ы) из клетки иммунной системы, и, в особенности, цитотоксического лимфоцита иммунной системы (CTL), и в котором оставшийся эпитоп(ы) представлял(и) собой эпитоп(ы) антигена, ассоциированного с заболеванием. В особенно предпочтительном воплощении такой триспецифичной связывающей молекулы, связывающие домены такой молекулы выбраны таким образом, чтобы эпитоп I, эпитоп II или эпитоп III представлял собой эпитоп CD3, второй из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представлял собой эпитоп CD8, а третий из эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представлял собой эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием, где связывающие домены I, II и III, таких триспецифичных связывающих молекул опосредовали скоординированное связывание с цитотоксической Т-клеткой и клетками, экспрессирующими антиген, ассоциированный с заболеванием. Такие триспецифичные связывающие молекулы способны локализовать

цитотоксический лимфоцит на клетке, которая экспрессирует антиген, ассоциированный с заболеванием, и тем самым облегчить уничтожение клеток, которые экспрессируют антиген, ассоциированный с заболеванием. Антиген, ассоциированный с заболеванием может быть антигеном злокачественной опухоли или может представлять собой антиген, который характерен для патогена (например, бактериальной, грибной, вирусной или протозойной) инфекции. Более конкретно, изобретение относится к таким триспецифичным связывающим молекулам, которые способны опосредовать скоординированное связывание с: (1) эпитопом CD3, (2) эпитопом CD8, и (3) эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием. Путем связывания с CD3 и CD8, и антигеном, ассоциированным с заболеванием, такие молекулы колокализуют цитотоксические Т-клетки и клетки, презентующие антиген, ассоциированный с заболеванием, что приводит к активации таких Т-клеток и инициации цитотоксической реакции против клеток, экспрессирующих антиген, ассоциированный с заболеванием.

Могут быть применены тяжелые цепи анти-CD3 или анти-CD8 антител в качестве третьей полипептидной цепи таких типичных триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению. Аналогично, могут быть использованы легкие цепи таких антител в качестве четвертой полипептидной цепи триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению. В ином случае переменные домены легкой цепи и/или переменные домены тяжелой цепи таких антител могут быть объединены с другими иммуноглобулиновыми константными областями для получения таких третьих и четвертых полипептидных цепей. Таким образом, такие антитела могут быть использованы для производства триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, чей сайт С способен связываться с CD3 или CD8.

Аналогичным образом, такие переменные домены могут быть включены в части переменных доменов первого и третьего полипептида триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, с тем чтобы получить триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению, чей сайт А способен связывать CD3 или CD8, или чей сайт В способен связывать CD3 или CD8.

1. Примеры анти-CD3 антител

Могут быть использованы любые примеры анти-CD3 или анти-CD8 антител, приведенные ниже, для получения CD3- или CD8-связывающих доменов триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению.

ОКТ3

Переменный домен легкой цепи ОКТ3 (SEQ ID NO: 17) (CDR выделены подчеркиванием):

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT
SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQOW SSNPFTFGSG TKLEINR

Вариабельный домен тяжелой цепи OKT3 (SEQ ID NO: 18) (CDR выделены подчеркиванием):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY
INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY
DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGDITGS SVTLGCLVKG
 YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TTPAVLQSDL YTLSSSVTVT SS

M291

Вариабельный домен легкой цепи M291 (SEQ ID NO: 19) (CDR выделены подчеркиванием):

DIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWTYDT
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DADTYYCQOW SSNPPTFGSG TKLEIK

Вариабельный домен тяжелой цепи M291 (SEQ ID NO: 20) (CDR выделены подчеркиванием):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFI SYTMHWVKQR PGQGLEWIGY
INPRSGYTHY NQKCLKKATL TADKSSSSAY MQLSSLTSED SAVYYCARSA
YYDYDGFAYW GQGLVTVSA

YTH12.5

Вариабельный домен легкой цепи YTH12.5 (SEQ ID NO: 21) (CDR выделены подчеркиванием):

MGWSCILFL VATATGVHSD IQLTQPNSVS TSLGSTVKLS CTLSSGNIEN
NYVHWYQLYE GRSPTTMIYD DDKRPDGVPD RFGSIDRSS NSAFLTIHNV
 AIEDEAIYFC HSYVSSFNVF GGGTKLTVLR

Вариабельный домен тяжелой цепи YTH12.5 (SEQ ID NO: 22) (CDR выделены подчеркиванием):

MGWSCILFL VATATGVHSE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS
FPMAWVRQAP GKGLEWVSTI STSGGRTYR DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL
 QMNSLRAEDT AVYYCAKFRQ YSGGFDYWGQ GTLVTVSS

Гуманизированное анти-CD3 антитело 1 («CD3 mAb 1») (US2014/0099318A1)

Вариабельный домен легкой цепи CD3-mAb 1 (SEQ ID NO: 23) Вариант 1 (CDR выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASSSVS YMNWYQQKPG KAPKRLIYDS
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQOW SRNPPTFGGG TKVEIK

Вариабельный домен легкой цепи CD3-mAb 1 (SEQ ID NO: 24) Вариант 2 (CDR

выделены подчеркиванием):

DVVMTQSPAI MSAFPGEKVT ITCSASSVS YMNWYQKPG KAPKRWIYDS
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPE DFATYYCQQW SRNPPTFGGG TKVEIK

Вариабельный домен тяжелой цепи CD3-mAb 1 (SEQ ID NO: 25) Вариант 1 (CDR выделены подчеркиванием):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RSTMHWVVRQA PGQGLEWIGY
INPSSAYTNY NQKFKDRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCASPQ
VHYDYNGFY WGQGTLVTVS S

Гуманизированное анти-CD3-антитело 2 («CD3 mAb 2») (US2014/0099318A1)

Вариабельный домен легкой цепи CD3-mAb 2 (SEQ ID NO: 26) (CDR выделены подчеркиванием):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

Вариабельный домен легкой цепи CD3-mAb 2 (SEQ ID NO: 27) (CDR выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT VTVSS

Вариабельный домен тяжелой цепи CD3-mAb 2, вариант D65G (SEQ ID NO: 28) (CDR выделены подчеркиванием):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT VTVSS

2. Примерные анти-CD8 антитела

OKT8 («CD8 mAb 1»)

Вариабельный домен легкой цепи OKT8 (SEQ ID NO: 29) (CDR выделены подчеркиванием):

DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYDNSLMHWY QKPGQPPKV
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY
IFGGGTKLEI KR

Вариабельный домен тяжелой цепи OKT8 (SEQ ID NO: 30) (CDR выделены подчеркиванием):

QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKASGYTFT DYNMHWVKQS HGKSLEWIGY
IYPYTGGTGY NQKFKNKATL TVDSSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARNF

RYTYWYFDVW GQGTTVTVSS

TRX2 («CD8 mAb 2»)

Вариабельный домен легкой цепи TRX2 (SEQ ID NO: 31) (CDR выделены подчеркиванием):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSODIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIK

Вариабельный домен тяжелой цепи TRX2 (SEQ ID NO: 32) (CDR выделены подчеркиванием):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL
IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
YDGYHHFFDS WGQGLVTVS S

3. Примеры связывающих доменов, которые связываются с эпитопами антигенов, ассоциированных с заболеваниями

(a) HIV gp41

Иллюстративный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой gp41 HIV. Пример gp41-антитела представляет собой 7B2 («HIV mAb 1»).

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи 7B2 (SEQ ID NO: 35):

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTL L YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP
KLLLYWASMR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT INNLAEDVA IYYCHQYSSH
PPTFGHGTRV EIK

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи 7B2 (SEQ ID NO: 36):

QVQLVQSGGG VFKPGGSLRL SCEASGFTFT EYYMTWVRQA PGKGLEWLAY
ISKNGEYSKY SPSSNGRFTI SRDNAKNSVF LQLDRLSADD TAVYYCARAD
GLTYFSELLQ YIFDLWGQGA RVTVSS

(b) HIV gp120

Второй иллюстративный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой gp120 HIV. Пример gp120 антитела представляет собой A32 («HIV mAb 2»).

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи A32 VL (SEQ ID NO: 33):

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH HPGKAPKLI
SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHNFBV
FGGGTKLTVL

Аминокислота Последовательность вариабельного домена тяжелой цепи A32 VH

(SEQ ID NO: 34):

QVQLQESGPG LVKPSQTLSL SCTVSGGSSS SGAHYWSWIR QYPGKGLEWI
 GYIHYSNTY YNPSLKSRLT ISQHTSENQF SLKLNSVTVA DTAVYYCARG
 TRLRTLRFNAF DIWGQGTMTVSS

(с) гликопротеин F из RSV

Дополнительный иллюстративный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой гликопротеин F из RSV. Примерное анти-RSV гликопротеин F антитело представляет собой паливизумаб («RSV mAb 1»).

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи паливизумаба (SEQ ID NO: 37):

DIQMTQSPST LSASVGDRVT ITCRASQSVG YMHWYQQKPG KAPKLLIYDT
 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи паливизумаба (SEQ ID NO: 38):

QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL S TSGMSVSWIR QPPGKALEWL
 ADIWWDDKKD YNPSLKSRLT ISKDTSKNQV VLKVTNMDPA DTATYYCARS
 MITNWFYFDVW GAGTTVTVSS

(d) B7-H3

Особенно предпочтительный иллюстративный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой B7-H3, который экспрессируется в клетках разнообразных злокачественных опухолей (например, нейробластомы, рака желудка, яичников и немелкоклеточного рака легкого и *т.д.*). Экспрессия белка B7-H3 был обнаружена иммуногистологически в опухолевых клеточных линиях (Charoval A. *et al.* (2001) “*B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- γ Production*,” *Nature Immunol.* 2:269–274; Saatian, B. *et al.* (2004) “*Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation*,” *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287:L217–L225; Castriconi *et al.* (2004) “*Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34):12640-12645; Sun, M. *et al.* (2002) “*Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes*,” *J. Immunol.* 168: 6294-6297). Экспрессия мРНК была обнаружена в сердце, почках, яичках, легких, печени, поджелудочной железе, предстательной железе, толстой кишке и остеобластах (Collins, M. *et al.* (2005) “*The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands*,” *Genome Biol.* 6:223.1-223.7). На белковом уровне B7-H3 встречается в человеческой печени, легких, мочевом пузыре, яичке, предстательной железе, молочной железе, плаценте и лимфоидных органах

(Hofmeyer, K. et al. (2008) “*The Contrasting Role Of B7-H3*,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278). Иллюстративные антитела, которые связываются с B7-H3, включают гуманизированные «BRCA84D», «BRCA69D» и «PRCA157» (WO 2011/109400). Примерные переменные домены легкой и тяжелой цепей имеют следующие последовательности (CDR выделены подчеркиванием):

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи примерного гуманизированного BRCA84D-5VL (SEQ ID NO: 39):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GQAPKALIYS
ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNNYPTFTGQ GTKLEIK

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи примерного гуманизированного BRCA84D-2VH (SEQ ID NO: 40):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCGRGR
ENIYYGSRLD YWGQTTVTV SS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи примерного гуманизированного BRCA69D («B7-H3 mAb 1») (SEQ ID NO: 41):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIK

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи примерного гуманизированного BRCA69D («B7-H3 mAb 1») (SEQ ID NO: 42):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
IYPGDGTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи примерного PRCA157 (SEQ ID NO: 43):

DIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIY SYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYCQH HYGTPPWTFG
GGTNLEIK

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи примерного PRCA157 (SEQ ID NO: 44):

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAT
INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSLKSED TAMYYCARHD
GGAMDYWGQG TSVTVSS

(e) Опухолевый антиген A33

Опухолевый антиген A33 представляет собой другой иллюстративный антиген,

ассоциированный с заболеванием. Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи примерного гуманизированного антитела анти-A33 («gpA33 mAb 1») представляет собой (SEQ ID NO: 45):

QIVLTQSPAI MSASPGERVT MTCSARSSIS FMYWYQQKPG SSPRLLIYDT
SNLASGVPVR FSGSGSGTSY SLTISRMEAE DAATYYCQQW SSYPLTFGSG TKLELKR

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи такого примерного гуманизированного анти-A33 (gpA33 mAb 1) антитела представляет собой (SEQ ID NO: 46):

QVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKASGYTFS GSWMNVVKQR PGQGLEWIGR
IYPGDGETNY NGKFKDKATL TADKSSTAY MELSSLTSVD SAVYFCARIY
GNNVYFDVWG AGTTVTVSS

(f) Опухолевый антиген 5T4

Опухолевый антиген 5T4 представляет собой еще один иллюстративный антиген, ассоциированный с заболеванием. Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи примерного гуманизированного анти-5T4 mAb 1 антитела («5T4 mAb 1») представляет собой (SEQ ID NO: 47):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR
ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ GTKLEIK

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи такого примерного гуманизированного 5T4 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 48):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SFWMHWVRQA PGQGLEWMGR
IDPNRGGTEY NEKAKSRVTM TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAGGN
PYYPMDYWGQ GTTVTVSS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи второго примерного гуманизированного 5T4 mAb 1 антитела («5T4 mAb 2») представляет собой (SEQ ID NO: 49):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFOGSHVP
FTFGSGTKLE IK

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи такого второго примерного гуманизированного 5T4 mAb 2 антитела представляет собой (SEQ ID NO: 50):

QVQLQQPGAE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYWITWVKQR PGQGLEWIGD
IYPGSGRANY NEKFKSKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYNCARYG
PLFTTVVDPN SYAMDYWGQG TSVTVSS

(g) Антиген ROR1

Опухолевый антиген ROR1 представляет собой еще один иллюстративный антиген, ассоциированный с заболеванием. Примерные антитела против ROR1 включают антитела 2A2 (WO 2010/124188), R11 (WO 2012/075158) и R12 (WO 2012/075158).

Аминокислотная последовательность легкой цепи переменного домена антитела 2A2 представляет собой (SEQ ID NO: 53):

DIVMTQSQKI MSTTVGDRVS ITCKASQNVD AAVAWYQQKP GQSPKLLIYS
ASNRYTGVDPD RFTGSGSGTD FTLTISNMQS EDLADYFCQQ YDIYPYTFGG GTKLEIK

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи переменного домена антитела 2A2 представляет собой (SEQ ID NO: 54):

QVQLQSGAE LVRPGASVTL SCKASGYTFS DYEMHWVIQT PVHGLEWIGA
IDPETGGTAY NQKFKGKAIL TADKSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCTGY
DYDSFTYWGQ GTLVTVSA

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела R11 представляет собой (SEQ ID NO: 55):

ELVMTQTPSS TSGAVGGTVT INCQASQSID SNLAWFQQKP GQPPTLLIYR
ASNLASGVPS RFSGSRSGTE YTLTISGVQR EDAATYYCLG GVGNVSYRTS
FGGGTEVVVK

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела R11 представляет собой (SEQ ID NO: 56):

QSVKESEGDL VTPAGNLTLT CTASGSDIND YPISWVRQAP GKGLEWIGFI
NSGGSTWYAS WVKGRFTISR TSTTVDLKMT SLTTDDTATY FCARGYSTYY
GDFNIWGPQT LVTISS

Аминокислотная последовательность переменного домена легкой цепи антитела R12 представляет собой (SEQ ID NO: 57):

ELVLTQSPSV SAALGSPAKI TCTLSSAHKT DTIDWYQQLQ GEAPRYLMQV
QSDGSYTKRP GVPDRFSGSS SGADRYLIIP SVQADDEADY YCGADYIGGY
YFGGGTQLTV TG

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи антитела R12 представляет собой (SEQ ID NO: 58):

QEQLVESGGR LVTPGGSLTL SCKASGFDFS AYYMSWVRQA PGKGLEWIAT
IYPSSGKTY ATWVNGRFTI SSDNAQNTVD LQMNSLTAAD RATYFCARDS
YADDGALFNI WGPGLTIVTIS S

Одним из аспектов настоящего изобретения (более подробно описано ниже), является обеспечение более предпочтительного гуманизованного анти-ROR1 антитела

(«ROR1 mAb 1»). Это более предпочтительное ROR1 mAb 1 имеет переменный домен легкой цепи, имеющий последовательность (SEQ ID NO: 51):

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP GKAPRYLMKL
EGSGSYNKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYCGTDYPGN
YLFGGGTQLT VL

Аминокислотная последовательность переменного домена тяжелой цепи такого более предпочтительного гуманизированного ROR1 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 52):

QEQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMSWVRQA PGKGLEWVAT
IYPSSGKTY ADSVKGRFTI SSDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDS
YADDAALFDI WGQGTTVTVS S

IV. Выбор сайта связывания: сайт А, сайт В и сайт С

Как было указано выше, предпочтительные триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению являются по меньшей мере, триспецифичными, имеющими «внешний» связывающий домен по типу диатела (сайт А), который расположен на противоположной стороне от связывающего домена III, «внутренний» связывающий домен по типу диатела (сайт В), который расположен ближе всего к связывающему домену III, и связывающий домен III (сайт С). При использовании в данном описании описание специфичной связывающей молекулы, такое как «X/Y/Z», указывает на то, что X-связывающий домен находится на сайте А, Y-связывающий домен является на сайте В и Z-связывающий домен находится на сайте С. Например, обозначение триспецифичной связывающей молекулы «B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1» указывает на то, что переменный домен B7-H3 mAb 1 занимает сайт А триспецифичной связывающей молекулы, переменный домен CD3 mAb 2 занимает сайт В и переменный домен CD8 mAb 1 занимает сайт С триспецифичной связывающей молекулы.

Таким образом, настоящее изобретение позволяет выбрать, какой из таких сайтов будет использоваться для связывания конкретного искомого эпитопа. Один из факторов, определяющий такой выбор, в частности, с триспецифичными связывающими молекулами, которые связываются с CD3, CD8 и антигеном, ассоциированным с заболеванием, предполагает рассмотрение этого эффекта и желательность трогоцитоза. «Трогоцитоз» представляет собой процесс, посредством которого клетка может приобрести часть клеточной мембраны клетки, с которой она контактирует (Masuda, S. et al. (2013) “Possible Implication Of Fc γ Receptor-Mediated Trogocytosis In Susceptibility To Systemic Autoimmune Disease,” Clin. Dev. Immunol. 2013: Article ID 345745, 6 pp); Dhainaut,

M. et al. (2014) "Regulation of Immune Reactivity by Intercellular Transfer," Front Immunol. 5:112; Ahmed, K.A. et al. (2011) "Mechanisms Of Cellular Communication Through Intercellular Protein Transfer," J. Cell. Mol. Med. 15(7):1458-1473; Ahmed, K.A. et al. (2008) "Intracellular Trogocytosis plays important role in modulation of immune responses" Cell.Mol. Immunol. 5 (4): 261-269; LeMaout, J. et al. (2007) «Exchanges Of Membrane Patches (Trogocytosis) split theoretical and actual functions of immune cells," Hum.Immunol. 68(4):240-243; Caumartin. Bird et al. (2006) "Intercellular Exchanges Of Membrane Patches (Trogocytosis) Highlight The Next Level Of Immune Plasticity," Transpl. Immunol. 17(1):20-22).

Приобретение родственных лигандов МНС класса I индуцирует трогоцитоз цитотоксических Т-лимфоцитов, которые становятся «приобретшими Treg» клетками, которые опосредуют уничтожение («фратрицид») других цитотоксических Т-клеток тем самым, способствуя т очистке CD8⁺ клеток (D'Acquisto, F. et al. (2011) "CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ (Double Negative) T Cells: Saviours Or Villains Of The Immune Response?" Biochem. Pharmacol. 82:333-340; Joly, E. et al. (2003) "What Is Trogocytosis And What Is Its Purpose?" Туземный Immunol. 4:815-; Hudrisier, D. et al. (2007) "Capture Of Target Cell Membrane Components Via Trogocytosis Is Triggered By A Selected Set Of Surface Molecules On T Or B Cells," J. Immunol. 178:3637-3647).

Триспецифичная связывающая молекула по настоящему изобретению, которая обладает CD3-связывающем доменом в положении сайта C, имеет атрибуты антитела против CD3, а также такая триспецифичная связывающая молекула, обладающая CD8-связывающим доменом в положении сайта C, имеет атрибуты анти-CD8 антитела. Было показано, что нейтрофил, моноцит или макрофаг, имеющий Fc-рецептор, который связан с Fc-доменом анти-CD8 антитела (который связан с CD8-молекулой Т-клетки), способен переносить антитела и связанную молекулу CD8 из Т-клетки к себе с помощью трогоцитоза и затем быстро интернализировать антитело; неспецифичные молекулы, такие как TCR и CD3, также могут переноситься в этом процессе (Masuda, S. et al., (2013) "Possible Implication of Fcg Receptor-Mediated Trogocytosis in Susceptibility to Systemic Autoimmune Disease," Clin. Develop. Immunol. 2013:Article ID 345745, 6 pages).

Структуры CD3 и CD8 отличаются тем, что CD3 лежит близко к клеточной мембране, в то время как CD8 простирается дальше от клеточной мембраны. Таким образом, ожидается, что Fc-рецепторный трогоцитоз CD3 с помощью анти-CD3 антитела будет более эффективным, чем Fc-рецепторный трогоцитоз из CD8 с помощью анти-CD8 антитела.

Это явление указывает на то, что триспецифичная связывающая молекула по

настоящему изобретению, которая связывается с CD3, CD8 и антигеном, ассоциированным с заболеванием, чей CD3-связывающий домен расположен на месте сайта С будет демонстрировать меньшую цитотоксичность, чем аналогичная триспецифичная связывающая молекула, в которой CD3-связывающий домен находится на месте сайта А или сайта В. Таким образом, избрав место для CD3-связывающего домена на сайте С (в противоположность либо сайту А, либо В), можно модулировать степень цитотоксичности. Кроме того, можно собрать фармацевтические композиции, которые содержат смесь из CD3 на «сайте С» и «сайте А (или В)» для того, чтобы получить предпочтительную степень цитотоксичности.

V. Анти-ROR1 mAb 1 антитело

Как было указано выше, один из аспектов настоящей заявки заключается в предоставлении высокопредпочтительного гуманизированного антитела анти-ROR1 («ROR1 mAb 1»), чей переменный домен легкой цепи имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 51):

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP GKAPRYLMKL
EGSGSYNKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYCGTDYPGN
YLFGGGTQLT VL

и чей переменный домен тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность (SEQ ID NO: 52):

QEQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYYMSWVRQA PGKGLEWVAT
IYPSSGKTTY ADSVKGRFTI SSDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARDS
YADDAALFDI WGQGTTVTVS S

Последовательностями CDR_{L1}, CDR_{L2}, и CDR_{L3} переменного домена легкой цепи такого ROR1 mAb 1 антитела являются:

CDR_{L1} переменного домена легкой цепи (SEQ ID NO: 117): TLSSGHKTDITD

CDR_{L2} переменного домена легкой цепи (SEQ ID NO: 118): LEGSGSY

CDR_{L3} переменного домена легкой цепи (SEQ ID NO: 119): GTDYPGNYL

Последовательностями CDR_{H1}, CDR_{H2} и CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи такого ROR1 mAb 1 антитела являются:

CDR_{H1} переменного домена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 120): GFTFSDYYMS

CDR_{H2} переменного домена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 121):
 TIYPSSGKTTYADSVKG

CDR_{H3} переменного домена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 122): DSYADDAALFDI

ROR1 mAb 1 антитело опосредует повышенную цитотоксичность и является менее иммуногенным по сравнению с известными анти-ROR1 антителами (например, анти-

ROR1 антителом R12).

Изобретение охватывает не только такие последовательности, но и интактные производные антител ROR1 mAb антитела (включая его химерные или гуманизированные производные), которые обладают 1, 2 или 3 CDR такого переменного домена легкой цепи (SEQ ID NO: 51, CDR выделены подчеркиванием) или 1, 2 или 3 из CDR такого переменного домена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 52; CDR выделены подчеркиванием), и которые иммуноспецифично связываются с ROR1. Более предпочтительно, если такие охватываемые антитела, химерные антитела и гуманизированные антитела будут обладать 1, 2 или 3 CDR такого переменного домена легкой цепи (SEQ ID NO: 51, CDR выделены подчеркиванием), и 1, 2 или 3 из CDR такого переменного домена тяжелой цепи (SEQ ID NO: 52; CDR выделены подчеркиванием), и будут иммуноспецифично связываться с ROR1. Наиболее предпочтительно, если такие охватываемые антитела, химерные антитела и гуманизированные антитела будут обладать всеми 3-мя CDR такого переменного домена легкой цепи, и всеми 3-мя CDR такого переменного домена тяжелой цепи и будут способны иммуноспецифично связываться с ROR1.

Кроме того, изобретение охватывает фрагменты и производные таких охватываемых ROR1 mAb 1 антител, в том числе молекулы Fab, Fab', F(ab')₂ Fv), одноцепочечных (ScFv), "BiTEs®", "DART™", их мутанты, встречающиеся в природе варианты и слитые белки, все из которых содержат 1, 2 или 3 CDR переменного домена легкой цепи или 1, 2, или 3 из CDR переменного домена тяжелой цепи или 1, 2 или 3 CDR переменного домена легкой цепи, а также 1, 2, или 3 из CDR переменного домена тяжелой цепи, и которые способны иммуноспецифично связываться с ROR1.

В предпочтительном воплощении такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты или производные могут иметь варианты Fc-домены. Модификация Fc-домена, как правило, приводит к измененному фенотипу, например, измененному периоду полужизни в сыворотке, измененной стабильности, измененной восприимчивости к клеточным ферментам или к измененной эффекторной функции. Может оказаться желательным модифицировать антитело по изобретению в отношении эффекторной функции, с тем чтобы повысить эффективность антитела при лечении, например, злокачественной опухоли. Снижение или устранение эффекторной функции является желательным в некоторых случаях, например в случае антител, механизм действия которых включает блокирование или антагонизм, но не уничтожение клеток, несущих антиген-мишень. Увеличение эффекторной функции, как правило, желательно, когда она направлена на нежелательные клетки, такие как опухолевые и чужеродные клетки, в которых FcγR экспрессируется на низком уровне, например, опухоль-специфичные В-клетки с низким

уровнем Fc γ RIIB (например, при неходжкинской лимфоме, CLL и лимфоме Беркитта). В указанных воплощениях молекулы по изобретению с предусмотренной или измененной активностью эффекторной функции могут быть использованы для лечения и/или профилактики заболевания, расстройства или инфекции, при которых желательна улучшенная эффективность активности эффекторной функции.

В некоторых воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, или их производные включают одну или несколько модификаций аминокислот в Fc-домене, которые уменьшают аффинность и авидность Fc-домена такой молекулы к одному или нескольким Fc γ R-рецепторам. В других воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, или их производные могут содержать одну или несколько модификаций аминокислот в Fc-домене, которые увеличивают аффинность и авидность Fc-домен такой молекулы к одному или нескольким Fc γ R-рецепторам. В других воплощениях молекулы включают вариантный Fc-домен, в котором указанный вариант придает или опосредует повышенную ADCC-активность и/или увеличение связывания с Fc γ RIIA, относительно молекулы, не содержащей Fc-домен или содержащей Fc-домен дикого типа. В альтернативных воплощениях молекулы включают вариантный Fc-домен, в котором указанный вариант придает или опосредует снижение ADCC -активности (или другой эффекторной функции) и/или увеличение связывания с Fc γ RIIB, относительно молекулы, не содержащей Fc-домен или содержащей Fc-домен дикого типа.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение охватывает такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты или производные, которые включают вариантный Fc-домен, который не демонстрирует детектируемого связывания с любым Fc γ R по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей Fc-домен дикого типа. В других воплощениях настоящее изобретение охватывает такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, или их производные, которые содержат вариантный Fc-домен, который связывается только с одним Fc γ R, предпочтительно одним из Fc γ RIIA, Fc γ RIIB или Fc γ RIIA.

Такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты или производные могут включать измененные аффинности для активирующего и/или ингибирующего Fc γ -рецептора. В одном из воплощений триспецифичная связывающая молекула содержит вариант Fc-домена, который имеет повышенную аффинность к Fc γ RIIB и пониженную аффинность к Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA, по сравнению с сопоставимой молекулой с Fc-доменом дикого типа. В другом воплощении такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты или производные могут содержать вариант Fc-домена, который имеет сниженную аффинность к Fc γ RIIB и повышенную аффинность к Fc γ RIIA и/или Fc γ RIIA, по сравнению с сопоставимой молекулой с Fc-доменом дикого типа. В еще одном воплощении такие

ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, или их производные включают вариантный Fc-домен, который имеет пониженную аффинность к FcγRIIB и пониженную аффинность к FcγRIIA и/или FcγRIIA, по сравнению с сопоставимой молекулой с Fc-доменом дикого типа. В еще одном воплощении такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты или производные могут содержать вариантный Fc-домен, который имеет неизменную аффинность к FcγRIIB и пониженную (или повышенную) аффинность к FcγRIIA и/или FcγRIIA, по сравнению с сопоставимой молекулой с Fc-доменом дикого типа.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение охватывает такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, или их производные, которые содержат вариантный Fc-домен с измененной аффинностью к FcγRIIA и/или FcγRIIA так, что иммуноглобулин имеет повышенную эффекторную функцию, например, ADCC. Не ограничивающие примеры функций эффекторных клеток включают антитело-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), антитело-зависимый фагоцитоз, фагоцитоз, опсонизацию, опсонофагоцитоз, связывание клеток, розеткообразование, связывание C1q, и комплемент-зависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (CDC).

В предпочтительном воплощении изменение аффинности или эффекторной функции, по меньшей мере, в 2 раза, предпочтительно, по меньшей мере, в 4 раза, по меньшей мере, в 5 раз, по меньшей мере, в 6 раз,, по меньшей мере, в 7 раз, по меньшей мере, 8 раз, по меньшей мере, в 9 раз, по меньшей мере, в 10 раз, по меньшей мере, в 50 раз, или, по меньшей мере, в 100 раз, по сравнению с сопоставимой молекулой, содержащей Fc-домен дикого типа. В других воплощениях настоящего изобретения вариантный Fc-домен иммуноспецифично связывает один или несколько FcR с аффинностью, которая, по меньшей мере, на 65%, предпочтительно, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 225%, или на 250% выше по отношению к молекуле, содержащей Fc-домен дикого типа. Такие измерения могут быть анализами *in vivo* или *in vitro*, и в предпочтительном воплощении анализами *in vitro*, такими как тИФА или поверхностный плазмонный резонанс.

В различных воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, или их производные включают вариантный Fc-домен, в котором указанный вариант служит агонистом, по меньшей мере, одной активности FcγR-рецептора, или антагонистом, по меньшей мере, одной активности FcγR-рецептора. В предпочтительном воплощении молекулы включают вариант, который является антагонистом одной или нескольких активностей FcγRIIB, например, сигнала, опосредуемого В-клеточным рецептором, активации В-клеток, пролиферации В-клеток, образования антител, внутриклеточного притока кальция в В-клетках, прогрессии клеточного цикла, FcγRIIB-опосредованного

ингибирования сигнального пути FcεRI, фосфорилирования FcγRIIB, рекрутирования SHIP, фосфорилирования SHIP и ассоциации с Shc или активности одной или нескольких молекул, расположенных далее по сигнальному пути (например, MAP киназы, JNK, p38 или Akt) при передаче сигнала по пути FcγRIIB. В другом воплощении молекулы включают вариант, который является агонистом (или антагонистом) одной или нескольких активностей FcεRI, например, активации тучных клеток, мобилизации кальция, дегрануляции, выработки цитокинов или высвобождения серотонина.

В некоторых воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты включают Fc-содержащий домен из двух или более изотипов IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Различные IgG изотипы демонстрируют различные физические и функциональные свойства, включая период полужизни в сыворотке, связывание комплемента, аффинность связывания FcγR и активности эффекторной функции (например, ADCC, CDC и др.), из-за различий в аминокислотных последовательностях их шарнирных и/или Fc-доменов, например, как описано в Flesch, B.K. and Neppert, J. (1999) “*Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G,*” J. Clin. Lab. Anal. 14:141-156; Chappel, M.S. et al. (1993) “*Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody,*” J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel, M.S. et al. (1991) “*Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; Brüggemann, M. et al. (1987) “*Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies,*” J. Exp. Med 166:1351-1361. Этот тип вариантного Fc-домена может быть использован отдельно или в сочетании с аминокислотной модификацией для того, чтобы влиять на Fc-опосредованную эффекторную функцию и/или активность связывания. В комбинации аминокислотная модификация и шарнирный/Fc-домен IgG могут демонстрировать аналогичные функциональные возможности (например, повышенную аффинность к FcγRIIA) и могут действовать аддитивно или, более предпочтительно, синергично для того, чтобы изменить эффекторную функциональность в молекуле согласно изобретению по отношению к молекуле по изобретению, содержащей Fc-домен дикого типа. В других воплощениях аминокислотная модификация и Fc-домен IgG могут демонстрировать противоположные функциональные возможности (например, повышенную и пониженную аффинности к FcγRIIA, соответственно), и могут действовать, чтобы выборочно смягчить или уменьшить определенную функциональность в молекуле согласно изобретению по отношению к молекуле по настоящему изобретению, не содержащей Fc-домен или содержащей Fc-домен дикого типа того же изотипа.

Предпочтительное конкретное воплощение такого ROR1 mAb 1 антитела или его фрагмента включает вариант Fc-домена, в котором указанный вариант Fc-домена содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную модификацию относительно Fc-домена дикого типа, таким образом, что молекула имеет измененную аффинность к FcR, при условии, что указанный вариантный Fc-домен не имеет замены в положениях, благодаря которым осуществляется прямой контакт с FcγR, согласно кристаллографическому и структурному анализу взаимодействий Fc-FcR, таких как те, которые описаны Sondermann, P. et al. (2000) “*The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc GammaRIII Complex*,” Nature 406:267-273. Примеры положений в пределах Fc-домена, благодаря которым осуществляется прямой контакт с FcγR, представляют собой аминокислотные остатки 234-239 (шарнирная область), аминокислотные остатки 265-269 (B/C петля), аминокислотные остатки 297-299 (C'/E петля), и аминокислотные остатки 327-332 (F/G петля). В некоторых воплощениях молекулы по изобретению включают вариантные Fc-домены, которые содержат модификацию, по меньшей мере, одного остатка, который не осуществляет прямой контакт с FcγR согласно структурному и кристаллографическому анализу, например, не находится в пределах участка связывания Fc-FcγR.

Вариантные Fc-домены хорошо известны в данной области, и любой известный вариант Fc может быть использован в настоящем изобретении для придания или изменения эффекторной функции, демонстрируемой такими ROR1 mAb 1 антителами или их фрагментами, содержащими Fc-домен (или его часть) в качестве функционально анализируемого, например, в NK- зависимом или макрофаг-зависимом анализе. Например, варианты Fc-домена идентифицированные по изменению эффекторной функции, описаны в публ. РСТ № WO 04/063351 N.; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; WO 2008/140603, и любой подходящий вариант, раскрытый в них, может быть использован в настоящих молекулах.

В некоторых воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты включают вариантный Fc-домен, имеющий одну или несколько аминокислотных модификаций в одном или нескольких сайтах, которые изменяют (относительно Fc-домена дикого типа) соотношение аффинностей вариантного Fc-домена к активирующему FcγR (например, FcγRIIA или FcγRIIIA) относительно ингибирующего FcγR (такого как FcγRIIB):

$$\text{Ratio of Affinities} = \frac{\text{Wild-Type to Variant Change in Affinity to Fc}\gamma\text{R}_{\text{Activating}}}{\text{Wild-Type to Variant Change in Affinity to Fc}\gamma\text{R}_{\text{Inhibiting}}}$$

В случаях, когда вариант Fc имеет соотношение аффинностей больше 1, способы по изобретению имеют особое применение в обеспечении терапевтического или профилактического лечения заболевания, расстройства или инфекции, или облегчения его симптома, при которых требуется улучшенная эффективность эффекторной функции клеток (например, ADCC), опосредуемая Fc γ R, например, злокачественная опухоль или инфекционное заболевание. В случаях, когда вариант Fc имеет соотношение аффинностей меньше 1, способы настоящего изобретения имеют особое применение в обеспечении терапевтического или профилактического лечения заболевания или расстройства, или облегчения их симптома, при которых желательна пониженная эффективность функции эффекторной клетки, опосредуемой Fc γ R, например, при аутоиммунных или воспалительных расстройствах. В таблице 3 приведены в качестве примера одинарные, двойные, тройные, четверные и пятерные мутации по их соотношению аффинности больше или меньше 1, а дополнительную информацию относительно этих мутаций можно найти в публ. РСТ № WO 04/063351 No.; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; WO 2008/140603.

Таблица 3: Примерные одиночные и множественные мутации перечисленные по соотношению аффинностей					
Соотношение	Одинарная	Двойная	Тройная	Четверная	Пятерная
> 1	F243L D270E R292G R292P	F243L & R292P F243L & Y300L F243L & P396L D270E & P396L R292P & Y300L R292P & V305I R292P & P396L Y300L & P396L P396L & Q419H	F243L, P247L & N421K F243L, R292P & Y300L F243L, R292P & V305I F243L, R292P & P396L F243L, Y300L & P396L P247L, D270E & N421K R255L, D270E & P396L D270E, G316D & R416G D270E, K392T & P396L D270E, P396L & Q419H V284M, R292L & K370N R292P, Y300L	L234F, F243L, R292P & Y300L L235I, F243L, R292P & Y300L L235Q, F243L, R292P & Y300L F243L, P247L, D270E & N421K F243L, R255L, D270E & P396L F243L, D270E, G316D & R416G F243L, D270E, K392T & P396L F243L, D270E, P396L & Q419H F243L, R292P, Y300L, & P396L F243L, R292P, V305I & P396L P247L, D270E, Y300L & N421K R255L, D270E, R292G & P396L R255L, D270E, Y300L & P396L D270E, G316D,	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L

Таблица 3: Примерные одиночные и множественные мутации перечисленные по соотношению аффинностей					
Соотношение	Одинарная	Двойная	Тройная	Четверная	Пятерная
			& P396L	P396L & R416G	
< 1	Y300L P396L	F243L & P396L P247L & N421K R255L & P396L R292P & V305I K392T & P396L P396L & Q419H	F243L, R292P & V305I		

В конкретном воплощении, в вариантных Fc-доменах любые аминокислотные модификации (например, замены) в любом из положений 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328, или 330, и предпочтительно в одном или нескольких из следующих остатков: A240, I240, L241, L243, H244, N298, I328 или V330. В другом конкретном воплощении, в вариантных Fc-доменах любые аминокислотные модификации (например, замены) в любом из положений 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439, и предпочтительно в одном или нескольких из следующих остатков: H280, Q280, Y280, G290, S290, T290, Y290, N294, K295, P296, D298, N298, P298, V298, I300 или L300.

В предпочтительном воплощении, в вариантных Fc-доменах, которые связывают FcγR с измененной аффинностью, любые аминокислотные модификации (например, замены) в любом из положений 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 или 439. Предпочтительно, если вариантный Fc-домен имеет любой из следующих остатков: A256, N268, Q272, D286, Q286, S286, A290, S290, A298, M301, A312, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, N326, S326, K330, T339, A333, A334, E334, H334, L334, M334, Q334, V334, K335, Q335, A359, A360 или A430.

В другом воплощении в вариантных Fc-доменах, которые связывают FcγR (с помощью своего Fc-домена) с пониженной аффинностью, любые аминокислотные модификации (например, замены) в любом из положений 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373,

376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438 или 439.

В другом воплощении, в вариантных Fc-доменах, которые связывают FcγR (с помощью своего Fc-домена) с повышенной аффинностью, любые аминокислотные модификации (например, замены) в любом из положений 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398 или 430. В другом воплощении, в вариантных Fc-доменах, которые связывают FcγRIIA с повышенной аффинностью, любой из следующих остатков: A255, A256, A258, A267, A268, N268, A272, Q272, A276, A280, A283, A285, A286, D286, Q286, S286, A290, S290, M301, E320, M320, Q320, R320, E322, A326, D326, E326, S326, K330, A331, Q335, A337 или A430.

Предпочтительные варианты включают одну или несколько модификаций в любом из положений 228, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 271, 273, 275, 281, 284, 291, 296, 297, 298, 299, 302, 304, 305, 313, 323, 325, 326, 328, 330 или 332.

Особенно предпочтительные варианты включают одну или несколько модификаций, выбранных из групп A-AI:

A	228E, 228K, 228Y или 228G;
B	230A, 230E, 230Y или 230G;
C	231E, 231K, 231Y, 231P или 231G;
D	232E, 232K, 232Y, 232G;
E	233D;
F	234I или 234F;
G	235D, 235Q, 235P, 235I или 235V;
H	239D, 239E, 239N или 239Q;
I	240A, 240I, 240M или 240T;
J	243R, 243, 243Y, 243L, 243Q, 243W, 243H или 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G, 247V или 247L;
N	262A, 262E, 262I, 262T, 262E или 262F;
O	263A, 263I, 263M или 263T;
P	264F, 264E, 264R, 264I, 264A, 264T или 264W;
Q	265F, 265Y, 265H, 265I, 265L, 265T, 265B, 265N или 265Q;
R	266A, 266I, 266M или 266T;
S	271D, 271E, 271N, 271Q, 271K, 271R, 271S, 271T, 271H, 271A, 271V, 271L, 271I, 271F, 271M, 271Y, 271W или 271G;
T	273I;
U	275L или 275W;
V	281D, 281K, 281Y или 281P;
W	284E, 284N, 284T, 284L, 284Y or 284M;
X	291D, 291E, 291Q, 291T, 291H, 291I или 291G;
Y	299A, 299D, 299E, 299F, 299G, 299H, 299I, 299K, 299L, 299M, 299N, 299P, 299Q, 299R, 299S, 299v, 299W или 299Y;

Z	302I;
AA	304D, 304N, 304T, 304H или 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;
AE	325A, 325D, 325E, 325G, 325H, 325I, 325L, 325 K, 325R, 325S, 325F, 325M, 325T, 325V, 325Y, 325W или 325P;
AF	328D, 328Q, 328K, 328R, 328S, 328T, 328V, 328I, 328Y, 328W, 328P, 328G, 328a, 328E, 328F, 328H, 328M или 328N;
AG	330L, 330Y, 330I или 330B;
AH	332A, 332D, 332E, 332H, 332N, 332Q, 332T, 332K, 332R, 332S, 332V, 332L, 332F, 332M, 332W, 332P, 332G или 332Y; и
AI	336E, 336K или 336Y

Еще более предпочтительные варианты включают одну или несколько модификаций, выбранных из группы 1-105:

Группа	Вариант	Группа	Вариант
1	A330L/I332E	54	S239D/D265L/N297D/I332E
2	D265F/N297E/I332E	55	S239D/D265T/N297D/I332E
3	D265Y/N297D/I332E	56	S239D/D265V/N297D/I332E
4	D265Y/N297D/T299L/I332E	57	S239D/D265Y/N297D/I332E
5	F241E/F243Q/V262T/V264F	58	S239D/I332D
6	F241E/F243Q/V262T/V264E /I332E	59	S239D/I332E
7	F241E/F243R/V262E/V264R	60	S239D/I332E/A330I
8	F241E/F243R/V262E/V264R /I332E	61	S239D/I332N
9	F241E/F243Y/V262T/V264R	62	S239D/I332Q
10	F241E/F243Y/V262T/V264R /I332E	63	S239D/N297D/I332E
11	F241L/F243L/V262I/V264I	64	S239D/N297D/I332E/A330Y
12	F241L/V262I	65	S239D/N297D/I332E/A330Y/F241S/F 243H/V262T/V264T
13	F241R/F243Q/V262T/V264R	66	S239D/N297D/I332E/K326E
14	F241R/F243Q/V262T/V264R /I332E	67	S239D/N297D/I332E/L235D
15	F241W/F243W/V262A/V264 A	68	S239D/S298A/I332E
16	F241Y/F243Y/V262T/V264T	69	S239D/V264I/A330L/I332E
17	F241Y/F243Y/V262T/V264T /N297D/I332E	70	S239D/V264I/I332E
18	F243L/V262I/V264W	71	S239D/V264I/S298A/I332E
19	P243L/V264I	72	S239E/D265N
20	L328D/I332E	73	S239E/D265Q
21	L328E/I332E	74	S239E/I332D
22	L328H/I332E	75	S239E/I332E
23	L328I/I332E	76	S239E/I332N
24	L328M/I332E	77	S239E/I332Q
25	L328N/I332E	78	S239E/N297D/I332E

26	L328Q/I332E	79	S239E/V264I/A330Y/I332 E
27	L328T/I332E	80	S239E/V264I/I332 E
28	L328V/I332E	81	S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E
29	N297D/A330Y/I332E	82	S239N/A330L/I332E
30	N297D/I332E	83	S239N/A330Y/I332E
31	N297D/I332E/S239D/A330L	84	S239N/I332D
32	N297D/S298A/A330Y/I332E	85	S239N/I332E
33	N297D/T299L/I332E	86	S239N/I332N
34	N297D/T299F/I332E/N297D/T299H/I332E	87	S239N/I332Q
35	N297D/T299I/I332E	88	S239N1S298A/I332E
36	N297D/T299L/I332E	89	S239Q/I332D
37	N297D/T299V/I332E	90	S239Q/I332E
38	N297E/I332E	91	S239Q/I332N
39	N297S/I332E	92	S239Q/I332Q
40	P230A/E233D/I332E	93	S239Q/V264I/I332E
41	P244H/P245A/P247V	94	S298A/I332E
42	S239D/A330L/I332E	95	V264E/N297D/I332E
43	S239D/A330Y/I332E	96	V264I/A330L/I332E
44	S239D/A330Y/I332E/K326E	97	V264I/A330Y/I332E
45	S239D/A330Y/I332E/K326T	98	V264I/I332E
46	S239D/A330Y/I332E/L234I	99	V264I/S298A/I332E
47	S239D/A330Y/I332E/L235D	100	Y296D/N297D/I332E
48	S239D/A330Y/I332E/V240I	101	Y296E/N297D/I332 E
49	S239D/A330Y/I332E/V264T	102	Y296H/N297D/I332E
50	S239D/A330Y/I332E/V266I	103	Y296N/N297D/I332E
51	S239D/D265F/N297D/I332E	104	Y296Q/N297I/I332E
52	S239D/D265H/N297D/I332E	105	Y296T/N297D/I332E
53	S239D/D265I/N297D/I332E		

В одном воплощении такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты могут содержать вариантный Fc-домен, имеющий, по меньшей мере, одну модификацию в Fc-домене. В некоторых воплощениях вариантный Fc-домен содержит, по меньшей мере, одну замену, выбранную из группы, состоящей из L235V, F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L, в котором указанная нумерация представлена по индексу EU, как в Kabat. В конкретном воплощении изобретения вариантный Fc-домен содержит:

(A), по меньшей мере, одну замену, выбранную из группы, состоящей из F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L;

(B) по меньшей мере, две замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L и P396L;

(2) F243L и R292P; и

(3) R292P и V305I;

(C) по меньшей мере, три замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P и Y300L;

(2) F243L, R292P и V305I;

(3) F243L, R292P и P396L; и

(4) R292P, V305I и P396L;

(D) по меньшей мере, четыре замены, выбранные из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P, Y300L и P396L; и

(2) F243L, R292P, V305I и P396L; или

(E) по меньшей мере, пять замен, выбранных из группы, состоящей из:

(1) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L; и

(2) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L.

В другом конкретном воплощении вариантный Fc-домен содержит замены:

(A) F243L, R292P и Y300L;

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L; или

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L.

В других воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты могут обладать любым вариантом Fc, известным в данной области, таким как те, что описаны в Jefferis, R. et al. (2002) “*Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγR: Current Models*,” Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) “*Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function*,” Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) “*Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement*,” J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) “*High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For FcγRI, FcγRII, FcγRIII, And FcγRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The FcγR*,” J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) “*Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc*,” J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) “*Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4*,” J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) “*In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies*,” Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. (1999) “*Recombinant human IgG Molecules Lacking FcγR I Binding And Monocyte Triggering Activities*,” Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) “*Modulation Of Fc(γ)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions*,” Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) “*Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human FcγR I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains*,” J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) “*Improved Biodistribution, Tumor Targeting,*

And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) “*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation,*” Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) “*Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors,*” FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) “*A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo,*” Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) “*Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11,*” Mol. Immunol. 29: 53-59; Lund et al. (1991) “*Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG,*” J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) “*Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG,*” Nature 332:563-564; в Патентах США No. 5624821; 5885573; 6194551; 7276586; и 7317091; и публ. PCT WO 00/42072 и PCT WO 99/58572.

В некоторых воплощениях такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты могут дополнительно содержать один или несколько сайтов гликозилирования, так что один или нескольких углеводных остатков ковалентно присоединены к молекуле. Предпочтительно, такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты с одним или несколькими сайтами гликозилирования, и/или одной или несколькими модификациями в Fc-домене придают или обладают усиленной опосредованной антителами эффекторной функцией, например, повышенной активностью ADCC, по сравнению с немодифицированными ROR1 mAb 1 антителами или фрагментами. В некоторых воплощениях настоящее изобретение дополнительно включает такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, содержащие одну или несколько модификаций аминокислот, которые прямо или косвенно, как известно, взаимодействуют с углеводной частью Fc-домена, в том числе, без ограничения указанным, аминокислоты в положениях 241, 243, 244, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299, и 301. Аминокислоты, которые прямо или косвенно взаимодействуют с углеводной частью Fc-домена, известны в данной области, см., например, Jefferis, R. et al. (1995) “*Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation,*” Immunol. Lett. 44:111-17.

В другом воплощении настоящее изобретение охватывает такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты, которые были модифицированы путем введения одного или нескольких сайтов гликозилирования в один или несколько участков молекул, предпочтительно, без изменения функциональности молекул, например, активности связывания с антигеном-мишенью или с FcγR. Сайты гликозилирования могут быть введены в переменную и/или константную области молекулы по изобретению. При

использовании в данном описании термин «сайты гликозилирования» включают любую конкретную аминокислотную последовательность в антителе, к которой олигосахариды (то есть углеводы, содержащие два или более простых сахара, связанных друг с другом) специфически и ковалентного присоединены. Олигосахаридные боковые цепи, как правило, связаны с основной цепью антитела либо через N- либо через O-связь. N-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридных фрагментов к боковой цепи остатка аспарагина. O-связанное гликозилирование относится к присоединению олигосахаридных фрагментов к гидроксикамину, например, серину, треонину. Такие ROR1 mAb 1 антитела или их фрагменты могут содержать один или несколько сайтов гликозилирования, в том числе N-связанные и O-связанные сайты гликозилирования. Любой сайт гликозилирования для N-связанного или O-связанного гликозилирования, известный в данной области техники, может быть использован в соответствии с настоящим изобретением. Примерный сайт N-связанного гликозилирования представляет собой аминокислотную последовательность: Asn-X-Thr/Ser, где X может быть любой аминокислотой, и Thr/Ser обозначает треонин или серин. Такой сайт или сайты могут быть введены в молекулу настоящего изобретения с помощью способов, хорошо известных в области техники, к которой относится настоящее изобретение (см., например, *In vitro Mutagenesis, Recombinant DNA: A Short Course*, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, New York, 1983, глава 8, стр. 106-116, которая включена в данное описание ссылкой во всей полноте. Примерный способ введения сайта гликозилирования в такое ROR1 mAb 1-антитело или их фрагмент может включать: модификацию или мутацию аминокислотной последовательности молекулы таким образом, чтобы получить требуемую последовательность Asn-X-Thr/Ser. или экспрессию кодирующей ROR1 mAb 1 антитело молекулы нуклеиновой кислоты, имеющей такую последовательность.

В некоторых воплощениях изобретение относится к способам модификации содержания углеводов в таких ROR1 mAb 1 антителах или их фрагментах путем добавления или удаления сайта гликозилирования. Способы модификации содержания углеводов антител (и молекул, содержащих антительные домены, например, Fc-домен), хорошо известны в данной области техники и охватываются настоящим изобретением, см, например, пат. США № 6218149; EP 0 359 096 B1; США, публикация № US 2002/0028486; WO 03/035835; Публ. США № 2003/0115614; Пат. США № 6218149; Пат. США № 6472511; каждый из которых включен в настоящее описание ссылкой во всей полноте. В других воплощениях изобретение относится к способам модификации содержания углеводов в таких ROR1 mAb 1 антителах или их фрагментах путем удаления одной или

нескольких эндогенных углеводных групп молекулы. В конкретном воплощении настоящее изобретение включает перенос сайта гликозилирования Fc-домена антитела путем изменения положения, примыкающего к 297. В конкретном воплощении настоящее изобретение охватывает модификации положения 296, с тем, чтобы положение 296, а не положение 297 было гликозилированным.

Эффекторная функция может быть модифицирована методами, описанными в публ. РСТ № WO 04/063351 N.; WO 06/088494; WO 07/024249; WO 06/113665; WO 07/021841; WO 07/106707; WO 2008/140603, или другими средствами. Например, остаток(ки) цистеина может быть введен в Fc-домен, что позволит создать межцепочечную дисульфидную связь в этой области, в результате чего образуется гомодимерное антитело, которое может иметь улучшенную способность к интернализации и/или повышенному комплемент-опосредованному уничтожению клеток и ADCC (Caron, PC et al. (1992) “*Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies,*” J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) “*A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity,*” J. Immunol. 148(9):2918-2922. Гомодимерные антитела с повышенной противоопухолевой активностью также могут быть получены с использованием гетеробифункциональных сшивающих агентов, как описано в Wolff, EA et al. (1993) “*Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice,*” Cancer Research 53:2560-2565. В ином случае, может быть сконструировано антитело, которое имеет двойные Fc-домены и поэтому может усилить комплементный лизис и способности к ADCC (Stevenson, G.T. et al. (1989) “*A Chimeric Antibody With Dual Fc Domains (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge,*” Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

Тот факт, что одно изменение аминокислотного остатка CDR может привести к потере функционального связывания (Rudikoff, S. etc. (1982) “*Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity,*” Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6):1979-1983), обеспечивает средство для систематического выявления альтернативных последовательностей функциональных CDR. В одном предпочтительном способе получения такой вариантных CDR, полинуклеотид, кодирующий CDR, подвергают мутагенезу (например, с помощью случайного мутагенеза или сайт-направленного мутагенеза (например, полимеразной цепной реакции с использованием праймеров, которые кодируют мутированный локус) с получением CDR, имеющей замененный аминокислотный остаток. Сравнивая идентичность соответствующего остатка в исходной (функциональной) последовательности CDR с идентичностью замещенного (нефункционального) варианта последовательности CDR, можно идентифицировать балл

замены BLOSUM62.ijj конкретно для этой замены. Система BLOSUM обеспечивает матрицу аминокислотных замен, созданных на основе анализа базы данных последовательностей для доверенных выравниваний (Eddy, SR (2004) “*Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?*,” *Nature Biotech.* 22(8):1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) “Amino acid substitution matrices from protein blocks,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89:10915-10919; Karlin, S. *et al.* (1990) “*Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes,*” *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) “*Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective,*” *J. Mol. Biol.* 219, 555-565. В настоящее время наиболее передовая база данных BLOSUM представляет собой базу данных BLOSUM62 (BLOSUM62.ijj). В таблице 4 представлены баллы замещения BLOSUM62.ijj (чем выше балл, тем более консервативная, замена и, следовательно, более вероятно, что замена не повлияет на функцию). Если антигенсвязывающий фрагмент, содержащий результирующий CDR не может связываться с ROR1, например, когда балл замещения BLOSUM62.ijj считается недостаточно консервативным, то выбирается и производится новый кандидат замещения, имеющий более высокий заместительный балл. Так, например, если исходный остаток был глутаматом (E), а нефункциональный замещающий остаток представляет собой гистидин (H), то балл замещения BLOSUM62.ijj будет 0, а более консервативные изменения (например, на аспартат, аспарагин, глютамин, или лизин), будут предпочтительными.

Таблица 4																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

Таким образом, изобретение предусматривает применение случайного мутагенеза для идентификации улучшенных CDR. В ином случае может использоваться технология фагового дисплея для увеличения (или уменьшения) CDR-аффинности. Эта технология, обозначаемая как созревание аффинности, использует мутагенез или «CDR-прогулку», и

повторная селекция использует антиген-мишень или его антигенный фрагмент для идентификации антител, содержащих CDR, которые связываются с более высокой (или более низкой) аффинностью с антигеном по сравнению с исходным или родительским антителом (см, например, Glaser et al. (1992) *J. Immunology* 149:3903). Мутагенез целых кодонов, а не отдельных нуклеотидов приводит к квази-рандомизированному репертуару аминокислотных мутаций. Могут быть сконструированы библиотеки, состоящие из пула вариантных клонов, каждый из которых отличается единственным аминокислотным изменением в одной CDR и которые содержат варианты, представляющие каждую возможную аминокислотную замену для каждого остатка CDR. Мутанты с повышенной (или пониженной) аффинностью связывания с антигеном могут быть подвергнуты скринингу путем контактирования иммобилизованных мутантов с меченым антигеном. Любой метод скрининга, известный в данной области, можно использовать для идентификации мутантных антител с повышенной или пониженной аффинностью к антигену (например, тИФА), (см. Wu et al. 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 95:6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155:1994). Возможно, можно использовать CDR-прогулку, которая рандомизирует легкую цепь (см, Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551).

Способы осуществления такого созревания аффинности описаны, например, в: Krause, J.C. et al. (2011) “*An Insertion Mutation That Distorts Antibody Binding Site Architecture Enhances Function Of A Human Antibody,*” *MBio.* 2(1) pii: e00345-10. doi: 10.1128/mBio.00345-10; Kuan, C.T. et al. (2010) “*Affinity-Matured Anti-Glycoprotein NMB Recombinant Immunotoxins Targeting Malignant Gliomas And Melanomas,*” *Int. J. Cancer* 10.1002/ijc.25645; Hackel, B.J. et al. (2010) “*Stability And CDR Composition Biases Enrich Binder Functionality Landscapes,*” *J. Mol. Biol.* 401(1):84-96; Montgomery, D.L. et al. (2009) “*Affinity Maturation And Characterization Of A Human Monoclonal Antibody Against HIV-1 gp41,*” *MAbs* 1(5):462-474; Gustchina, E. et al. (2009) “*Affinity Maturation By Targeted Diversification Of The CDR-H2 Loop Of A Monoclonal Fab Derived From A Synthetic Naïve Human Antibody Library And Directed Against The Internal Trimeric Coiled-Coil Of Gp41 Yields A Set Of Fabs With Improved HIV-1 Neutralization Potency And Breadth,*” *Virology* 393(1):112-119; Finlay, W.J. et al. (2009) “*Affinity Maturation Of A Humanized Rat Antibody For Anti-RAGE Therapy: Comprehensive Mutagenesis Reveals A High Level Of Mutational Plasticity Both Inside And Outside The Complementarity-Determining Regions,*” *J. Mol. Biol.* 388(3):541-558; Bostrom, J. et al. (2009) “*Improving Antibody Binding Affinity And Specificity For Therapeutic Development,*” *Methods Mol. Biol.* 525:353-376; Steidl, S. et al. (2008) “*In Vitro Affinity Maturation Of Human GM-CSF Antibodies By Targeted CDR-Diversification,*” *Mol. Immunol.* 46(1):135-144; и Barderas, R. et al. (2008) “Affinity maturation of antibodies

assisted by in silico modeling,” Proc. Natl. Acad. Sci.(USA) 105(26):9029-9034. В качестве примера, мульти-луночные планшеты могут быть покрыты выбранным ROR1 mAb 1 антителом (например, 100 нг/лунку в карбонатном буфере при комнатной температуре в течение 2 ч), а затем их инкубируют с растворимым ROR1 в разведении 1/10 и инкубируют при комнатной температуре в течение 16 часов или разбавляют до концентрации 50 нг/мл в PBS-T-BSA (0,05 мл добавляют в каждую лунку и инкубируют в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре). Затем планшет промывают и затем добавляют разведенные рекомбинантные антитела, начиная с 0,5 мкг/мл в PBS-T-BSA, и инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем измеряют связывание рекомбинантных антител с захваченным антигеном, например с использованием анти-человеческого IgG-конъюгата пероксидазы хрена и субстрата ТМВ. После остановки проявления цвета с использованием разбавленной серной кислоты планшет считывают при 450 нм и идентифицируют антитела с более высокой аффинностью (см, например, пат. США № 7351803).

VI. Фармацевтические композиции

В одном воплощении настоящее изобретение включает фармацевтические композиции для лечения онкологического заболевания или заболевания, которое характеризуется наличием антигена, ассоциированного с заболеванием. Такие композиции включают объемные лекарственные композиции, полезные при изготовлении фармацевтических композиций (например, неочищенные или нестерильные композиции), и фармацевтические композиции (например, композиции, которые пригодны для введения объекту или пациенту), которые могут быть использованы при приготовлении стандартных лекарственных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество модифицированного диатела по настоящему изобретению, или комбинацию таких агентов и фармацевтически приемлемый носитель. Предпочтительно, композиции по изобретению содержат профилактически или терапевтически эффективное количество одной или нескольких молекул по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Изобретение также относится к фармацевтическим композициям, содержащим такие модифицированные диатела и второе терапевтическое антитело, которое специфично для конкретного антигена заболевания, и фармацевтически приемлемый носитель.

Используемые в настоящем документе термины «лечение» или «лечить» обозначают подход для получения полезного или желаемого результата, в том числе и предпочтительно полезного или желаемого клинического результата. Такие полезные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения перечисленным, один или

несколько из следующих: уменьшение пролиферации (или уничтожение) инфицированных клеток или других больных клеток, уменьшение симптомов в результате заболевания, повышение качества жизни людей страдающих от этой болезни, уменьшение дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения заболевания, отсрочка прогрессирования заболевания, и/или продление срока выживаемости животных-реципиентов.

В конкретном воплощении термин «фармацевтически приемлемый» означает одобренный регулирующим органом федерального правительства или правительства штата или перечисленные в фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для использования у животных, а более конкретно, у человека (см., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2012) Allen, Loyd V., Jr. (Ed.) 22nd Edition, Pharmaceutical Press, London UK). Термин «носитель» относится к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полный и неполный), наполнителю или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Такие фармацевтические носители могут быть стерильными жидкостями, такими как вода и масла, в том числе, полученные из нефти, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и тому подобное. Вода является предпочтительным носителем, когда фармацевтическую композицию вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерины могут быть использованы в качестве жидких носителей, в частности, для растворов для инъекций. Подходящие фармацевтические наполнители включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобное. Композиция, если целесообразно, может также содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH-буферные агенты. Эти композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, препаратов с замедленным высвобождением и тому подобное.

Как правило, ингредиенты композиций по изобретению поставляются либо отдельно, либо в смеси друг с другом в виде стандартной лекарственной формы, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества активного агента. Когда композиция предназначена для введения путем инфузии, она может быть налита в инфузионный флакон, содержащий стерильную воду фармацевтической чистоты или физиологический раствор. Когда композицию вводят

путем инъекции, может обеспечиваться ампула стерильной воды для инъекций или физиологического раствора таким образом, что ингредиенты могут быть смешаны перед введением.

Композиции по изобретению могут быть приготовлены в виде нейтральной или солевой формы. Фармацевтически приемлемые соли включают, без ограничения перечисленным, соли, образованные с анионами, такие как соли, полученные из соляной, фосфорной, уксусной, щавелевой, винной кислот и *т.д.*, и соли, образованные с катионами, такие как соли, полученные из натрия, калия, аммония, кальция, трехвалентного железа, гидроксида, изопропиламин, триэтиламин, 2-этиламино этанол, гистидин, прокаин и *т.д.*

В изобретении также предлагается фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или более контейнеров, содержащих модифицированное диатело по настоящему изобретению, индивидуально или с таким фармацевтически приемлемым носителем. Кроме того, один или более других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения заболевания, также могут быть включены в фармацевтическую упаковку или набор. В изобретении также предлагается фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или несколько контейнеров, заполненных одним или несколькими ингредиентами фармацевтических композиций по изобретению. Необязательно такому контейнеру(ам) может сопутствовать уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических или биологических продуктов, которое отражает одобрение органом производства, применения или продажи для введения человеку.

В настоящем изобретении предлагаются наборы, которые могут быть использованы в описанных выше способах. В одном воплощении набор включает в себя одну или несколько молекул по изобретению. В другом воплощении набор дополнительно включает один или несколько других профилактических или терапевтических агентов, пригодных для лечения онкологического заболевания или заболевания, характеризующегося наличием антигена, ассоциированного с заболеванием, в одном или в нескольких контейнерах. В другом воплощении набор дополнительно включает одно или несколько антител или диател, которые связываются с одним или с несколькими антигенами, ассоциированными с заболеванием. В некоторых воплощениях, другой профилактический или терапевтический агент представляет собой химиотерапевтическое средство. В других воплощениях, профилактический или терапевтический агент представляет собой биологическое или гормональное терапевтическое средство.

VII. Способы получения триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению

Триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению наиболее предпочтительно получают посредством экспрессии рекомбинантных молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют полипептиды, как хорошо известно в данной области техники.

Полипептиды по изобретению могут быть получены стандартным способом с использованием твердофазного пептидного синтеза (Merrifield, B. (1986) “*Solid Phase Synthesis*,” *Science* 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) “*General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) “*Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century*,” *Mini Rev. Med. Chem.* 6(1):3-10).

В ином случае, антитела могут быть получены рекомбинантным способом и экспрессированы с использованием любого способа, известного в данной области. Антитела могут быть сделаны рекомбинантным способом сначала путем выделения антител, сделанных из животных-хозяев, с получением последовательности гена и с использованием генной последовательности для экспрессии антитела рекомбинантно в клетках-хозяевах (например, клетках *CHO*). Другой метод, который может быть использован—это экспрессия последовательности антитела в растениях (например, в табаке) или в трансгенном молоке. Были раскрыты подходящие методы экспрессии рекомбинантных антител в растениях или молоке (см., например, Peeters et al. (2001) “*Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants*,” *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) “*Human Antibodies From Transgenic Mice*,” *Int. Rev. Immunol* 13:65-93; и Pollock et al. (1999) “*Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies*,” *J. Immunol Methods* 231:147-157). Подходящие способы получения производных антител, например, химерных, гуманизированных, одноцепочечных и т.д. известны в данной области техники. В другом альтернативном варианте, антитела могут быть получены рекомбинантным способом с помощью технологии фагового дисплея (см., например, патенты США № 5565332; 5580717; 5733743; 6265150; и Winter, G. et al. (1994) “*Making Antibodies By Phage Display Technology*,” *Annu. Rev. Immunol.* 12.433-455).

Антитела или белок, представляющие интерес, могут быть подвергнуты секвенированию с помощью деградации Эдмана, которое хорошо известно специалистам в данной области техники. Информация о пептиде, генерированном из масс-спектрометрии или деградации по Эдману, может быть использована для разработки

зондов или праймеров, которые используются для клонирования белка, представляющего интерес.

Альтернативный метод клонирования белка, представляющего интерес, представляет собой «пэннинг» с использованием очищенных белков или их частей, для клеток, экспрессирующих антитело или белок, представляющий интерес. Процедура «пэннинга» может быть осуществлена путем получения библиотеки кДНК из тканей или клеток, которые экспрессируют или сверхэкспрессируют целевые кДНК в втором типе клеток, и путем скрининга трансфицированных клеток второго типа клеток на предмет специфичного связывания с целевым белком. Подробное описание методов, используемых для клонирования генов млекопитающих, кодирующих белки клеточной поверхности, с помощью «пэннинга» можно найти в данной области (см., например, Aruffo, A. et al. (1987) *“Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System,”* Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 84:8573-8577 и Stephan, J. et al. (1999) *“Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation,”* Endocrinol. 140: 5841-5854).

кДНК, кодирующие антитела, и другие пептидные агонисты, антагонисты и модуляторы, могут быть получены с помощью обратной транскрипции мРНК из определенного типа клеток в соответствии со стандартными методами в данной области техники. В частности, мРНК могут быть выделены с использованием различных литических ферментов или химических растворов в соответствии с методиками, изложенными в руководстве Sambrook et al. выше, или извлечены с помощью коммерчески доступных нуклеиновых кислот-связывающих смол согласно инструкции, предоставляемой производителями (например, Qiagen, Invitrogen, Promega). Синтезированные кДНК затем вводят в экспрессирующий вектор для продуцирования антитела или белка, представляющего интерес, в клетках второго типа. Подразумевается, что экспрессирующий вектор должен быть реплицируемым в клетках-хозяевах либо как эписома, либо как интегральная часть хромосомной ДНК. Подходящие экспрессирующие векторы включают, без ограничения перечисленным, плазмиды, вирусные векторы, в том числе аденовирусы, адено-ассоциированные вирусы, ретровирусы, и космоиды.

Векторы, содержащие полинуклеотиды, представляющие интерес, могут быть введены в клетку-хозяин с помощью любого из целого ряда соответствующих средств, в том числе электропорации, трансфекции с применением хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировки микрочастицами; липофекции; и инфекции (например, где вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус коровьей оспы). Выбор внедряющих векторов или

полинуклеотидов часто будет зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Любые клетки-хозяева, способные сверхэкспрессировать гетерологичные ДНК, можно использовать для целей выделения генов, кодирующих антитело, полипептид или белок, представляющий интерес. Неограничивающие примеры подходящих клеток-хозяев млекопитающих включают, без ограничения перечисленным, COS, HeLa и клетки CHO. Предпочтительно, чтобы клетки-хозяева экспрессировали кДНК на уровне около 5 раз выше, более предпочтительно в 10 раз выше, более предпочтительно в 20 раз выше, более предпочтительно в 50 раз выше, более предпочтительно в 100 раз выше, чем у соответствующего эндогенного антитела или белка, представляющего интерес, если он присутствует в клетках-хозяевах. Скрининг клеток-хозяев на предмет специфического связывания с целевым белком предпочтительно осуществляют путем иммунологического анализа или FACS. Таким образом, клетка, сверхэкспрессирующая антитело или белок, представляющий интерес, может быть идентифицирована.

Также доступны различные методы, которые в настоящее время могут быть использованы для получения мутантных пептидных агонистов, антагонистов и модуляторов, которые кодируют аминокислотной последовательности полученного белка со вставками, делециями или заменами по отношению к родительскому пептидному агонисту, антагонисту или модулятору.

Настоящее изобретение включает модификации в отношении триспецифичных связывающих молекул по изобретению, которые не оказывают существенного влияния на их свойства, и варианты, которые обладают повышенной или сниженной активностью. Модификация полипептидов является обычной практикой в данной области. Примеры модифицированных полипептидов включают полипептиды с консервативными заменами аминокислотных остатков, одной или более делеций или вставок аминокислот, которые не оказывают существенного вредного изменения функциональной активности, или использование химических аналогов. Аминокислотные остатки, которые могут консервативно заменять друг друга, включают, без ограничения перечисленным: глицин/аланин; валин/изолейцин/лейцин; аспарагин/глутамин; аспарагиновая кислота/глутаминовая кислота; серин/треонин; лизин/аргинин; и фенилаланин/тирозин. Эти полипептиды также включают гликозилированные и негликозилированные полипептиды, а также полипептиды с другими посттрансляционными модификациями, такими как, например, гликозилирование с использованием различных сахаров, ацетилирование и фосфорилирование. Предпочтительно, аминокислотные замены будут консервативными, если замещенные аминокислоты будут обладать химическими свойствами, сходными с исходной аминокислотой. Такие консервативные замены

известны в данной области, и примеры приведены выше. Аминокислотные модификации могут варьироваться от изменения или модификации одной или нескольких аминокислот до полной перестройки области, такой как переменный домен. Изменения в переменной области могут изменять аффинность связывания и/или специфичность. Другие способы модификации включают использование методов конденсации, известных в данной области техники, включая, без ограничения указанными, ферментные средства, окислительные замещения и комплексообразование. Модификации могут быть использованы, например, для присоединения меток для иммунологического анализа, как например, присоединение радиоактивных компонентов для радиоиммунологического анализа. Модифицированные полипептиды получают с использованием установленных процедур в данной области и могут быть подвергнуты скринингу с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники.

Изобретение также охватывает слитые белки, содержащие один или несколько фрагментов или областей из полипептидов и антител настоящего изобретения. В одном воплощении предлагается слитый полипептид, который содержит, по меньшей мере, 10 непрерывно расположенных аминокислот переменной области легкой цепи и, по меньшей мере, 10 аминокислот переменной области тяжелой цепи. В другом воплощении, слитый полипептид содержит константную область гетерологичного иммуноглобулина. В другом воплощении, слитый полипептид содержит переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи антитела, полученного из общедоступной гибридомы. Для целей настоящего изобретения, слитый белок антитела содержит один или несколько полипептидных доменов, которые специфично связываются с целевым вирусным эпитопом или целевым активирующим рецептором иммунной эффекторной клетки или белка, присутствующего на поверхности иммунных эффекторных клеток, которые экспрессируют такой активирующий рецептор, и другую аминокислотную последовательность, с которой он не соединен в нативной молекуле, например, гетерологичную последовательность или гомологичную последовательность из другой области.

Изобретение включает полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность антител по настоящему изобретению. Полипептиды по настоящему изобретению могут быть получены с помощью процедур, известных в данной области техники. Полипептиды могут быть получены путем протеолитической или другой дегградации антител, с помощью рекомбинантных методов (то есть в виде одиночных или слитых полипептидов), как описано выше, или путем химического синтеза. Полипептиды антител, особенно более короткие полипептиды вплоть до около 50 аминокислот, удобно

делать с помощью химического синтеза. Методы химического синтеза известны в данной области техники и коммерчески доступны. Например, такой полипептид может быть получен с помощью автоматизированного полипептидного синтезатора с использованием метода твердофазного синтеза.

VIII. Применение композиций по изобретению

Настоящее изобретение охватывает композиции, в том числе фармацевтические композиции, содержащие триспецифичные связывающие молекулы по изобретению, полипептиды, полученные из таких молекул, полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие такие молекулы или полипептиды, и другие агенты, как описано в данном документе.

Триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению обладают способностью координированно связываться с тремя эпитопами, и, таким образом, имеют существенное применение в диагностике, химическом разделении и в терапевтических средствах, включающих такие эпитопы. Например, такие молекулы могут быть использованы в качестве реагента в сэндвич-иммуноанализе.

В воплощении, в котором такие триспецифичные связывающие молекулы связываются с эпитопом антигена, ассоциированного с заболеванием, такие молекулы могут быть использованы для лечения заболевания или состояния, связанного с или характеризующегося экспрессией такого антигена, ассоциированного с заболеванием. Таким образом, не ограничиваясь этим, фармацевтические композиции, содержащие такие молекулы, могут быть использованы в диагностике или лечении онкологического заболевания и заболеваний, вызываемых патогеном (например, бактериальные, грибковые, вирусные или протозойные) инфекции.

IX. Методы введения

Могут быть предоставлены композиции по настоящему изобретению для лечения, профилактики и облегчения одного или более симптомов, ассоциированных с заболеванием, расстройством или инфекцией, путем введения объекту эффективного количества фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В предпочтительном аспекте, такие композиции по существу чистые (т.е., по существу, свободны от веществ, которые ограничивают ее эффект или производят нежелательные побочные эффекты). В конкретном воплощении объект представляет собой животное, предпочтительно, млекопитающее, такое как не примат (например, бычья, лошадиные, кошачьи, собачьи, грызуны и т.д.) или примат (например, обезьяны, такие как, макак, человек и т.д.). В предпочтительном воплощении субъектом является человек.

Известны различные системы доставки и они могут быть использованы для

введения композиций по изобретению, например, инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать антитело или слитый белок, рецептор-опосредованный эндоцитоз (см., например, Wu et al. (1987) *“Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System,”* J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), конструкция нуклеиновой кислоты в качестве части ретровирусного или другого вектора и т.д.

Способы введения триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению включают, без ограничения перечисленным, парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное, и через слизистую оболочку (например, интраназальные и пероральные пути). В конкретном воплощении, молекулы по изобретению вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции могут быть введены любым удобным способом, например, путем инфузии или болюсной инъекции, путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные накладки (например, через слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и кишечника и т.д.) и могут быть введены вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или локальным. Кроме того, также может быть использовано легочное введение, например, путем использования ингалятора или небулайзера и состава с аэрозольным агентом. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320; 5985309; 5934272; 5874064; 5855913; 5290540; и 4880078; и публ. PCT WO № 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; и WO 99/66903, каждый из которых включен в настоящее описание в ссылкой в полном объеме.

В изобретении также предлагается, что триспецифические связывающие молекулы по настоящему изобретению могут быть упакованы в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества таких молекул. В одном из воплощений, триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, и могут быть восстановлены, например, водой или физиологическим раствором до нужной концентрации для введения объекту. Предпочтительно, триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению поставляются в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере в стандартной дозе, составляющей, по меньшей мере, 5 мкг, более предпочтительно, по меньшей мере, 10 мкг, по меньшей мере, 15 мкг, по меньшей мере, 25 мкг, по меньшей мере, 50 мкг, по меньшей мере, 100 мкг, или, по меньшей мере, 200 мкг.

Лиофилизированные триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению следует хранить при температуре от 2 до 8 °С в их первоначальном контейнере, и молекулы должны быть введены в течение 12 часов, предпочтительно в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 -х часов, или в пределах 1 часа после восстановления. В альтернативном воплощении триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению поставляются в жидком виде в герметично закрытом контейнере, с указанием количества и концентрации молекулы, слитого белка или конъюгированного молекулы. Предпочтительно жидкая форма триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению поставляется в герметично закрытом контейнере, в котором молекулы присутствуют в концентрации, составляющей по меньшей мере, 1 мкг/мл, более предпочтительно, по меньшей мере, 2,5 мкг/мл, по меньшей мере, 5 мкг/мл, по меньшей мере, 10 мкг/мл, по меньшей мере, 50 мкг/мл, или, по меньшей мере, 100 мкг/мл.

При использовании в данном описании термин «эффективное количество» фармацевтической композиции, в одном воплощении, представляет собой количество, достаточное для осуществления полезных или желаемых результатов, в том числе, без ограничения, клинических результатов, таких, как уменьшение симптомов в результате ослабления симптома инфекции (например, вирусной нагрузки, лихорадки, боли, сепсиса и т.д.) или симптома онкологического заболевания (например, пролиферации злокачественных опухолевых клеток, наличия опухоли, метастазов опухоли и т.д.), тем самым повышая качество жизни людей, страдающих от этой болезни, уменьшая дозы других лекарственных средств, необходимых для лечения этой болезни, усиливая эффект другого лекарства, как например с помощью направленного воздействия и/или интернализации, отсрочки прогрессирования заболевания и/или продления срок выживания индивидуумов.

Эффективное количество может вводиться за одно или за несколько введений. Для целей настоящего изобретения, эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для снижения пролиферации (или ее эффекта) присутствия вирусов и для снижения и/или задержки развития вирусного заболевания, либо прямо, либо косвенно. В некоторых воплощениях эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может или не может быть достигнуто в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической композицией. Таким образом, «эффективное количество» может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких химиотерапевтических агентов, и один агент может

рассматриваться, как данный в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами, желаемый результат может быть достигнут или достигается. В то время как индивидуальные потребности варьируются, определение оптимальных интервалов эффективных количеств каждого компонента находится в пределах квалификации специалиста в данной области. Типичные дозировки для введения антитела включают одну или более стандартных доз от 0,1 до 100 мг/кг/масса тела.

Количество триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению, которое будет эффективным в лечении, предотвращении или облегчении одного или более симптомов, ассоциированных с расстройством, может быть определено стандартными клиническими методами. Точная доза, используемая в композиции, также будет зависеть от пути введения и тяжести состояния, и должна быть определена в соответствии с оценкой лечащего врача и согласно обстоятельствам каждого пациента. Эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных *in vitro* или на животных модельных тестовых системах. Для триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, доза, вводимая пациенту, составляет, как правило, по меньшей мере, около 0,01 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 0,05 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 0,1 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 0,2 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 0,5 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 1 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 2 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 5 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 10 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 20 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 50 мкг/кг/день, по меньшей мере, около 0,1 мг/кг/день или более из расчета на массу тела субъекта.

Предпочтительно, доза, вводимая пациенту, составляет от около 0,01 мкг/кг/день до около 0,1 мг/кг/день, более предпочтительно, от около 0,01 мкг/кг/день до около 50 мкг/кг/день, более предпочтительно, от около 0,01 мкг/кг/день до около 50 мкг/кг/день, более предпочтительно, от около 0,01 мкг/кг/день до около 10 мкг/кг/день, более предпочтительно, от около 0,01 мкг/кг/день до около 1 мкг/кг/день, более предпочтительно, от около 0,01 мкг/кг/день до около 0,5 мкг/кг/день и более предпочтительно от около 0,01 мкг/кг/день до около 0,1 мкг/кг/день в расчете на массу тела субъекта. Дозировка и частота введения триспецифичных связывающих молекул по изобретению могут быть уменьшены или изменены путем увеличения поглощения и проникновения в ткани триспецифичных связывающих молекул путем модификаций, таких как, например, липидирование.

В другом воплощении пациенту назначают схему лечения, включающую одну или несколько доз такого профилактически или терапевтически эффективного количества

триспецифичных связывающих молекул, охваченных настоящим изобретением, где схему лечения назначают на 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней. В некоторых воплощениях схема лечения включает прерывистое введение доз профилактически или терапевтически эффективного количества триспецифичных связывающих молекул, охваченных изобретением, (например, введение дозы в 1 день, 2-й день, 3-й день и 4-й день данной недели, и отсутствие введения доз профилактически или терапевтически эффективного количества триспецифичных связывающих молекул, охваченных изобретением, на 5-й день, 6-й день и 7-й день той же недели). Как правило, проводят 1, 2, 3, 4, 5 или более курсов лечения. Каждый курс может представлять собой ту же схему или другую.

В другом воплощении, вводимая доза увеличивается в первой четверти, первой половине или в первых двух третях или трех четвертях схемы (например, в течение первой, второй или третьей схем из 4 курсов лечения) до достижения суточного профилактически или терапевтически эффективного количества триспецифичной связывающей молекулы, охваченной изобретением.

В одном воплощении, дозировка триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, вводимая пациенту, может быть рассчитана для использования в качестве единственного терапевтического агента. В другом воплощении, триспецифичные связывающие молекулы по настоящему изобретению используются в комбинации с другими терапевтическими композициями, и доза, вводимая пациенту, будет ниже, чем когда такие триспецифичные связывающие молекулы используются в качестве единственного терапевтического агента.

В конкретном воплощении, может быть целесообразным введение фармацевтических композиций по изобретению локально в области, нуждающиеся в лечении; это может быть достигнуто, например, а не в качестве ограничения, с помощью местной инфузии, инъекции или с помощью имплантата, причем указанный имплантат будет из пористого, непористого или желатинового материала, включая мембраны, такие как синаластические мембраны, или волокна. Предпочтительно, чтобы при введении молекулы согласно изобретению, соблюдалась осторожность, чтобы использовались материалы, на которые молекула не абсорбируется.

В другом воплощении композиции могут быть доставлены в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer (1990) "New Methods Of Drug Delivery," Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; в основном см. там же).

В еще одном воплощении композиции могут быть доставлены в системе с контролируемым высвобождением или в системе с замедленным высвобождением. Любой метод, известный специалисту в данной области, может быть использован для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одну или более молекул по изобретению. См., например, пат. США № 4526938; публикацию PCT WO 91/05548; В публикацию PCT WO 96/20698; Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song et al. (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek et al. (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam et al. (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760, каждый из которых включен в настоящее описание в ссылкой в полном объеме. В одном воплощении может быть использована помпа в системе с контролируемым высвобождением (см. Langer, выше; Sefton, (1987) "Implantable Pumps," *CRC Crit. Rev. Biomed. Eng.* 14:201-240; Buchwald et al.(1980) "Long-Term, Continuous Intravenous Heparin Administration By An Implantable Infusion Pump In Ambulatory Patients With Recurrent Venous Thrombosis," *Surgery* 88:507-516; и Saudek et al. (1989) "A Preliminary Trial Of The Programmable Implantable Medication System For Insulin Delivery," *N. Engl.J. Med.* 321: 574-579). В другом воплощении могут быть использованы полимерные материалы для достижения контролируемого высвобождения молекул (см. например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Levy et al. (1985) "Inhibition Of Calcification Of Bioprosthetic Heart Valves By Local Controlled-Release Diphosphonate," *Science* 228:190-192; During et al. (1989) "Controlled Release Of Dopamine From A Polymeric Brain Implant: In Vivo Characterization," *Ann. Neurol.* 25:351-356; Howard et al. (1989) "Intracerebral Drug Delivery In Rats With Lesion-Induced Memory Deficits," *J. Neurosurg.* 7 (1): 105-112); пат. США № 5679377; пат. США № 5916597; пат. США № 5912015; пат. США № 5989463; пат. США № 5128326; Публикация PCT № WO 99/15154; и публ. PCT WO 99/20253). Примеры полимеров, используемых в композициях с замедленным высвобождением, включают, без ограничения перечисленным, поли (2-гидрокси-этил-метакрилат), поли (метилметакрилат), поли (акриловая кислота), поли (этилен-со-винилацетат), поли (метакриловая кислота), полигликолиды (ПЛГ), полиангидриды, поли (N-винилпирролидон), поли (виниловый спирт), полиакриламид,

поли (этиленгликоль), полилактиды (PLA), поли (лактид-со-гликолиды) (PLGA), и полиортоэферы. Система с контролируемым высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от терапевтической мишени (например, в легких), при этом требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). В другом воплощении, полимерные композиции, используемые в качестве имплантатов с контролируемым высвобождением, используются в соответствии с Dunn et al. (см. U.S. 5945155). Данный конкретный метод основан на терапевтическом эффекте *in situ* контролируемого высвобождения биоактивных веществ из полимерной системы. Имплантация, как правило, может иметь место в любой точке внутри тела пациента, нуждающегося в терапевтическом лечении. В другом воплощении используется неполимерная система замедленной доставки, в соответствии с которой неполимерный имплантат в теле объекта используется в качестве системы доставки лекарственного средства. После имплантации в теле, органический растворитель имплантата будет рассеиваться, диспергироваться или вытекать из композиции в окружающую тканевую жидкость, а неполимерный материал будет постепенно коагулировать или осаждаться с образованием твердой микропористой матрицы (см. US 5888533).

Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer (1990, "New Methods Of Drug Delivery," *Science* 249:1527-1533). Любой метод, известный специалисту в данной области, может быть использован для получения композиций с замедленным высвобождением, включающих один или более терапевтических агентов по изобретению. См., например, пат. США № 4526938; Международную публикацию № WO 91/05548 и WO 96/20698. Ning et al. (1996) "Intratumoral Radioimmunotherapy Of A Human Colon Cancer Xenograft Using A Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, Song *et al.* (1995) "Antibody Mediated Lung Targeting Of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397; Cleek *et al.* (1997) "Biodegradable Polymeric Carriers For A bFGF Antibody For Cardiovascular Application," *Proc. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854; и Lam *et al.* (1997) "Microencapsulation Of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody For Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760, каждая из которых включена в настоящее описание в ссылкой в полном объеме.

В конкретном воплощении, где композиция по настоящему изобретению представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую триспецифичную связывающую молекулу по настоящему изобретению, нуклеиновая кислота может быть введена *in vivo*, чтобы способствовать экспрессии кодируемой триспецифичной связывающей молекулы,

путем конструирования ее как части соответствующего экспрессирующего вектора экспрессии нуклеиновой кислоты и введения его таким образом, что он становится внутриклеточным, например, путем использования ретровирусного вектора (см. пат. США № 4980286), или путем прямой инъекции, или при помощи бомбардировки микрочастицами (например, генной, пушки; Biolistic, Dupont), или путем покрытия липидами или рецепторами клеточной поверхности, или трансфицирующими агентами, либо путем введения его будучи связанным с гомеобокс-подобным пептидом, который, как известно, проникает в ядро (см., например, Joliot et al. (1991) “*Antennapedia Homeobox Peptide Regulates Neural Morphogenesis*,” Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 88: 1864-1868) и т.д. В ином случае, нуклеиновая кислота может быть введена внутриклеточно и включена в ДНК клетки-хозяина для экспрессии с помощью гомологичной рекомбинации.

Лечение субъекта терапевтически или профилактически эффективным количеством триспецифичной связывающей молекулы по настоящему изобретению может включать один курс или, предпочтительно, может включать серию курсов лечения. В предпочтительном примере субъект подвергается лечению с помощью молекул по изобретению один раз в неделю в течение от около 1 до 10 недель, предпочтительно от 2 до 8 недель, более предпочтительно, от около 3 до 7 недель, и еще более предпочтительно в течение около 4, 5 или 6 недель. В других воплощениях, фармацевтические композиции по изобретению вводят один раз в день, два раза в день, или три раза в день. В других воплощениях фармацевтические композиции вводят один раз в неделю, два раза в неделю, раз в две недели, раз в месяц, один раз в шесть недель, один раз в два месяца, два раза в год или один раз в год. Следует также понимать, что эффективная доза молекул, используемых для лечения, может увеличиваться или уменьшаться в течение конкретного курса лечения.

Теперь, после того, как в целом описано изобретение, то же самое будет легче понять посредством ссылки на следующие примеры. Такие примеры представлены в качестве иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения, до тех пор, пока не указано иное.

Пример 1

Получение и свойства некоторых анти-CD3, анти-CD8, анти-B7-H3 триспецифичных связывающих молекул

Для того чтобы разработать терапевтическую молекулу, которая будет проявлять большую специфичность по отношению к CD8⁺ Т-клеткам, и более мощное перенаправленное уничтожение, были сконструированы триспецифичные связывающие молекулы, обладающие способностью координированно связываться с CD3, CD8 и

антигеном, ассоциированным с заболеванием. Полученная триспецифичная связывающая молекула дополнительно обладала Fc-доменом для повышения периода полужизни триспецифичной связывающей молекулы *in vivo*. Общие структуры триспецифичных связывающих молекул показаны на фигурах.4А-4D. Конструировали примерную триспецифичную связывающую молекулу, специфичную к антигену В7-Н3, ассоциированному с заболеванием. Триспецифичную связывающую молекулу определили как В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 для обозначения относительных положений связывающих доменов внутри триспецифичной связывающей молекулы. В7-Н3-связывающий домен занимает положение сайта А, CD3-связывающий домен занимает положение сайта В и CD8-связывающий домен занимает положение сайта С (фигура 4а). Триспецифичная связывающая молекула В7-Н3 mAb 1/CD3-mAb 2/CD8 mAb 1 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 5).

Полипептидная цепь	Домены	аффинность связывания
1	VL (В7-Н3 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -Е-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: В7-Н3 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (В7-Н3 mAb 1) -К-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелой цепи: В7-Н3
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3-mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 59):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKDRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA
 LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

В первой полипептидной цепи, VL (В7-Н3 mAb 1) содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41, VH (CD3 mAb 2) содержит аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 27, E-спираль имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и (CH2-CH3) имеет аминокислотную последовательность «несущей выпуклость» аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 60):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTDTVSSGG CGGGKVAALK
EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

Во второй полипептидной цепи, VL (CD3 mAb 2) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, VH (B7-H3 mAb 1) имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и К-спираль имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 61):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY
GYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

В третьей полипептидной цепи, аминокислотная последовательность применяемого вариабельного домена тяжелой цепи CD8 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, шарнирный домен, CH1-домен и «несущий углубление» (hole-bearing) CH2-CH3-домен с заменой H435R, для удаления участка связывания протеина A, (SEQ ID NO: 8).

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи

триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 62):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRISIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

В четвертой полипептидной цепи аминокислотная последовательность применяемого вариабельного домена легкой цепи CD8 mAb 1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 и константный домен легкой цепи каппа.

Экспрессированную триспецифичную связывающую молекулу В7Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 загружали на смолу MSA, промывали 10 mM NaPO₄ (pH6); 10 mM NaPO₄, 1 M NaCl (pH6) и 10 mM NaPO₄ (pH6). Полипептиды элюировали из смолы с помощью 50 mM глицина (pH3) и нейтрализовали 1 M Tris (pH 8). Было установлено, что экспрессия составила 1,7мг/л; получение триспецифичной связывающей молекулы составило 0,6 мг/мл, с конечным выходом 0,42 мг.

Свойства триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 сравнивали со свойствами В7-Н3 X CD3 DART и В7-Н3 X CD3 DART с Fc-доменом. Как показано на фигурах.5А-5В, триспецифичная связывающая молекула В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 продемонстрировала аналогичное связывание клетки-мишени (А498 клетки (фигура 5А); JMT-1 (фигура 5В)) по сравнению с В7-Н3 X CD3 DART и В7-Н3 X CD3 DART с Fc-доменом. Однако, как показано на фигурах 5С-5D, триспецифичная связывающая молекула В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 продемонстрировали существенно большее связывание с CD8⁺ Т-клетками по сравнению с CD4⁺ Т-клетками.

Для того чтобы продемонстрировать способность триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 по настоящему изобретению опосредовать перенаправленное уничтожение клеток-мишеней, такие молекулы инкубировали в присутствии Т-клеток и либо JMT-1, либо А498 клеток-мишеней. Клетки JMT-1 являются трастузумаб-резистентной линией карциномы (Tanner, M. et al.(2004) “*Characterization Of A Novel Cell Line Established From A Patient With Herceptin-Resistant Breast Cancer*,” Mol. Cancer Ther. 140: 5841-5854). Клеточная линия А498 представляет собой клеточную линию клеток карциномы почки (Gogh, J. (1978) “*Cultivation, Characterization, And Identification Of Human Tumor Cells With Emphasis On Kidney, Testis, And Bladder Tumors*,” Natl. Cancer Inst. Monogr. 49:5-9). Как показано на фигурах 6А-6С, наблюдалось перенаправленное уничтожение клеток-мишеней. Неожиданно оказалось,

такое уничтожение было значительно более мощным, чем то, которое наблюдали для соответствующих В7-Н3 X CD3 DART™ и В7-Н3 X CD3 DART™ с Fc-доменом. Данные о наблюдаемом перенаправленном уничтожении суммированы в таблице 6.

Связывающая Молекула	Перенаправленное уничтожение				
	Клетки JMT-1			Клетки A498	
Анализ	LDH	LDH	люцифераза	LDH	LDH
	Макс. уничтожение (%)	EC50 (пм)	EC50 (пм)	Макс. уничтожение (%)	EC50 (пм)
В7-Н3 X CD3 DART™	60,72	27	22	61,95	11
В7-Н3 X CD3 DART™ с Fc-доменом	59,95	343	245	63,2	168
В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	54,88	0,4	0,6	53,5	4

Фигуры 7A-7D демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 опосредовать активацию Т-клеток после инкубации с клетками JMT-1. Фигуры 8A-8D демонстрируют способность триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 опосредовать активацию Т-клеток после инкубации с клетками A498. В обоих случаях такая активация была неожиданно превосходящей по отношению к активации, наблюдаемой со сравнительными В7-Н3 X CD3 DART™ и В7-Н3 X CD3 DART™ с Fc-доменом. В таблице 7 суммированы результаты EC50.

Опухолевые Клетки	Субпопуляция Т-клеток	значения EC50 триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 по сравнению с DART™		
		DART™	DART™ с Fc-доменом	Триспецифичная связывающая молекула
A498	CD4/CD69	51	95	75
	CD4/CD25	75	291	22
	CD8/CD69	70	185	4
	CD8/CD25	115	339	4
	CTL	10	48	4
JMT-1	CD4/CD69	116	339	253
	CD4/CD25	257	1034	185
	CD8/CD69	70	185	3
	CD8/CD25	140	678	37
	CTL	7	68	1

Экспрессированная триспецифично связывающая молекула В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 продемонстрировала гораздо более сильную (13-кратно) цитолитического активность с использованием эффекторных клеток CD8⁺ по сравнению с эффекторными клетками CD4⁺. Триспецифично связывающая молекула В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 также продемонстрировала значительно более высокую (85-кратно) общую эффективность с использованием «пан» Т-клеток в качестве эффекторов по сравнению с DART™.

Пример 2

Влияние CD8-связывающего домена на перенаправленную цитотоксичность

Для того, чтобы оценить эффект специфичности CD8, конструировали вторую триспецифичную связывающую молекулу, специфичную для антигена В7-Н3, ассоциированного с заболеванием, с использованием другой последовательности переменного домена антитела CD8. Специфичности переменного домена В7-Н3 и специфичности переменного домена CD3 были идентичны тем, которые используются для конструирования триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1. Триспецифично связывающую молекулу обозначили как В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2, и она состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 8).

Таблица 8		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (В7-Н3 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -Е-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: В7-Н3 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (В7-Н3 mAb 1) -К-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: В7-Н3
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 2	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 2	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 63):

```
DIQMTQSPSS  LSASVGDRVT  ITCRASQDIS  NYLNWYQQKP  GKAPKLLIYY
TSRLHSGVPS  RFSGSGSGTD  FTLTISSLQP  EDIATYYCQQ  GNTLPPTFGG
GTKLEIKGGG  SGGGGEVQLV  ESGGGLVQPG  GSLRLSCAAS  GFTFSTYAMN
WVRQAPGKGL  EWVGRIRSKY  NNYATYYADS  VKDRFTISRD  DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV  YYCVRHGNFG  NSYVSWFAYW  GQGTLVTVSS  GGCGGGEVAA
LEKEVAALEK  EVAALEKEVA  ALEKGGGDKT  HTCPCPAPE  AAGGPSVFLF
```

PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 64):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSY
 WMQWVRQAPG QGLEWMGTIY PGDGDTRYTQ KFKGRVTITA DKSTSTAYME
 LSSLRSEDTA VYYCARRGIP RLWYFDVWGQ GTTDTVSSGG CGGGKVAALK
 EKVAALKEKV AALKEKVAAL KE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 65):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL
 IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
 YDGYHFFDS WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCAPEAAG GPSVFLFPPK
 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRE EMTKNQVSL SCAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
 VLDSGDSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFS SCSVMHEALHNR YTQKSLSLSPG K

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 66):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
 TDILHTGVPS RFGSGSGTD FTFTISSLPQ EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG
 TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD
 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEEKHKV YACEVTHQGL
 SSPVTKSFNR GEC

Для того чтобы сравнить способность триспецифичных связывающих молекул B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 (конструкция и последовательности описаны выше) или

В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 в отношении связывания Т-клеток, очищали РВМС человека из здоровых доноров с использованием Ficoll, промывали два раза с использованием PBS и ресуспендировали в буфере FACS, содержащем 10% сыворотки АВ человека и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут, клетки осаждали и ресуспендировали 4×10^6 клеток/мл в буфере FACS. Добавляли 50 мкл последовательно титрованных триспецифичных связывающих молекул В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 или В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 или DART™ (В7-Н3 X CD3 или В7-Н3 X CD3 с Fc-доменом) в лунки 96-луночного глубокого планшета. Затем добавляли 50 мкл (4×10^6 клеток/мл), хорошо смешанных клеток в FACS буфере, содержащем 0,01% азида натрия, в соответствующие лунки и тщательно перемешивают с помощью пипетки. Планшеты инкубировали в темноте в течение около 45 минут при температуре 2-8 °С. В конце инкубирования клетки дважды промывали путем добавления 300 мкл буфера FACS в каждую лунку и центрифугирования планшета при 1200 об./мин в течение 5 минут и отбрасывали надосадочную жидкость. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл смеси PE-конъюгированных козьих антитела против человеческого Fcγ с разведением 1:500, CD5-APC и CD4-PerCP5.5 в FACS буфере, содержащем 0,01% азида натрия, и инкубировали в темноте в течение около 45 минут при температуре 2-8°С. По окончании инкубирования клетки промывали, ресуспендировали буфером FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Caliber. Селектировали клетки CD5⁺ CD4⁺ (фигура 9А) или CD5⁺ CD4⁻ (фигура 9В). Дифференциальное окрашивание наблюдали на CD5⁺ CD4⁻ популяции по сравнению с связывающими молекулами, которые обладают или лишены CD8-специфичности.

Цитотоксичность триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 сравнивали с цитотоксичностью триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2. Использовали оба анализа, люциферазный и LDH. Результаты двух анализов согласовывались. Две триспецифичные связывающие молекулы вызвали эквивалентную перенаправленную цитотоксичность в присутствии активирующих CD8⁺ Т-клеток или пан-Т-клеточных популяций. Триспецифичная связывающая молекула, содержащая CD8 mAb 1-связывающий домен, демонстрировала большую перенаправленную цитотоксичность в присутствии CD8⁺ клеточных популяций или пан-Т-клеток по сравнению с В7Н3 X CD3 DART (фигура 10А-10С).

Увеличение (60-кратное) EC50 для CD8⁺ по сравнению с CD4⁺ эффекторными клетками также наблюдали для триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 по сравнению с триспецифичной связывающей молекулой В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1. Для триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3

mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 наблюдали повышенную эффективность, что приводило к уменьшению EC50 более чем в 100 раз, когда пан-Т-клетки использовали в качестве эффекторных клеток.

Пример 3

Влияние положений домена на перенаправленную цитотоксичность

Для того чтобы оценить эффект положения для данного связывающего домена (CD3, CD8 и антигена, ассоциированного с заболеванием) в триспецифичной связывающей молекуле (сайт А, сайт В и сайт С), конструировали несколько дополнительных триспецифичных связывающих молекул. В **Таблице 9** представлены триспецифичные связывающие молекулы и локализация (сайт А, сайт В и сайт С) различных связывающих доменов (CD3, CD8 и антигена, ассоциированного с заболеванием).

Триспецифичная связывающая молекула	участок А	участок В	участок С
В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	В7-Н3 mAb 1	CD3 mAb 2	CD8 mAb 1
CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/В7-Н3 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	CD3 mAb 2	CD8 mAb 1	В7-Н3 mAb 1
В7-Н3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2 Триспецифичная связывающая молекула	В7-Н3 mAb 1	CD8 mAb 1	CD3 mAb 2

Конструкция и последовательность триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 описаны выше. Для двух дополнительных триспецифичных связывающих молекул (CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/В7-Н3 mAb 1 и В7-Н3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2), специфичности переменного домена В7-Н3, специфичности переменного домена CD3 и специфичности переменного домена CD8 были идентичны тем, которые использовали для конструирования триспецифичной связывающей молекулы В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1. Триспецифичная связывающая молекула CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/В7-Н3 mAb 1 состояла из четырех различных полипептидных цепей (таблица 10).

Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (CD3 mAb 2) -VH (CD8 mAb 1) -Е-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: CD8
2	VL (CD8 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -К-спираль	Легкая цепь: CD8 Тяжелая цепь: CD3
3	Тяжелая цепь В7-Н3 mAb 1	В7-Н3
4	Легкая цепь В7-Н3 mAb 1	В7-Н3

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/B7-H3 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 67):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRGGG
 SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN WVRQAPGKGL
 EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM NSLKTEDTAV
 YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GCGGGGEVAA LEKEVAALEK
 EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 SREEMTKNQV SLWCLVKGfy PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS
 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/B7-H3 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 68):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLQQSGAELV KPGASVKLSC TASGFNIKDT
 YIHVVRQRPE QGLEWIGRID PANDNTLYAS KFQGKATITA DTSSNTAYMH
 LCSLTSGDTA VYYCGRGYGY YVFDHWGQGT TLTVSSGGCG GGKVAALKEK
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/B7-H3 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO:69):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT
 IYPGDGTRY TQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG
 IPRWYFDVW GQGTTVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVPE KSCDKTHTCP PCPAPEAAGG PSVFLFPPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSREE MTKNQVSLSC AVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV
 LDSDGSSFLV SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNRYT QKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи

триспецифичной связывающей молекулы CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/B7-H3 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO:70):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG GTKLEIKRTV
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEN

Триспецифичная связывающая молекула B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 11).

Таблица 11		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (B7-H3 mAb 1) -VH (CD8 mAb 1) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: B7-H3 Тяжелая цепь: CD8
2	VL (CD8 mAb 1) -VH (B7-H3 mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD8 Тяжелая цепь: B7-H3
3	Тяжелая цепь CD3 mAb 2	CD3
4	Легкая цепь CD3 mAb 2	CD3

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 71):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYYCQQ HNENPLTFGA GTKLELRGGG
 SGGGGQVQLV QSGAEVKKPG ASVKVSKAS GYTFTSYWMQ WVRQAPGQGL
 EWMGTIYPGD GDTRYTQKFK GRVTITADKS TSTAYMELSS LRSEDTAVYY
 CARRGIPRLW YFDVWGQGT VTVSSGGCGG GEVAALEKEV AALEKEVAAL
 EKEVAALEKG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE
 VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV
 LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM
 TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPV L DSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 72):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY
 TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQ GNTLPPTFGG
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLQ QSGAELVKPG ASVKLSCTAS GFNIKDTYIH
 FVRQRPEQGL EWIGRIDPAN DNTLYASKFQ GKATITADTS SNTAYMHLCS

LTSGDTAVYY CGRGYGYVVF DHWGQGTTLT VSSGGCGGGK VAALKEKVAALKEKVAALKE KVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 73):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
 IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
 HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSSASTKG PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL
 GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA VLQSSGLYSL SSVVTVPSSS
 LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KRVEPKSCDK THTCPPCPAP EAAGGPSVFL
 FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNQKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ
 PREPQVYTLF PSREEMTKNQ VSLSCAVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK
 TTPPVLDSDG SFFLVSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNRYTQKSLS LSPGK

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 74):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKRPPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ
 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT
 HQGLSSPVTK SFNRGEC

Результаты этого исследования представлены на фигурах 11А-11С, фигурах 12а-12С, фигурах 13А-13Е, и в таблице 26. Фигуры 11А-11С и фигуры 12А-12С демонстрируют независимо друг от друга, что размещение CD3-связывающего домена в сайте С триспецифичных связывающих молекул снижает цитотоксичность молекулы. Фигуры 13А-13Е демонстрируют, что эта пониженная цитотоксичность наблюдается независимо от того, были ли использованы CD4⁺, CD8⁺ или пан-Т-клетки.

Как показано на фигурах 14А-14В, размещение CD3-связывающего домена в сайте С значительно уменьшает связывание с обоими типами клеток, CD5⁺ CD4⁺ клетками (фигура 14А) и CD5⁺ CD4-клетками (фигура 14В). Примечательно, однако, что независимо от размещения CD3-связывающего домена все триспецифические связывающие молекулы были способны опосредовать перенаправленную цитотоксичность.

Пример 4

Получение и свойства примерных анти-CD3, анти-CD8, анти-5Т4 триспецифичных связывающих молекул

Конструировали дополнительные примерные триспецифичные связывающие молекулы, специфичные для антигена 5Т4, ассоциированного с заболеванием. Триспецифичная связывающая молекула 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 12).

Таблица 12		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (5Т4 mAb 2) -VH (CD3 mAb 2) -Е-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: 5Т4 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (5Т4 mAb 2) -К-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: 5Т4
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 75):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNR SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
 FTFGSGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
 TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSSGGCGG
 GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 76):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQPGAELV KPGASVKMSC KASGYTFTSY
 WITWVKQRPG QGLEWIGDIY PGSGRANYNE KFKSKATLTV DTSSSTAYMQ

LSSLTSEDSA VYNCARYGPL FTTVVDPNYSY AMDYWGQGTS VTVSSGGCGG
GKVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 77):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHVFRQR PEQGLEWIGR
IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTS GD TAVYYCGRGY
GYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 78):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Триспецифичная связывающая молекула 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 13).

Таблица 13		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (5Т4 mAb 2) -VH (CD3 mAb 2) -Е-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: 5Т4 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (5Т4 mAb 2) -К-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: 5Т4
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 2	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 2	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 79):

DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV YSNGNTYLEW YLQKPGQSPK
 LLIYKVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV
 FTFGSGTKLE IKGGGSGGGG EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS
 TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS
 LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSSGGCGG
 GEVAALEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 80):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQQPGAELV KPGASVKMSC KASGYTFTSY
 WITWVKQRPQ QGLEWIGDIY PGSGRANYNE KFKSKATLTV DTSSSTAYMQ
 LSSLTSEDSA VYNCARYGPL FTTVVDPNYSY AMDYWGQGTS VTVSSGGCGG
 GKVAALKEKV AALKEKVAAL KEKVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 81):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL
 IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
 YDGYHFFDS WGQGTLLTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCAPEAAG GPSVFLFPPK
 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRE EMTKNQVSLS CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
 VLDSGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNRY TQKSLSLSPG K

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 82):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
 TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG
 TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD
 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
 SSPVTKSFNR GEC

Триспецифичные связывающие молекулы 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 экспрессировали и очищали, как описано выше. Способность этих двух триспецифичных связывающих молекул связываться с CD5⁺/CD4⁺ селектированными лимфоцитами и с CD5⁺/CD4⁻ селектированными человеческими РВМС сравнивали с такой способностью 5Т4 X CD3 DART с Fc-доменом. Как показано на фигурах 15А-15В, триспецифичные связывающие молекулы 5Т4/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и 5Т4/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 демонстрировали существенно повышенное связывание с CD8⁺ Т-клетками (фигура 15В) по сравнению с CD4⁺ Т-клетками (фигура 15А).

Для того, чтобы продемонстрировать способность триспецифичных связывающих молекул 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 опосредовать перенаправленное уничтожение клеток-мишеней, такие молекулы инкубировали в присутствии Т-клеток и JИМТ-1 клеток-мишеней. Как показано на фигурах 16А-16С, наблюдалось перенаправленное уничтожение клеток-мишеней. Как наблюдали для триспецифичных связывающих молекул В7-Н3, описанных выше, уничтожение было значительно более мощным, чем наблюдаемое для соответствующих 5Т4 X CD3 DART, содержащих Fc-домен. Точно так же, как это наблюдалось для триспецифичных связывающих молекул В7-Н3, использование различных переменных доменов CD8 не оказывает влияния на способность триспецифичных связывающих молекул 5Т4 перенаправлять CD8⁺ Т-клетки на клетки-мишени. Также было обнаружено, что триспецифичная связывающая молекула 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 является высоко активной и демонстрирует гораздо большую активность CTL с использованием CD8⁺ по сравнению с CD4⁺ эффекторными клетками (в 23 раза ниже EC50). Триспецифичная связывающая молекула 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 была в 22 раза более эффективной с использованием эффекторных пан-Т-клеток по сравнению с 5Т4 X CD3 DART™, а триспецифичная связывающая молекула 5Т4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 была в 25 раз более эффективной.

Пример 5

**Свойства примерных анти-CD3, анти-CD8, анти-ROR1 триспецифичных
связывающих молекул**

Конструировали дополнительные примерные триспецифичные связывающие молекулы, специфичные для антигена ROR1, ассоциированного с заболеванием. Триспецифичная связывающая молекула ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 14).

Таблица 14		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (ROR1 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: ROR1 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (ROR1 mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: ROR1
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 83):

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP GKAPRYLMKL
EGSGSYNKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYCGTDYPGN
YLFGGGTQLT VLGGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF
STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKGR FTISRDDSKN
SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG
GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG
PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 84):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQE QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSDY
YMSWVRQAPG KGLEWVATY PSSGKTYAD SVKGRFTISS DNAKNSLYLQ

MNSLRAEDTA VYYCARDSYA DDAALFDIWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 85):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY
GYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPG

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 86):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Триспецифичная связывающая молекула Ror1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 15).

Таблица 15		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (ROR1 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: ROR1 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (ROR1 mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: ROR1
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 2	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 2	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 87):

QLVLTQSPSA SASLGSSVKL TCTLSSGHKT DTIDWYQQQP GKAPRYLMKL
EGSGSYNKGS GVPDRFGSGS SSGADRYLTI SSLQSEDEAD YYCGTDYPGN

YLFGGGTQLT VLGGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF
 STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKGR FTISRDDSKN
 SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFNGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSGGCG
 GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK GGGDKTHTCP PCPAPEAAGG
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA
 KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP
 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 88):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQE QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSDY
 YMSWVRQAPG KGLEWVATYI PSSGKTYAD SVKGRFTISS DNAKNSLYLQ
 MNSLRAEDTA VYYCARDSYA DDAALFDIWG QGTTVTVSSG GCGGGKVAAL
 KEKVAALKEK VAALKEKVAA LKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 89):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL
 IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH
 YDGYHFFDS WGQGLVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV
 KDYFPEPVTV SWNSGALTSV VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKP SNTKVDKRVK PKSCDKTHTC PPCAPEAAG GPSVFLFPPK
 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
 QVYTLPPSRE EMTKNQVSLV CAVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
 VLSDGSFFL VSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNRY TQKSLSLSPG K

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 представляет собой (SEQ ID NO: 90):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN
 TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG

TKVEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYR REAKVQWKVD
NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL
SSPVTKSFNR GEC

Свойства триспецифичных связывающих молекул ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 сравнивали с такими свойствами ROR1 X CD3 DART™, содержащей Fc-домен. Триспецифичные связывающие молекулы DART™ и ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 конструировали с использованием последовательностей Fv из моноклонального анти-ROR1 антитела, ROR1 mAb 1, которое связывается с антигеном ROR-1.

Две триспецифичных связывающих молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 и DART, все были активны в CTL анализах против JMT1-Luc и A549 клеток-мишеней. Однако триспецифичные связывающие молекулы ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 демонстрировали резко возросшую активность с CD8⁺ Т-клетками и пан-Т-клетками эффекторами.

Способность триспецифичных связывающих молекул ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 опосредовать перенаправленное уничтожение клеток-мишеней измеряли с использованием как люциферазного анализа, так и LDH анализ. В обоих случаях наблюдалось перенаправленное уничтожение. Фигуры 17А-17С демонстрируют перенаправленное уничтожение клеток-мишеней, измеренное с помощью люциферазного анализа. Результаты суммированы в таблице 16.

Таблица 16						
триспецифичная связывающая молекула	EC50			соотношение		
	эффекторные клетки			CD4	CD4	пан-Т
	CD4	CD8	пан-Т	CD8	CD8	
	JMT-1 LUC клетки-мишени (люциферазный анализ)					
Ror1 X CD3 DART™	0,45	0,4064	0,3931	1,1	1,0	1,0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	0,131	0,0009	0,0015	145,3	131,3	262,1
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 триспецифичная связывающая молекула	0,174	0,0011	0,0016	158,0	142,7	245,7
	JMT-1 LUC клетки-мишени (LDH анализ)					
Ror1 X CD3 DART™	0,291	0,7761	0,7643	0,4	1,0	1,0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	0,095	0,0017	0,0053	55,9	149,0	144,2
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 триспецифичная связывающая молекула	0,277	0,0021	0,0057	131,8	351,3	134,1
	A549					
Ror1 X CD3 DART™	0,762	0,468	0,5305	1,6	1,0	1,0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	0,879	0,0102	0,0231	86,2	53,0	23,0
ROR 1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 триспецифичная связывающая молекула	1,257	0,009	0,0126	139,7	85,8	42,1

Пример 6

Свойства примерных анти-CD3, анти-CD8, анти-Epв триспецифичных связывающих молекул

Конструировали дополнительные примерные триспецифичные связывающие молекулы, специфичные для антигена HIV (GP140 антиген), ассоциированного с заболеванием. Триспецифичная связывающая молекула HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 17).

Таблица 17		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (HIV mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: HIV Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (HIV mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: HIV
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 91):

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTLL YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP
 KLLLYWASMR LSGVPDRFSG SGSGTDFTLT INNLAEDVA IYYCHQYSSH
 PPTFGHGTRV EIKGGGSGGG GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF
 STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNNYA TYYADSVKGR FTISRDDSKN
 SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT LVTVSSASTK
 GEVAACEKEV AALEKEVAAL EKEVAALEKG GGDKTHTCPP CPAPEAAGGP
 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLWCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 92):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKRNPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGGGVF KPGGSLRLSC EASGFTFTEY
 YMTWVRQAPG KGLEWLAYIS KNGEYSKYSP SNGRFTISR DNAKNSVFLQ
 LDRLSADDTA VYYCARADGL TYFSELLQYI FDLWGQGARV TVSSASTK GK
 VAACKEKVAA LKEKVAALKE KVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 93):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
 IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY

GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPCC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
 SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPG

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 94):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Триспецифичная связывающая молекула HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 18).

Таблица 18		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (HIV mAb 2) -VH (CD3 mAb 2) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: HIV Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (HIV mAb 2) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: HIV
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 95):

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH HPGKAPKLI
 SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHNFV
 FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY
 AMNWVRQAPG KGLEWVGRIR SKYNNYATYY ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY
 LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGTLLV VSSASTKGEV
 AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEKGGGD KTHTCPCCPA PEAAGGPSVF
 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSINKALPAP IEKTISKAKG
 QPREPQVYTL PPSREEMTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNNGQPENNY

KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 96):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLQESGPGLV KPSQTLSSLSC TVSGGSSSSG
AHYWSWIRQY PGKGLEWIGY IHYSGNTYYN PSLKSRITIS QHTSENQFSL
KLNSVTVADT AVYYCARGTR LRTRLRNASFDI WGQGTLVTVS SASTKGKVA
A
CKEVAALKE KVAALKEKVA ALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 97):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY
GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSQVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPG

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 98):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTRSRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Получали триспецифичные связывающие молекулы, содержащие связывающий домен, способный связываться с антигеном gp140 вируса иммунодефицита человека (HIV) (т.е. HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула и HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула).

В качестве предварительного шага, оценивали способность триспецифичных связывающих молекул HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 и HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8

mAb 1. Два мкг/мл gp140 белка штамма JR-FL в 0,2 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9,4) наносили в виде покрытия на твердую подложку, и затем инкубировали с триспецифичными связывающими молекулами (при начальной концентрации 5 мкг/мл, с последующими серийными разведениями 1:2). По завершении анализа, связывание блокировали с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (PBS), содержащего 3% бычьего сывороточного альбумина (БСА). Связывание детектировали с помощью тИФА (Pico (ThermoScientific-Pierce) с использованием анти-человеческого IgG, который был конъюгирован с пероксидазой хрена (HRP). Анализ был также использован с иммобилизованным человеческим CD3 (2 мкг/мл) для того, чтобы оценить способность молекул связываться с CD3. Было обнаружено, что триспецифичные связывающие молекулы обладают способностью связываться с растворимым, иммобилизованным белком GP140 (фигура 18А) и с человеческим CD3 (фигура 18В). Сэндвич-тИФА проводили для демонстрации того, что триспецифичные связывающие молекулы способны скоординированно связываться с обоими, gp140 и CD3. Для этой цели, 2 мкг/мл штамма белка gp140 штамма JR-FL в 0,2 М карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,4), наносили в виде покрытия на твердую подложку, а затем инкубировали с триспецифичными связывающими молекулами (при начальной концентрации 5 мкг/мл, а затем с серийными разведениями 1:2). Затем добавляли человеческий CD3, меченный биотином (0,5 мкг/мл). Связывание детектировали с помощью тИФА (Pico (ThermoScientific-Pierce) с использованием конъюгата стрептавидин-HRP. Фигура 18С демонстрирует, что триспецифичные связывающие молекулы были способны скоординированно связываться с обоими, gp140 и CD3.

Было обнаружено, что триспецифичные связывающие молекулы способны связываться с поверхностью клеток, которые экспрессируют белок HIV Env. Чтобы продемонстрировать этот аспект изобретения, НЕК293/D375 клетки, экспрессирующие HIV Env при условиях индукции доксициклином инкубировали с триспецифичными связывающими молекулами. Детектирование связывания осуществляли с использованием биотинилированного антитела против человеческого Fc и стрептавидин-APC. Как показано на фигурах 19А-19С, было обнаружено, что обе триспецифичные связывающие молекулы способны связываться с клетками НЕК293/D375 в отличие от контрольной триспецифичной связывающей молекулы (фигура 19С).

Для того, чтобы продемонстрировать способность таких триспецифичных связывающих молекул опосредовать перенаправленное уничтожение HIV-инфицированных клеток, оценивали способность таких молекул связываться с РВМС. Человеческую кровь лизировали с использованием лизирующего буфера АСК, промывали

2X PBS и повторно суспендировали в буфере FACS, содержащем 10% человеческой сыворотки АВ, и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 минут. Затем клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали (4×10^6 клеток/мл) в буфере FACS. 50 мкл серийно титрованных триспецифичных связывающих молекул добавляли в лунки 96-луночного глубокого планшета. 50 мкл клеток (4×10^6 клеток/мл) хорошо перемешанных в FACS буфере, содержащем 0,01% азиды натрия, затем добавляли в соответствующие лунки и тщательно перемешивали с помощью пипетки. Планшет инкубировали в темноте в течение около 45 минут при температуре 2-8 °С. В конце инкубирования клетки дважды промывали путем добавления 300 мкл буфера FACS в каждую лунку, планшет центрифугировали при 1200 об./мин в течение 5 минут, и отбрасывали надосадочную жидкость. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл смеси козьих антител против человеческого IgG Fc γ -PE, CD5-APC и CD4-PerCP5.5, приготовленной в буфере FACS, содержащем 0,01% азиды натрия, и клетки инкубировали в темноте в течение около 45 минут при температуре 2-8 °С. По окончании инкубирования клетки промывали, ресуспендировали буфером FACS и анализировали с помощью проточного цитометра BD Caliber. Как показано на фигурах 20А-20В, было обнаружено, что триспецифичные связывающие молекулы проявляют специфичное связывание с популяцией CD5+/CD4- клеток.

Триспецифичные связывающие молекулы, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в присутствии клеток Jurkat 522 FY, экспрессирующих HIV env, и пан-Т-клеток в присутствии или в отсутствии тетрациклина, и измеряли цитотоксичность с использованием LDH-анализа. Как показано на фигурах 21А-21F, триспецифичные связывающие молекулы опосредуют существенную цитотоксичность.

Анализ цитотоксичности проводили с использованием очищенных пан-Т-клеток и клеток Jurkat 522 FY, экспрессирующих HIV env, и измеряли процент живых клеток. Результаты этого анализа показаны на фигурах 22А-22В.

Проводили оценку CTL-активности из триспецифичных связывающих молекул на HIV env-экспрессирующих клетках Jurkat 522 FY с использованием CD4+, CD8+ или пан-Т-клеток. Результаты этой оценки по отношению к триспецифичным связывающим молекулам HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 показаны на фигурах 23А-23С. Результаты этой оценки по отношению к триспецифичным связывающим молекулам HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 показаны на фигурах 24А-24С. В таблице 19 суммированы результаты.

Таблица 19 Клетки Jurkat 522FY (% Цитотоксичности по отношению к LDH MR из клеток-мишеней без связывающей молекулы)							
HIV mAb 1, CD3 mAb 2 DART™		HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула		HIV mAb 2, CD3 mAb 2 DART™		HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	
EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %
CD4							
0,67	13	0,36	15	0,25	9	0,45	8
CD8							
0,20	18	0,00781	37	0,052	16	0,00040	27
пан-Т							
0,31	19	0,044	38	0,26	16	0,0015	23

Оценивали влияние изменения отношения мишень:эффекторные клетки. В таблице 20 суммированы полученные результаты.

Таблица 20								
	Клетки Jurkat 522FY (% Цитотоксичности по отношению к LDH MR из клеток-мишеней без связывающей молекулы)							
	HIV mAb 1 связывающий домен				HIV mAb 2-связывающий домен			
	E/T = 5:1		E/T = 10: 1		E/T = 5: 1		E/T = 10: 1	
	EC ₅₀ нМ	E _{max} %	EC ₅₀ нМ	E _{max} %	EC ₅₀ нМ	E _{max} %	EC ₅₀ нМ	E _{max} %
DART™	0,076	26	0,066	27	0,00057	24	0,00061	25
DART™	0,0092	15	0,0066	15	0,0058	15	0,0054	15
триспецифичная связывающая молекула	0,00019	22	0,00029	24	0,00032	25	0,00026	24

Также проводили оценку CTL-активности из триспецифичных связывающих молекул на HIV env-экспрессирующих клетках HEK293 с использованием CD4+, CD8+ или пан-Т-клеток. Результаты этой оценки представлены в таблице 21.

Таблица 21 (% Цитотоксичности по отношению к LDH MR из клеток-мишеней без триспецифичной связывающей молекулы)							
клетки HEK293 D371				клетки HEK293 D375			
HIV mAb 1, CD3 mAb 2 DART™		HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула		HIV mAb 2, CD3 mAb 2 DART™		HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	
EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %	EC ₅₀ , нМ	E _{max} , %
CD4							
0,45	0,64	3,16	1,12	0,15	0,14	0,84	0,18
CD8							
0,029	0,0062	1,77	0,0043	0,018	0,0012	1,00	0,0020
пан-Т							
0,082	0,025	2,06	N/A	0,042	0,0085	1,08	N/A

Пример 7

Сравнение аффинности вариантов CD3-связывающих доменов

Как было отмечено выше, CD3, CD8 или антигенсвязывающие домены антигена, ассоциированного с заболеванием, триспецифичных связывающих молекул по настоящему изобретению, могут быть подвергнуты мутации для выделения связывающих доменов, имеющих более желательные характеристики связывания. CD3 mAb 2-связывающий домен был подвергнут такому мутагенезу, и было выделено два аффинных варианта (CD3 mAb 2 Low и CD3 mAb 2 Fast).

Аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи человеческого CD3 mAb 2 Low представляет собой (SEQ ID NO: 99):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGTKLTVLG

Аминокислотная последовательность вариабельного домена тяжелой цепи человеческого CD3 mAb 2 Low представляет собой (SEQ ID NO: 100):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR

HGNFGNSYVT WFAYWGGQTL VTVSS

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи человеческого CD3 mAb 2 Fast представляет собой (SEQ ID NO: 101):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи человеческого CD3 mAb 2 Fast представляет собой (SEQ ID NO: 102):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR
HKNFGNSYVT WFAYWGGQTL VTVSS

Фигуры 25A-25C демонстрируют кинетику связывания для этих вариантов. CD3 mAb 2 Low (фигура 25A) представляет собой вариант низкой аффинности, в то время как CD3 mAb 2 Fast (фигура 25B) имеет более быструю скорость диссоциации по сравнению с диким типом CD3 mAb 2 (фигура 25C).

Для того чтобы оценить влияние характеристик связывания CD3, были использованы два мутанта CD3-связывающих доменов. Конструировали три триспецифичных связывающих молекулы, специфичных для антигена 5T4, ассоциированного с заболеванием, с использованием последовательности варибельного домена CD3 mAb 2 дикого типа, последовательности варибельного домена CD3 mAb 2 с низкой аффинностью к CD3, и последовательности варибельного домена CD3 mAb 2 с аффинностью дикого типа, но с более быстрой скоростью диссоциации. Специфичности варибельного домена 5T4 и специфичности варибельного домена CD8 были одинаковыми между тремя триспецифичными связывающими молекулами. Первую триспецифичную связывающую молекулу обозначили как 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, и она состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 22).

Таблица 22		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (5T4 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: 5T4 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2) -VH (5T4 mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: 5T4
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID

NO: 103):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR
 ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS GGCGGGEVAA
 LEKEVAALEK EVAALEKEVA ALEKGGGDKT HTCPCPAPE AAGGPSVFLF
 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 REPQVYTLPP SREEMTKNQV SLWCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 104):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKNRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF
 WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME
 LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWQGT TVTVSSGGCG GGKVAALKEK
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 105):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
 IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY
 GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL
 SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 106):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTRSIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Вторую триспецифичную связывающую молекулу обозначили как 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1, и она состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 23).

Таблица 23		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (5T4 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2 Low) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: 5T4 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2 Low) -VH (5T4 mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: 5T4
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 107):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR
 ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ
 GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVTWFAYW GQGLVTVSS ASTKGEVAAC
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCAPEA AGGPSVFLFP
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
 PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL SLS PGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 108):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
 GGTKNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF
 WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME
 LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGGQT TTVTVSSASTK GKVAACKEKV

AALKEKVAAL KEKVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 109):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
 IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY
 GYYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YLSSVVTVP SSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
 SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 110):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTSRISIS QYLAWYQEKP GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
 AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Третью триспецифичную связывающую молекулу обозначили как 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1, и она состоит из четырех различных полипептидных цепей (таблица 24).

Таблица 24		
Полипептидная цепь	Домены	Аффинность связывания
1	VL (5T4 mAb 1) -VH (CD3 mAb 2 Fast) -E-спираль (CH2-CH3)	Легкая цепь: 5T4 Тяжелая цепь: CD3
2	VL (CD3 mAb 2 Fast) -VH (5T4 mAb 1) -K-спираль	Легкая цепь: CD3 Тяжелая цепь: 5T4
3	Тяжелая цепь CD8 mAb 1	CD8
4	Легкая цепь CD8 mAb 1	CD8

Аминокислотная последовательность первой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 574 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 111):

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS NYLAWFQQKP GKAPKSLIYR
 ANRLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDVATYYCLQ YDDFPWTFGQ

GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN
WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM
NSLKTEDTAV YYCVRHKNFG NSYVTFWYAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC
EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPEAPEA AGGPSVFLFP
PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE
QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR
EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT
PPVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSGK

Аминокислотная последовательность второй полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 112):

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF
GGGKTLTVLG GGGSGGGGQV QLVQSGAEVK KPGASVKVSC KASGYTFTSF
WMHWVRQAPG QGLEWMGRID PNRGGTEYNE KAKSRVTMTA DKSTSTAYME
LSSLRSEDTA VYYCAGGNPY YPMDYWGGGT TVTVSSASTK GKVAACKEKV
AALKEKVAAL KEKVAALKE

Аминокислотная последовательность третьей полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 113):

EVQLQQSGAE LVKPGASVKL SCTASGFNIK DTYIHFVRQR PEQGLEWIGR
IDPANDNTLY ASKFQ GKATI TADTSSNTAY MHLCSLTSGD TAVYYCGRGY
GYVFDHWGQ GTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI
CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPE PAPEAAGGPS VFLFPPKPKD
TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
TLPPSREEMT KNQVSLSCAV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
SDGSFFLVSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNRYTQK SLSLSPGK

Аминокислотная последовательность четвертой полипептидной цепи триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 представляет собой (SEQ ID NO: 114):

DVQINQSPSF LAASPGETIT INCRTRSRSIS QYLAWYQEKPK GKTNKLLIYS GSTLQSGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISGLEP EDFAMYQCQQ HNENPLTFGA GTKLELRRTV
AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ

ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC

Человеческие PBMC здоровых доноров обрабатывали, как описано выше, и инкубировали с триспецифичной связывающей молекулой 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, триспецифичной связывающей молекулой 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 и триспецифичной связывающей молекулой 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1. 5T4 X CD3 DART™ (специфичности CD3 дикого типа, Low и Fast) использовали в качестве контролей. Триспецифичные связывающие молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 и 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 содержат мутантные CD3-связывающие домены, которые демонстрируют измененную аффинность и кинетику связывания для CD3.

Было обнаружено, что триспецифичные связывающие молекулы проявляют более слабое связывание с CD5⁺ CD4⁺ клетками (фигура 26A), но гораздо более сильное связывание с CD5⁺ CD4-клетками (фигура 26B) по сравнению с контролями DART™.

Фигуры 27A-27C демонстрируют влияние вариантов CD3 mAb на цитотоксичность триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 с использованием LDH-анализа. Аналогичные результаты были получены с использованием люциферазного анализа и с триспецифичными связывающими молекулами, содержащими V7-N3-связывающий домен вместо связывающего домена 5T4 mAb 1. Результаты демонстрируют, что триспецифичная связывающая молекула CD3 mAb 2 Low проявляет минимальную цитотоксичность, но что триспецифичная связывающая молекула CD3 mAb 2 Fast проявляет цитотоксичность с CD8⁺ Т-клетками и пан-Т-клетками в гораздо большей степени, чем с CD4⁺ Т-клетками.

Для того, чтобы оценить эффекты триспецифичных связывающих молекул в отношении профилей цитокинов, PBMC от двух доноров инкубировали в присутствии возрастающих концентраций триспецифичных связывающих молекул 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1, триспецифичных связывающих молекул 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 и триспецифичных связывающих молекул 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 в течение 24 часов. Были измерены уровни шести цитокинов (IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 и IL-2). Результаты показаны на фигурах 28A-28F (донор 1) и на фигурах 29A-29F (донор 2). Результаты неожиданно продемонстрировали резкое снижение уровня цитокинов, высвобождаемых из PBMC по сравнению с DART™, которые направлены только на CD3 и не являются селективными для CD8⁺ Т-клеток.

Триспецифичная связывающая молекула 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 проявляла подобную активность в отношении DART™, 1 пМ EC50 по сравнению с 1,3 пМ для DART™ с использованием пан-Т-клеток в качестве эффекторов. Активность DART™

может уже быть максимальной для обоих типов клеток, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Триспецифичная связывающая молекула сдвигает активность к популяции CD8⁺ и от популяции CD4⁺, что выгодно с точки зрения высвобождения цитокинов, в частности IL-2 и TNF α .

Хотя триспецифичная связывающая молекула 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 была способна связываться с CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками, ее способность перенаправлять цитолиз таких клеток или с помощью значительно снижалась по сравнению с немутантным CD3 mAb 2-связывающим доменом. С другой стороны, триспецифичная связывающая молекула 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 сохраняла CTL-активность, в частности, с CD8⁺ Т-клетками, по сравнению с CD4⁺ Т-клетками (75-кратное различие в EC50) по сравнению с триспецифичной связывающей молекулой 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 (7-кратное различие в EC50). EC50 для триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1 было аналогично соответствующему значению триспецифичной связывающей молекулы 5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 (2,8 против 1,3 пМ), но резкое различие в направленном воздействии на CD8⁺ против направленного воздействия на CD4⁺ Т-клетки практически ликвидировало высвобождение цитокинов, что наблюдали с 5T4 X CD3 DART™ в культурах РВМС человека.

Пример 8

Сводка данных по EC50 для примерных триспецифичных связывающих молекул

Таким образом, была сконструирована группа из 14 триспецифичных связывающих молекул (таблица 25), каждая из которых содержит два связывающих домена типа диатела (участок А и участок В), и один связывающий домен Fab-типа (Сайт С):

Название	Связывающий домен		
	участок А	участок В	участок С
B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	B7-H3	CD3	CD8
CD3 mAb 2/CD8 mAb 1/B7-H3 mAb 1	CD3	CD8	B7-H3
B7-H3 mAb 1/CD8 mAb 1/CD3 mAb 2	B7-H3	CD8	CD3
B7-H3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	B7-H3	CD3	CD8
5T4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	5T4	CD3	CD8
5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1	5T4	CD3 Low	CD8
5T4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8 mAb 1	5T4	CD3 Fast	CD8
5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	5T4	CD3	CD8
5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2	5T4	CD3	CD8
Паливизумаб/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	RSV	CD3	CD8
Ror1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	ROR1	CD3	CD8
Ror1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2	ROR1	CD3	CD8
HIV mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	HIV	CD3	CD8
HIV mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1	HIV	CD3	CD8

Данные EC50 таких триспецифичных связывающих молекул суммированы в таблице 26 (клетки-мишени: JMT1-LUC; соотношение эффектор:клетки-мишени 5:1). В некоторых случаях (показано как NR в таблице 26), EC50 не может быть вычислено на основе данных, так как максимальное уничтожение не было достигнуто.

Таблица 26							
Мишень	Связывающая Молекула	EC50 (нМ)				с DART CD4/CD8	с DART EC50 с/панТ
		CD8+	CD4+	панТ	CD4/CD8		
В7Н3	В7-Н3/CD3 mAb 2 DART™	0,509	1,137	0,6943	2,2	1	1
	В7-Н3/CD8 mAb 1 DART™	NR	NR	NR	—	—	—
	В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 триспецифичная связывающая молекула	0,0054	0,0721	0,0082	13,3	5,9	85,1
	В7-Н3 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 Триспецифичная связывающая молекула	0,0051	0,3138	0,0058	61,5	27,5	119,7
	CD3 mAb 2/CD8 mAb 2/В7-Н3 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	0,0053	0,1055	0,0113	19,8	8,9	61,4
	В7-Н3 mAb 1/CD8 mAb 2/CD3 mAb 2 Триспецифичная связывающая молекула	0,4125	1,1030	0,5347	2,7	1,2	1,3
5Т4	5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 DART™	0,0012	0,0013	0,0013	1,1	1,0	1,0
	5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	0,0007	0,0045	0,0009	6,8	6,4	1,5
	5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Low/CD8 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	NR	NR	NR	—	—	—
	5Т4 mAb 1/CD3 mAb 2 Fast/CD8	0,0021	0,1598	0,0028	74,7	70,6	0,5

	mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула						
	5T4 mAb 2/CD3 mAb 2 DART™	0,0362	0,0561	0,0449	1,6	1,0	1,0
	5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	0,0013	0,0435	0,0020	32,7	21,1	22,1
	5T4 mAb 2/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 Триспецифичная связывающая молекула	0,0015	0,0336	0,0018	23,2	14,9	25,0
RSV	Паливизумаб /CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	NR	NR	NR	—	—	—
ROR1	ROR1/CD3 mAb 2 DART™	0,7761	0,2911	0,7643	0,4	1,0	1,0
	ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 1 Триспецифичная связывающая молекула	0,0017	0,095	0,0053	55,9	149,0	144,2
	ROR1 mAb 1/CD3 mAb 2/CD8 mAb 2 Триспецифичная связывающая молекула	0,0021	0,2767	0,0057	131,8	351,3	134,1

Все публикации и патенты, упомянутые в данном описании, включены ссылкой в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка была конкретно и отдельно указана для включения ссылкой в полном объеме. В то время как изобретение было описано в связи с его конкретными воплощениями, следует понимать, что возможны дополнительные модификации, и подразумевается, что данная заявка охватывает любые вариации, применения или адаптации изобретения, следующие, в целом, принципам изобретения и включающие такие отклонения от настоящего описания, которые соответствуют известной или обычной практике в данной области, к которой относится изобретение, и которые могут быть применены к существенным признакам, описанным выше в данном документе.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> MacroGenics, Inc.
Johnson, Leslie S. S.
Huang, Ling S.
Reddy Chichili, Gurunadh S.
Shah, Kalpana
Lam, Chia-Ying Kao
Burke, Stephen James
Liu, Liqin
Moore, Paul A.
Bonvini, Ezio
Barat, Bhaswati

<120> Tri-Specific Therapeutic Binding Molecules and Methods of Use
Thereof

<130> 1301.0114PCT

<150> US 62/107,824

<151> 2015-01-26

<150> US 62/008,229

<151> 2014-06-05

<150> US 62/004,571

<151> 2014-05-29

<160> 133

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker 1

<400> 1

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cysteine-Containing Domain ("Linker 2")

<400> 2

Gly Gly Cys Gly Gly
1 5

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> E-Coil Heterodimer-Promoting Domain

<400> 3

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 4
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> K-Coil Heterodimer-Promoting Domain

<400> 4

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cysteine-Containing Linker Peptide ("Linker 3")

<400> 5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 6
<211> 219
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(218)
<223> Human Wild-Type IgG CH2-CH3 Domain

<400> 6

Ala Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

20

25

30

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
35 40 45

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
50 55 60

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
65 70 75 80

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
85 90 95

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
100 105 110

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
115 120 125

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
130 135 140

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
145 150 155 160

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
165 170 175

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
180 185 190

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
195 200 205

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 7

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "Knob-Bearing" CH2-CH3 Domain

<400> 7

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 8

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "Hole-Bearing" IgG CH2-CH3 Domain

<400> 8

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

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

<210> 9
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(98)

<223> Human IgG1 CH1 Domain

<400> 9

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> Human IgG1 Hinge Domain

<400> 10

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> Cysteine-Containing Portion of Human CL Domain

<400> 11

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(6)
<223> Cysteine-Containing Portion of Human IgG Hinge Domain

<400> 12

Val Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> Human IgG1 CL Kappa Domain

<400> 13

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 14
<211> 104
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(104)
<223> Human IgG1 CL Lambda2 Domain

<400> 14

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
50 55 60

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
65 70 75 80

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
85 90 95

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 15

Ala Pro Ser Ser Ser
1 5

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 16

Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Glu
1 5

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> OKT3 Anti-CD3 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 17

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
100 105

<210> 18
<211> 192
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(192)
<223> OKT3 Anti-CD3 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 18

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

<210> 19
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> M291 Anti-CD3 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 19

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Thr Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Asp Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> M291 Anti-CD3 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 20

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr His Tyr Asn Gln Lys Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Ser Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 21
<211> 130
<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(130)

<223> YTH12.5 Anti-CD3 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 21

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Pro Asn Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Leu Gly Ser Thr Val Lys Leu Ser Cys Thr Leu Ser Ser Gly Asn Ile
35 40 45

Glu Asn Asn Tyr Val His Trp Tyr Gln Leu Tyr Glu Gly Arg Ser Pro
50 55 60

Thr Thr Met Ile Tyr Asp Asp Asp Lys Arg Pro Asp Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Arg Ser Ser Asn Ser Ala Phe Leu Thr
85 90 95

Ile His Asn Val Ala Ile Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys His Ser
100 105 110

Tyr Val Ser Ser Phe Asn Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val
115 120 125

Leu Arg
130

<210> 22

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(138)

<223> YTH12.5 Anti-CD3 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 22

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Phe Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Thr Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 23

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-CD3 "mAb 1" Light Chain Variable Domain Variant 1

<400> 23

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 24
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Anti-CD3 "mAb 1" Light Chain Variable Domain Variant 2
<400> 24

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Arg Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Anti-CD3 "mAb 1" Heavy Chain Variable Domain
<400> 25

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Ser
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Ala Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ser Pro Gln Val His Tyr Asp Tyr Asn Gly Phe Pro Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-CD3 "mAb 2" Light Chain Variable Domain

<400> 26

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-CD3 "mAb 2" Heavy Chain Variable Domain

<400> 27

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 28

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-CD3 "mAb 2" Heavy Chain Variable Domain D65G Variant

<400> 28

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> OKT8 Anti-CD8 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 29

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

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

Asp Asn Ser Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Val Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> OKT8 Anti-CD8 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 30

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Asn Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Gly Gly Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ser Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 31
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> TRX2 Anti-CD8 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 31

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Ile Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

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

<210> 32
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> TRX2 Anti-CD8 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 32

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

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

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe 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 Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)
<223> A32 Anti-HIV gp120 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 33

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Ile Ile Ser Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

His Asn Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 34
<211> 123
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(123)
<223> A32 Anti-HIV gp120 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 34

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

Thr Leu Ser Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ser Ser Ser Gly
20 25 30

Ala His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Gln His Thr Ser Glu Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Val Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Arg Thr Leu Arg Asn Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(113)
<223> 7B2 Anti-HIV gp41 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 35

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

Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Arg His Ser Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Trp Ala Ser Met Arg Leu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Asn Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Ser Ser His Pro Pro Thr Phe Gly His Gly Thr Arg Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 36

<211> 126
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(126)
<223> 7B2 Anti-HIV gp41 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 36

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Phe Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ala Tyr Ile Ser Lys Asn Gly Glu Tyr Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Ser
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Phe Ser Glu Leu Leu Gln Tyr Ile
100 105 110

Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Ala Arg Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 37
<211> 106
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(106)
<223> Palivizumab Anti-RSV Glycoprotein F Antibody Light Chain Variable
Domain

<400> 37

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

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

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

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 38
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> Palivizumab Anti-RSV Glycoprotein F Antibody Heavy Chain Variable
Domain

<400> 38

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

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

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Asp Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> "BRCA84D-5VL" Humanized Anti-B7-H3 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 39

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr 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 Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85 90 95

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

<210> 40
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> "BRCA84D-2VH" Humanized Anti-B7-H3 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 40

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "BRCA69D" Humanized Anti-B7-H3 Antibody Light Chain Variable
Domain

<400> 41

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

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

<210> 42

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "BRCA69D" Humanized Anti-B7-H3 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 42

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "PRCA157" Humanized Anti-B7-H3 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 43

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Ser Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro
85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 44

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> "PRCA157" Humanized Anti-B7-H3 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 44

Glu Val Gln Gln Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu
50 55 60

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-A33 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 45

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Ile Ser Phe Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
100 105

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-A33 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 46

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Glu Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ile Tyr Gly Asn Asn Val Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-5T4 Antibody "mAb 1" Light Chain Variable Domain

<400> 47

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp
85 90 95

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

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-5T4 Antibody "mAb 1" Heavy Chain Variable Domain

<400> 48

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Phe
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr Glu Tyr Asn Glu Lys Ala
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-5T4 Antibody "mAb 2" Light Chain Variable Domain

<400> 49

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 50
<211> 127
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Anti-5T4 Antibody "mAb 2" Heavy Chain Variable Domain

<400> 50

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val Val Asp Pro Asn Ser Tyr
100 105 110

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanized Anti-ROR1 mAb 1 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 51

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 52

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized Anti-ROR1 mAb 1 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 52

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

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

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

Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala Leu Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> 2A2 Anti-ROR1 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 53

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Ile Met Ser Thr Thr Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 54
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(118)
<223> 2A2 Anti-ROR1 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 54

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

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Ile Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Thr Gly Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ser Phe Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 55
<211> 110
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(110)
<223> R11 Anti-ROR1 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 55

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Thr Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Arg Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Arg
65 70 75 80

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

Tyr Arg Thr Ser Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 56
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(116)
<223> R11 Anti-ROR1 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 56

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu Val Thr Pro Ala Gly Asn
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Ser Asp Ile Asn Asp Tyr Pro
20 25 30

Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

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

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Tyr
85 90 95

Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Ile Ser Ser
115

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(112)
<223> R12 Anti-ROR1 Antibody Light Chain Variable Domain

<400> 57

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

Pro Ala Lys Ile Thr Cys Thr Leu Ser Ser Ala His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

Ile Asp Trp Tyr Gln Gln Leu Gln Gly Glu Ala Pro Arg Tyr Leu Met
35 40 45

Gln Val Gln Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Lys Arg Pro Gly Val Pro Asp

50

55

60

Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ile Ile Pro
65 70 75 80

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

Ile Gly Gly Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Thr Gly
100 105 110

<210> 58
<211> 121
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(121)
<223> R12 Anti-ROR1 Antibody Heavy Chain Variable Domain

<400> 58

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

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

Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Thr Trp Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Gly Ala Leu Phe Asn Ile Trp Gly
100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 59
<211> 504
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD3 mAb 2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 59

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 60

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(B7-H3
mAb 1)-K-Coil)

<400> 60

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
165 170 175

Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
210 215 220

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 61

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 61

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

370

375

380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 62

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 62

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 63

<211> 504

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 63

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 64
<211> 272
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(B7-H3
mAb 1)-K-Coil)

<400> 64

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr
165 170 175

Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr
210 215 220

Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly
225 230 235 240

Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 65

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 2)

<400> 65

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

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

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe 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 Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 66
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 2)

<400> 66

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

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

<210> 67
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> First Polypeptide Chain of Exemplary CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 /
 B7-H3 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(CD8
 mAb 1)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 67

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 68
<211> 270
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 /
B7-H3 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (VL(CD8 mAb 1)-VH(CD3
mAb 2)-K-Coil)

<400> 68

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr
165 170 175

Leu Tyr Ala Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp
210 215 220

His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 69

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 /
B7-H3 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule Heavy Chain B7-H3 mAb
1)

<400> 69

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 70

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 /
B7-H3 mAb 1 Tri-Specific Binding Molecule (Light Chain B7-H3 mAb
1)

<400> 70

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 71

<211> 499

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 / CD3
mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (VL(B7-H3 mAb 1)-VH(CD8 mAb
1)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 71

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 130 135 140

Thr Ser Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Met Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr
 165 170

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 180 185 190

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val
 195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Ile Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val
 210 215 220

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu
 245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly
 260 265 270

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 275 280 285

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys

<210> 72

<211> 267

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 /
CD3 mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (VL(CD8 mAb 1)-VH(B7-H3
mAb1)-K-Coil)

<400> 72

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
130 135 140

Lys Asp Thr Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Asp Asn Thr Leu Tyr Ala
165 170 175

Ser Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
180 185 190

Thr Ala Tyr Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val
195 200 205

Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly
210 215 220

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys
225 230 235 240

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 73

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 / CD3
mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD3 mAb 2)

<400> 73

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

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

20

25

30

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

275

280

285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 74

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary B7-H3 mAb 1/ CD8 mAb 1 /
CD3 mAb 2 Tri-Specific Binding Molecule (Light Chain CD3 mAb 2)

<400> 74

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Arg Thr
100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 75

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(5T4 mAb 2)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 75

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
 115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
 130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
 165 170 175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
 210 215 220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu
 245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys
275 280 285

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
290 295 300

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
305 310 315 320

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
325 330 335

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
340 345 350

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
355 360 365

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
370 375 380

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
385 390 400

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
420 425 430

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
435 440 445

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
450 455 460

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
465 470 475 480

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
485 490 495

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 76

<211> 279

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb
2)-K-Coil)

<400> 76

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala
165 170 175

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr
180 185 190

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
195 200 205

Ser Ala Val Tyr Asn Cys Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val
210 215 220

Val Asp Pro Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 77

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 77

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 78

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 78

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 79

<211> 509

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (VL(5T4 mAb 2)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 79

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly
115 120 125

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala
130 135 140

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala
 145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn
 165 170 175

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe
 210 215 220

Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu
 245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys
 275 280 285

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 290 295 300

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 305 310 315 320

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 325 330 335

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 340 345 350

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 355 360 365

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 370 375 380

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 385 390 395 400

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
420 425 430

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
435 440 445

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
450 455 460

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
465 470 475 480

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
485 490 495

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 80

<211> 279

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb
2)-K-Coil)

<400> 80

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu
115 120 125

Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Thr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Ala
165 170 175

Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr
180 185 190

Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
195 200 205

Ser Ala Val Tyr Asn Cys Ala Arg Tyr Gly Pro Leu Phe Thr Thr Val
210 215 220

Val Asp Pro Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu
245 250 255

Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 81

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 2)

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe

20

25

30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe 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 Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275

280

285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 82

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 2)

<400> 82

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Ile Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 83

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(ROR1 mAb 1)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 83

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr
 20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
 145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
 165 170 175

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
 210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala
 245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr
275 280 285

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
290 295 300

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
305 310 315

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
325 330 335

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
340 345 350

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
355 360 365

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
370 375 380

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
385 390 395 400

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
405 410 415

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
420 425 430

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
435 440 445

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
450 455 460

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
465 470 475 480

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
485 490 495

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 84
<211> 273

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(ROR1
mAb 1)-K-Coil)

<400> 84

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala
210 215 220

Leu Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

<210> 85

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 85

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 86

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 86

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 87

<211> 510

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (VL(ROR1 mAb 1)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 87

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

Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr
20 25 30

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

Lys Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr Asn Lys Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu Phe Gly Gly Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
165 170 175

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
195 200 205

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala
245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
260 265 270

Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr
275 280 285

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
290 295 300

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
305 310 315 320

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
325 330 335

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
340 345 350

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
355 360 365

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
370 375 380

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
385 390 395 400

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
405 410 415

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
420 425 430

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
435 440 445

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
450 455 460

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
465 470 475 480

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
485 490 495

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510

<210> 88

<211> 273

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(ROR1
mAb 1)-K-Coil)

<400> 88

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Glu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr
165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala
210 215 220

Leu Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly
225 230 235 240

Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala
245 250 255

Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys
260 265 270

Glu

<210> 89

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 2)

<400> 89

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe

20

25

30

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

Ala Leu Ile Tyr Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Phe 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 Lys Pro His Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275

280

285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 90

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 /
CD8 mAb 2 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 2)

<400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Gly Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Asn Thr Asp Ile Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Tyr Gln Tyr Asn Asn Gly Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 91
<211> 509
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(HIV mAb 1)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 91

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

Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Asn Arg His Ser Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Trp Ala Ser Met Arg Leu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Ile Asn Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Ser Ser His Pro Pro Thr Phe Gly His Gly Thr Arg Val Glu Ile
 100 105 110

Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser
 115 120 125

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala
 130 135 140

Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln
 145 150 155 160

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr
 165 170 175

Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 180 185 190

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 195 200 205

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn
 210 215 220

Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225 230 235 240

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys
 245 250 255

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
 260 265 270

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys
275 280 285

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
290 295 300

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
305 310 315 320

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
325 330 335

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
340 345 350

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
355 360 365

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
370 375 380

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
385 390 400

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
405 410 415

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
420 425 430

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
435 440 445

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
450 455 460

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
465 470 475 480

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
485 490 495

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 92
<211> 277

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(HIV mAb
1)-K-Coil)

<400> 92

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Val Phe Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Tyr Ile Ser Lys Asn Gly Glu Tyr Ser
165 170 175

Lys Tyr Ser Pro Ser Ser Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
180 185 190

Ala Lys Asn Ser Val Phe Leu Gln Leu Asp Arg Leu Ser Ala Asp Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Phe Ser
210 215 220

Glu Leu Leu Gln Tyr Ile Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Ala Arg Val
225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
260 265 270

Ala Ala Leu Lys Glu
275

<210> 93

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 93

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 94

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 94

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 95

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(HIV mAb 2)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 95

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

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

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

Ile Ile Ser Glu Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

His Asn Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
130 135 140

Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 165 170 175

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 180 185 190

Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr
 195 200 205

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 210 215 220

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 225 230 235 240

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu
 245 250 255

Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 260 265 270

Ala Leu Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 275 280 285

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 290 295 300

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 305 310 315 320

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 325 330 335

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 340 345 350

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 355 360 365

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 370 375 380

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 385 390 395 400

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
405 410 415

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
420 425 430

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
435 440 445

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
450 455 460

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
465 470 475 480

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
485 490 495

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505

<210> 96

<211> 274

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(HIV mAb
2)-K-Coil)

<400> 96

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly
115 120 125

Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Ser Cys Thr Val Ser Gly
130 135 140

Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ala His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Tyr
145 150 155 160

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Asn
165 170 175

Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Gln His
180 185 190

Thr Ser Glu Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Val Ala
195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Arg Leu Arg Thr Leu
210 215 220

Arg Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
225 230 235 240

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu
260 265 270

Lys Glu

<210> 97

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 97

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20

25

30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 98

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 98

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 99

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light Chain Domain of Anti-Human CD3 mAb 2 Low

<400> 99

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 100
 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Variable Heavy Chain Domain of Anti-Human CD3 mAb 2 Low

<400> 100

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Thr Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 101
 <211> 110

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Light Chain Domain of Anti-Human CD3 mAb 2 Fast

<400> 101

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 102
<211> 125
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variable Heavy Chain Domain of Anti-Human CD3 mAb 2 Fast

<400> 102

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

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

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

Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Val Arg His Lys Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Thr Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 103
<211> 504
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> First Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3 mAb
2)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 103

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala
 245 250 255

Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu
 260 265 270

Glu Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 275 280 285

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 290 295 300

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 305 310 315 320

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 325 330 335

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 340 345 350

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 355 360 365

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 370 375 380

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 385 390 395 400

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 405 410 415

Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
420 425 430

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
435 440 445

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
450 455 460

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
465 470 475 480

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
485 490 495

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 104
<211> 270
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2)-VH(5T4 mAb
1)-K-Coil)

<400> 104

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr
165 170 175

Glu Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265 270

<210> 105
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 105

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 106
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8
mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 106

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 107

<211> 503

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3
mAb 2 Low)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 107

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220

Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
 245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 108
<211> 269
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2
Low)-VH(5T4 mAb 1)-K-Coil)

<400> 108

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
 35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr
 165 170 175

Glu Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys
 180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp
 210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
 245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 109
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 109

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 110

<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb 1)

<400> 110

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 111
<211> 503
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> First Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(5T4 mAb 1)-VH(CD3
mAb 2 Fast)-E-Coil-(CH2-CH3))

<400> 111

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asp Phe Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
130 135 140

Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
145 150 155 160

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
165 170 175

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
180 185 190

Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
195 200 205

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Lys Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 210 215 220

Thr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 225 230 235 240

Ala Ser Thr Lys Gly Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala
 245 250 255

Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu
 260 265 270

Lys Gly Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 275 280 285

Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 290 295 300

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 305 310 315 320

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 325 330 335

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 340 345 350

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 355 360 365

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 370 375 380

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 385 390 395 400

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
 405 410 415

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 420 425 430

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 435 440 445

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 450 455 460

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
465 470 475 480

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
485 490 495

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500

<210> 112
<211> 269
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Second Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast
/ CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (VL(CD3 mAb 2
Fast)-VH(5T4 mAb 1)-K-Coil)

<400> 112

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
20 25 30

Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly
35 40 45

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly
100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
115 120 125

Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
130 135 140

Tyr Thr Phe Thr Ser Phe Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
145 150 155 160

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg Ile Asp Pro Asn Arg Gly Gly Thr
165 170 175

Glu Tyr Asn Glu Lys Ala Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys
180 185 190

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asn Pro Tyr Tyr Pro Met Asp
210 215 220

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
260 265

<210> 113
<211> 448
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Third Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast /
CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Heavy Chain CD8 mAb 1)

<400> 113

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Ile His Phe Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met His Leu Cys Ser Leu Thr Ser Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Tyr Tyr Val Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 114

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fourth Polypeptide Chain of Exemplary 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast
/ CD8 mAb 1 Tri--Specific Binding Molecule (Light Chain CD8 mAb
1)

<400> 114

Asp Val Gln Ile Asn Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Thr Ser Arg Ser Ile Ser Gln Tyr
20 25 30

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

Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Asn Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 115
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cysteine-Containing E-Coil Heterodimer-Promoting Domain

<400> 115

Glu Val Ala Ala Cys Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys
20 25

<210> 116
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cysteine-Containing K-Coil Heterodimer-Promoting Domain

<400> 116

Lys Val Ala Ala Cys Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val
1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu
20 25

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-ROR1 mAb 1 Light Chain Variable Domain CDRL1

<400> 117

Thr Leu Ser Ser Gly His Lys Thr Asp Thr Ile Asp
1 5 10

<210> 118
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-ROR1 mAb 1 Light Chain Variable Domain CDRL2

<400> 118

Leu Glu Gly Ser Gly Ser Tyr
1 5

<210> 119
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-ROR1 mAb 1 Light Chain Variable Domain CDRL3

<400> 119

Gly Thr Asp Tyr Pro Gly Asn Tyr Leu
1 5

<210> 120
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-ROR1 mAb 1 Heavy Chain Variable Domain CDRH1

<400> 120

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 121
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Anti-ROR1 mAb 1 Heavy Chain Variable Domain CDRH2

<400> 121

Thr Ile Tyr Pro Ser Ser Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 122

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-ROR1 mAb 1 Heavy Chain Variable Domain CDRH3

<400> 122

Asp Ser Tyr Ala Asp Asp Ala Ala Leu Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 123

<211> 46

<212> PRT

<213> Streptococcus dysgalactiae

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(46)

<223> Albumin-Binding Domain 3 (ABD3) of Protein G of Streptococcus
Strain G148

<400> 123

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asp Asn Ala Lys Ser Ala Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 124

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant Deimmunized Albumin-Binding Domain 3 (ABD3) of Protein G
of Streptococcus Strain G148

<400> 124

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Ala Ala Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 125
<211> 46
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Variant Deimmunized Albumin-Binding Domain 3 (ABD3) of Protein G
of Streptococcus Strain G148

<400> 125

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Ser Asn Ala Lys Ser Val Glu
20 25 30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Ala Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

<210> 126
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Peptide Linker

<400> 126

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 127
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cysteine-Containing Domain

<400> 127

Ala Glu Pro Lys Ser Cys
1 5

<210> 128
<211> 7
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cysteine-Containing Variant of Portion of Human CL Domain

<400> 128

Gly Phe Asn Arg Gly Glu Cys
1 5

<210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative Cysteine-Containing Linker Peptide ("Linker 3")

<400> 129

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 130

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Alternative Cysteine-Containing Linker Peptide ("Linker 3")

<400> 130

Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 131

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Linker

<400> 131

Ala Ser Thr Lys Gly
1 5

<210> 132

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide Linker

<400> 132

Leu Glu Pro Lys Ser Ser

1

5

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variant of Cysteine-Containing Portion of Human IgG Hinge Domain

<400> 133

Gly Val Glu Pro Lys Ser Cys

1

5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Триспецифичная связывающая молекула, способная иммуноспецифично связываться с тремя различными эпитопами, где указанная связывающая молекула содержит четыре различные полипептидные цепи, образующие вместе ковалентный комплекс, и содержит:

(I), антигенсвязывающий домен I, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом I, присутствующим на первом антигене, и антигенсвязывающий домен II, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом II, присутствующим на втором антигене, где указанный антигенсвязывающий домен I и указанный антигенсвязывающий домен II, оба относятся к связывающим доменам типа диатела;

(II) антигенсвязывающий домен III, не относящийся к типу диатела, который способен иммуноспецифично связываться с эпитопом III, присутствующим на третьем антигене; и

(III) Fc-домен, который образуется путем ассоциации двух CH₂-CH₃-доменов друг с другом;

где указанные первый, второй и третий антигены представляют собой один и тот же антиген, или независимо могут быть одинаковыми или отличаться от другого из указанных антигенов.

2. Триспецифичная связывающая молекула по п.1, где один из числа эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп клеточного рецептора.

3. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 1-2, где один из числа эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп антигена, ассоциированного с заболеванием.

4. Триспецифичная связывающая молекула по п. 3, где антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой антиген злокачественной опухоли, который развернут на поверхности злокачественной опухолевой клетки.

5. Триспецифичная связывающая молекула по п.3, где указанный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой антиген патогена, который развернут на поверхности патогена или патоген-инфицированной клетки.

6. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 1-5, где указанный Fc-домен способен связываться с Fc-рецептором, развернутым на поверхности клетки.

7. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 3-6, где один из числа эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп CD3, второй из числа эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп CD8, и третий из числа

эпитопа I, эпитопа II или эпитопа III представляет собой эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием, и где антигенсвязывающие домены I, II и III триспецифичной связывающей молекулы опосредуют скоординированное связывание цитотоксической Т-клетки и клетки, экспрессирующей антиген, ассоциированный с заболеванием.

8. Триспецифичная связывающая молекула по п. 7, где указанный CD3, указанный CD8 развернуты на поверхности Т-клетки, и где указанный антиген, ассоциированный с заболеванием, развернут на поверхности злокачественной опухолевой клетки, патогена или патоген-инфицированной клетки, и где указанного иммуноспецифичного связывания достаточно для ко-локализации указанного CD3 и указанного CD8, и указанного антигена, ассоциированного с заболеванием, облегчая тем самым активацию Т-клетки, презентирующей указанный CD8, против клетки, презентирующей указанный антиген, ассоциированный с заболеванием.

9. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 1-8, где указанный связывающий домен III, не относящийся к типу диатела, содержит указанный связывающий домен (VL_{III}/VH_{III}) Fab-типа, который способен иммуноспецифично связываться с указанным эпитопом III, где указанная молекула содержит:

(A) первую полипептидную цепь:

(I) которая содержит в направлении от N-конца к С-концу:

(1) переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, способный связываться с первым из указанных трех эпитопов (VL_I);

(2) переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способный связываться со вторым из указанных трех эпитопов (VH_{II});

(3) (a) первый цистеинсодержащий домен; и домен, способствующий гетеродимеризации; или

(b) цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации;

(5) второй цистеинсодержащий домена; и

(6) CH₂- и CH₃-домены IgG;

или

(II), которая содержит в направлении от N-конца к С-концу:

(1) первый цистеинсодержащий домен;

(2) CH₂- и CH₃-домены IgG;

(3) переменный домен легкой цепи иммуноглобулина, способный связываться с первым из указанных трех эпитопов (VL_I);

(4) переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способный связываться

со вторым из указанных трех эпитопов (VH_{II});

(5) (a) второй цистеинсодержащий домен; и домен, способствующий гетеродимеризации; или

(b) цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации;

(B) вторую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, способный связываться с указанным вторым из указанных трех эпитопов (VL_{II});

(2) вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способный связываться с указанным первым из указанных трех эпитопов (VH_I); и

(3) (a) первый цистеинсодержащий домен; и домен, способствующий гетеродимеризации; или

(b) цистеинсодержащий домен, способствующий гетеродимеризации;

где указанный домен, способствующий гетеродимеризации, указанной второй полипептидной цепи комплементарен указанному домену, способствующему гетеродимеризации, указанной первой полипептидной цепи;

(C) третью полипептидную цепь, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, способный связываться с третьим из указанных трех эпитопов (VH_{III}); и

(2) CH_1 -домен, цистеинсодержащий шарнирный домен, и CH_2 - CH_3 -домен IgG;

и

(D), четвертую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от N-конца к C-концу:

(1) вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина, способный связываться с указанным третьим из указанных трех эпитопов (VL_{III}); и

(2) цистеинсодержащий константный домен легкой цепи (CL);

где:

(i) указанные домены VL_I и VH_I ассоциируют с образованием домена, способного связываться с указанным эпитопом I;

(ii) указанные домены VL_{II} и VH_{II} ассоциируют с образованием домена, способного связываться с указанным эпитопом II;

(iii) указанные домены VL_{III} и VH_{III} ассоциируют с образованием домена, способного связываться с указанным эпитопом III;

(iv) указанный CH_2 - CH_3 -домен указанной первой полипептидной цепи и

указанный CH₂-CH₃-домен указанной третьей полипептидной цепи ассоциируют с образованием Fc-домена;

(v) указанные первая и вторая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом;

(vi) указанные первая и третья полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом;

и

(vii) указанные третья и четвертая полипептидные цепи ковалентно связаны друг с другом.

10. Триспецифичная связывающая молекула по п. 9, где:

(A) указанный домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой E-спираль, и указанный комплементарный домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой K-спираль; или

(B) указанный домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой K-спираль, и указанный комплементарный домен, способствующий гетеродимеризации, представляет собой E-спираль.

11. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 9-10, где:

(A) каждый из указанных CH₂-CH₃-доменов указанной первой и третьей полипептидных цепей имеет последовательность SEQ ID NO: 6, так что Fc-домен, образованный в результате их ассоциации, демонстрирует нормальную FcγR-опосредованную эффекторную функцию; или

(B) каждый из указанных CH₂-CH₃-доменов указанной первой и третьей полипептидных цепей содержит, по меньшей мере, одну аминокислотную замену по отношению к последовательности SEQ ID NO: 6, так что Fc-домен, образованный в результате их ассоциации, демонстрирует измененную FcγR-опосредованную эффекторную функцию.

12. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 9-11, где указанные CH₂-CH₃-домены указанных первой и третьей полипептидных цепей отличаются друг от друга и имеют аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8.

13. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 9-12, где:

(A) указанные эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп CD3, эпитоп CD8, и эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием;

(B) указанные эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно,

эпитоп CD3, эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием, и эпитоп CD8;

(C) указанные эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп CD8, эпитоп CD3, и эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием;

(D) указанные эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп CD8, эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием, и эпитоп CD3;

(E) указанные эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием, эпитоп CD3 и эпитоп CD8;

или

(F) указанные эпитоп I, эпитоп II и эпитоп III представляют собой, соответственно, эпитоп указанного антигена, ассоциированного с заболеванием, эпитоп CD8 и эпитоп CD3;

14. Триспецифичная связывающая молекула по любому из пп. 7-13, где:

(A) указанный эпитоп CD3 представляет собой эпитоп CD3, распознаваемый антителом ОКТ3, M291, YTH12.5, CD3 mAb 1 или CD3 mAb 2; или

(B) указанный эпитоп CD8 представляет собой эпитоп CD8, распознаваемый антителом TRX2 или ОКТ8.

15. Фармацевтическая композиция, которая содержит триспецифичную связывающую молекулу по любому из пп. 7-14 и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

16. Способ лечения онкологического заболевания, который включает введение эффективного количества фармацевтической композиции по п. 15 индивидууму, нуждающемуся в этом, где указанный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой указанный антиген злокачественной опухоли.

17. Способ лечения заболевания, ассоциированного с присутствием патогена, который включает введение эффективного количества фармацевтической композиции по п.15 индивидууму, нуждающемуся в этом, где указанный антиген, ассоциированный с заболеванием, представляет собой антиген патогена.

18. Анти-ROR1 антитело или ROR1-связывающий фрагмент, где указанное антитело содержит:

(A) переменный домен легкой цепи, который содержит CDR_{L1}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 117, CDR_{L2}, имеющий последовательность SEQ ID NO:

118, и CDR_{L3}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 119; и

(B) переменный домен тяжелой цепи, который содержит CDR_{H1}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 120, CDR_{H2}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 121, и CDR_{H3}, имеющий последовательность SEQ ID NO: 122.

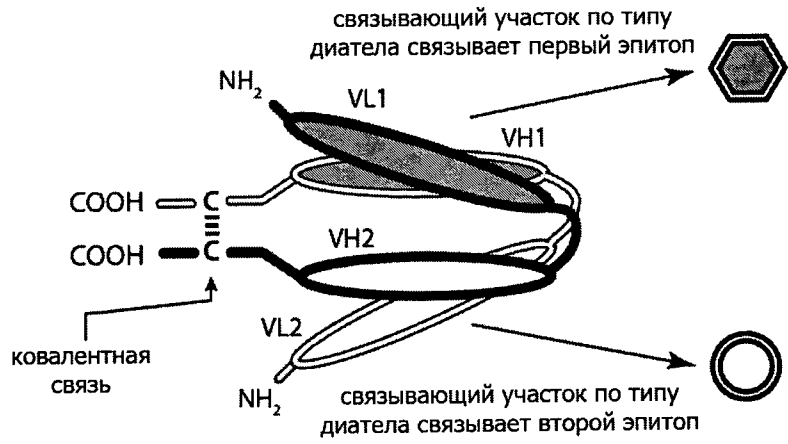
19. Анти-ROR1 антитело или его ROR1-связывающий фрагмент по п.18, где указанное антитело содержит переменный домен легкой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 51.

20. Анти-ROR1 антитело или его ROR1-связывающий фрагмент по любому из пп. 18-19, где указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи, имеющий последовательность SEQ ID NO: 52.

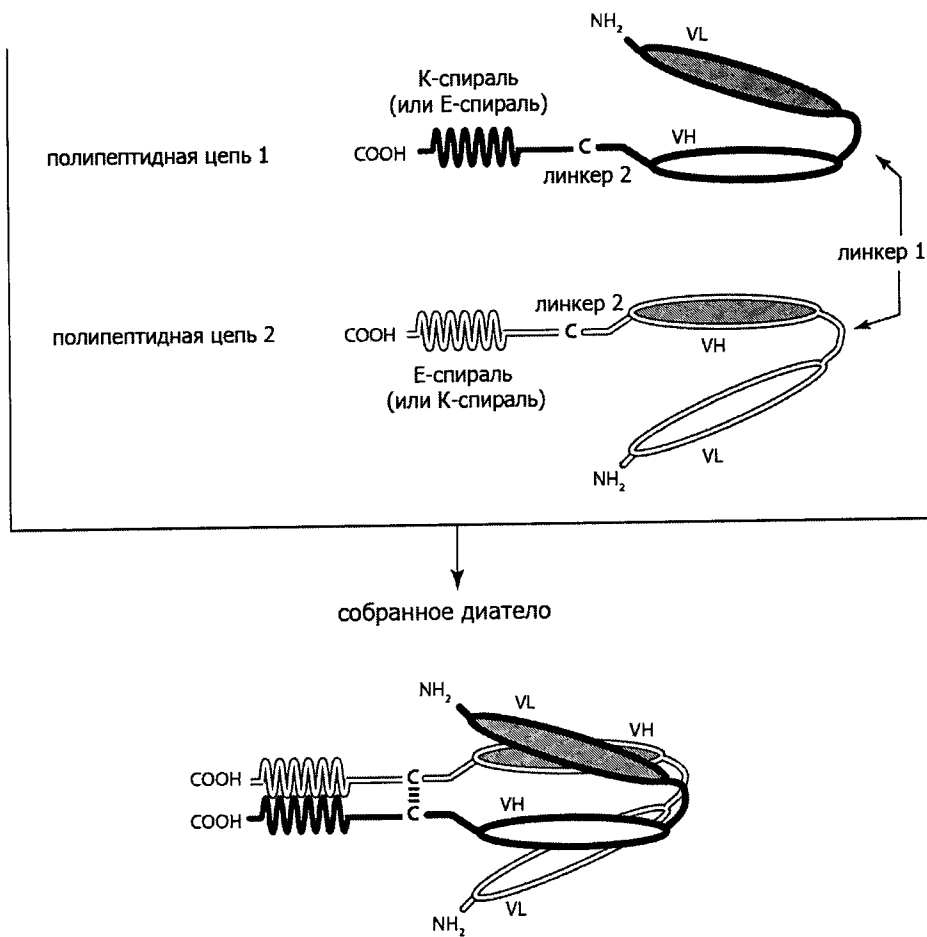
21. Диатело, ViTe или одноцепочечное антитело, которое содержит ROR1-связывающий фрагмент по любому из пп 18-20.

22. Фармацевтическая композиция, которая содержит анти-ROR1 антитело или его ROR1-связывающий фрагмент по любому из пп.19-21 и фармацевтически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель.

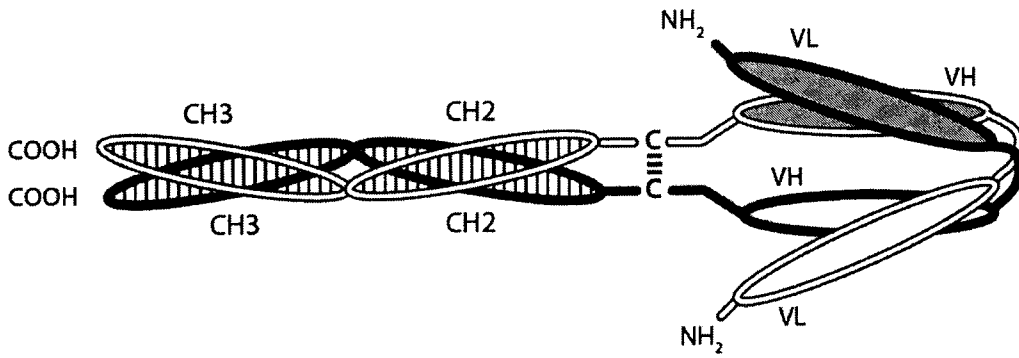
23. Способ лечения онкологического заболевания, который включает введение эффективного количества фармацевтической композиции по п. 22 индивидууму, нуждающемуся в этом.



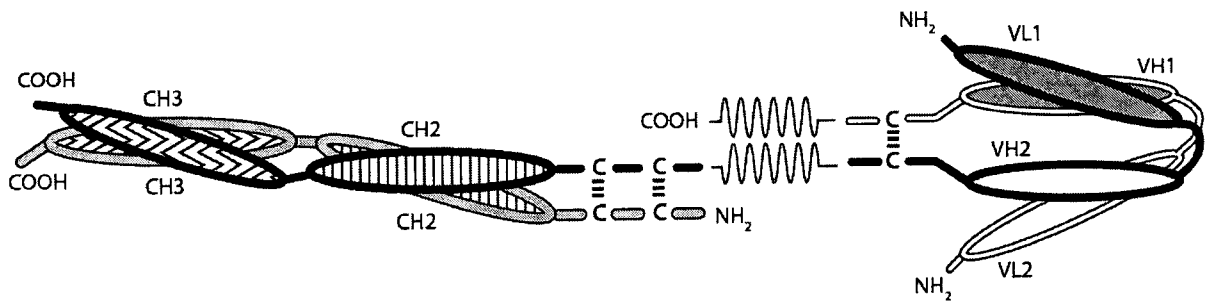
Фиг. 1А



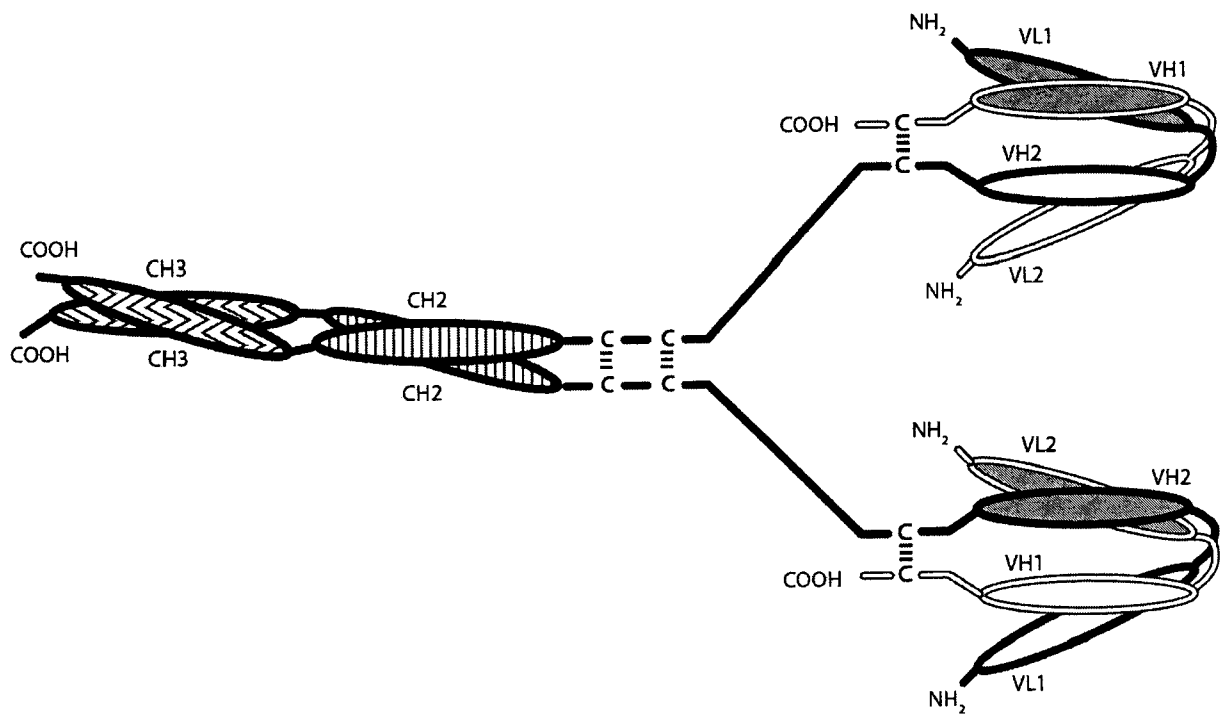
Фиг. 1В



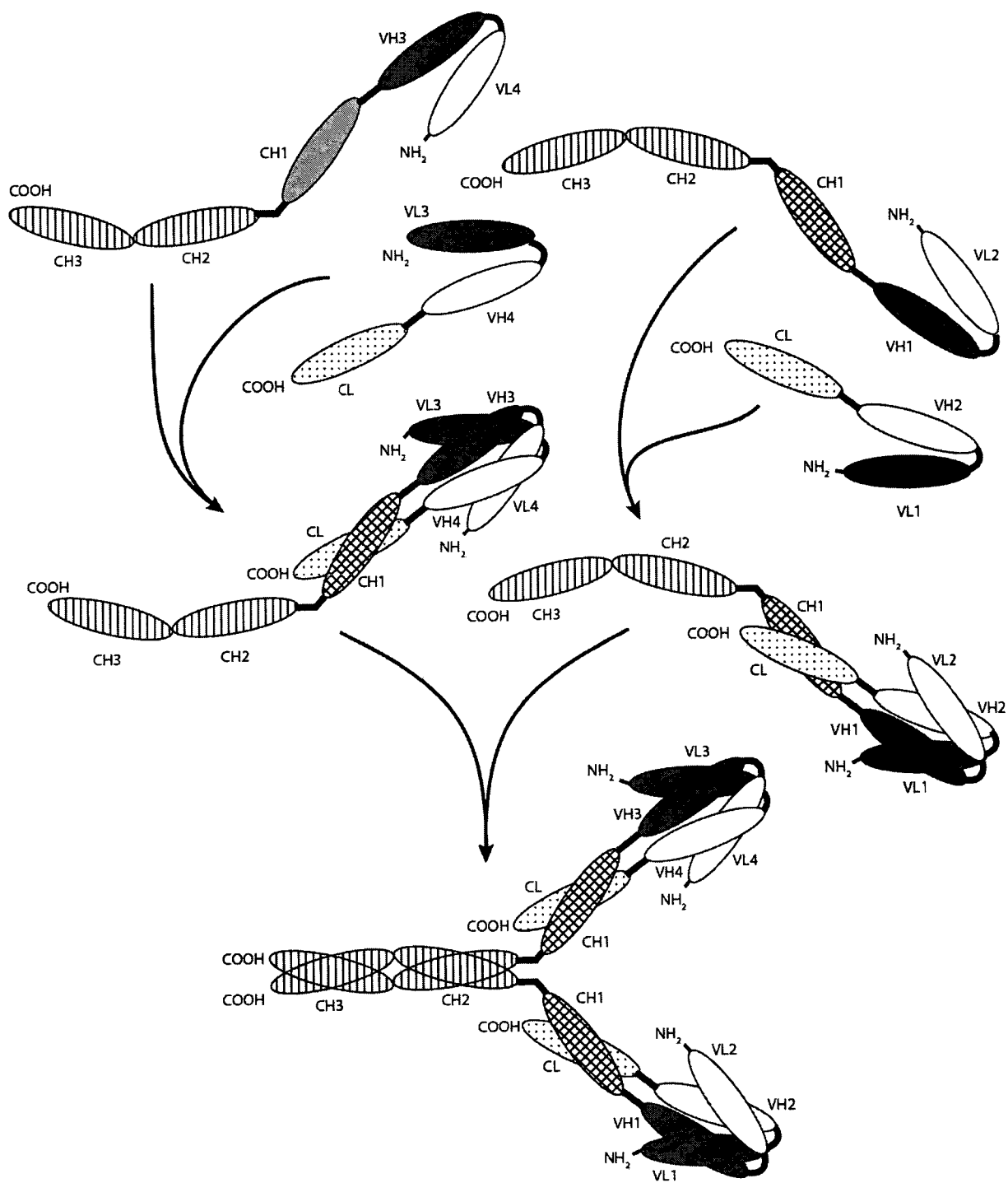
ФИГ. 2А



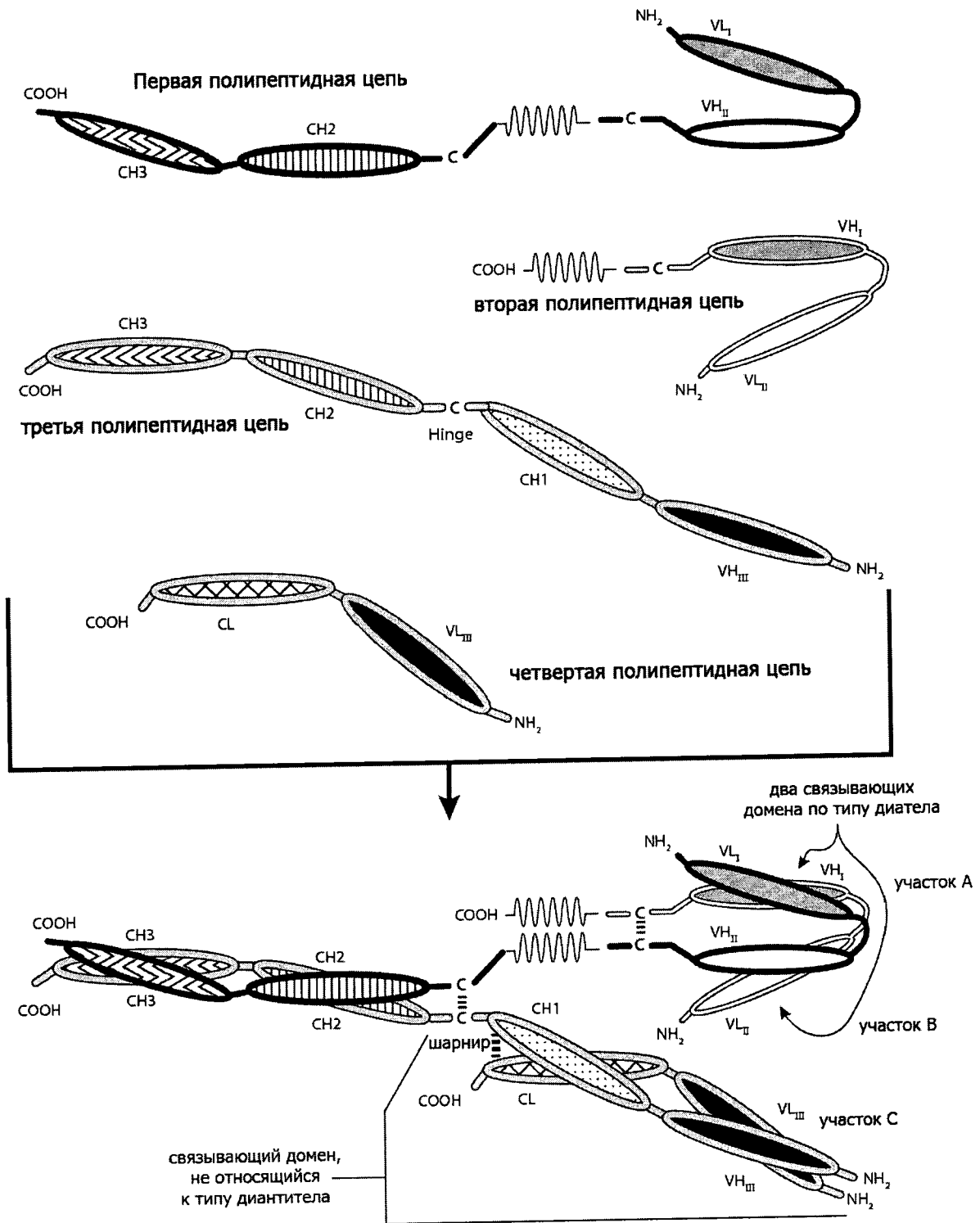
ФИГ. 2В



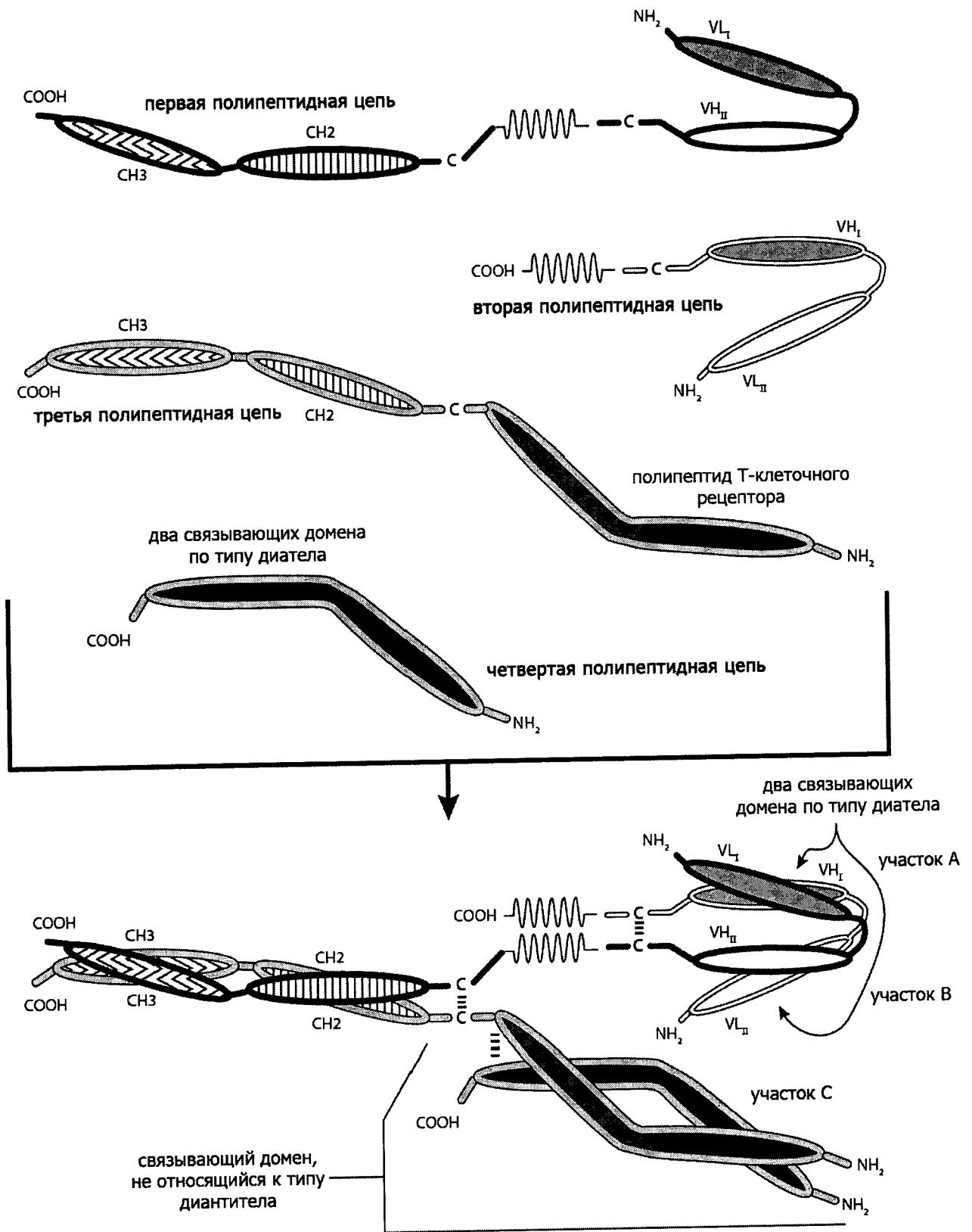
Фиг. 3А



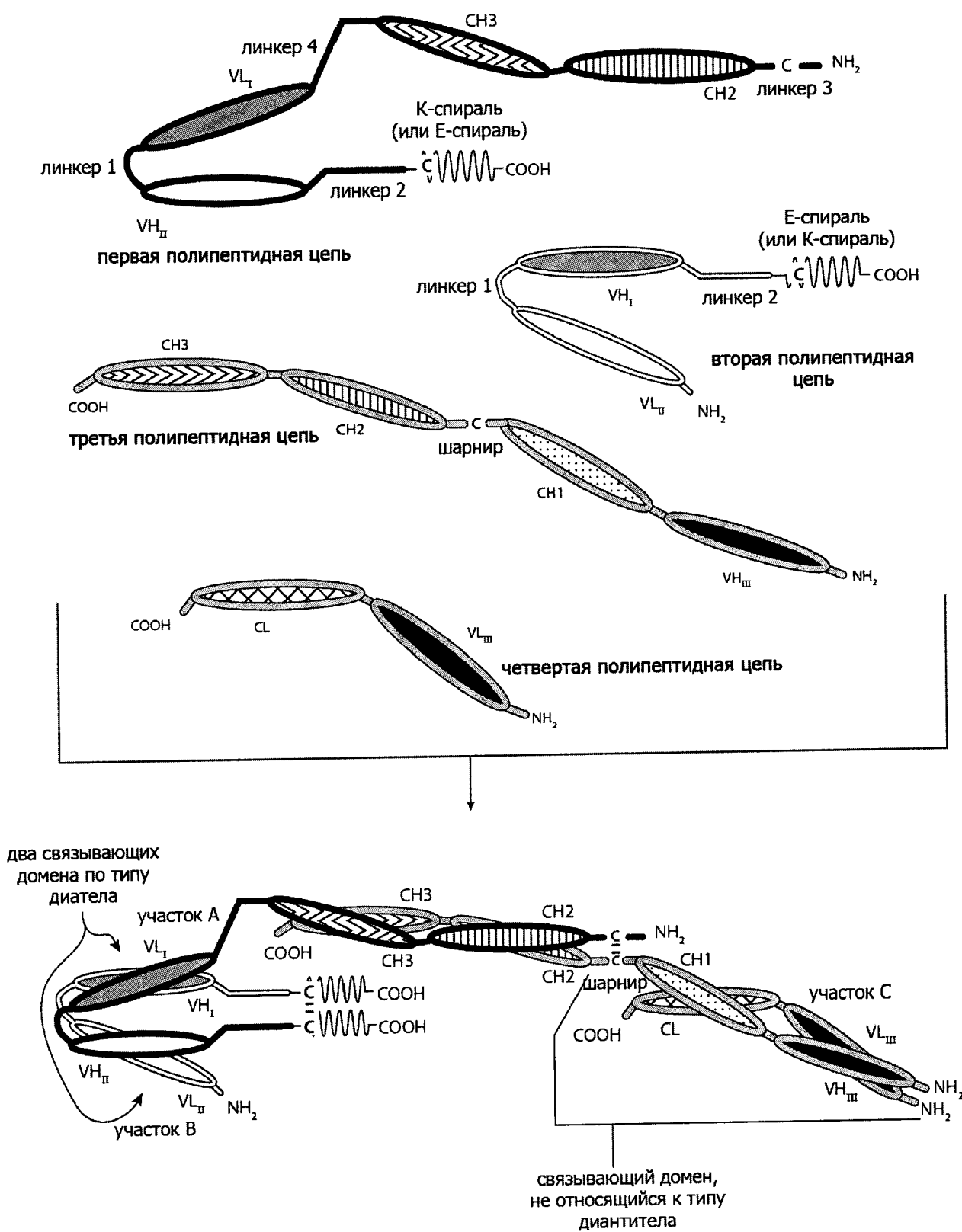
ФИГ. 3С



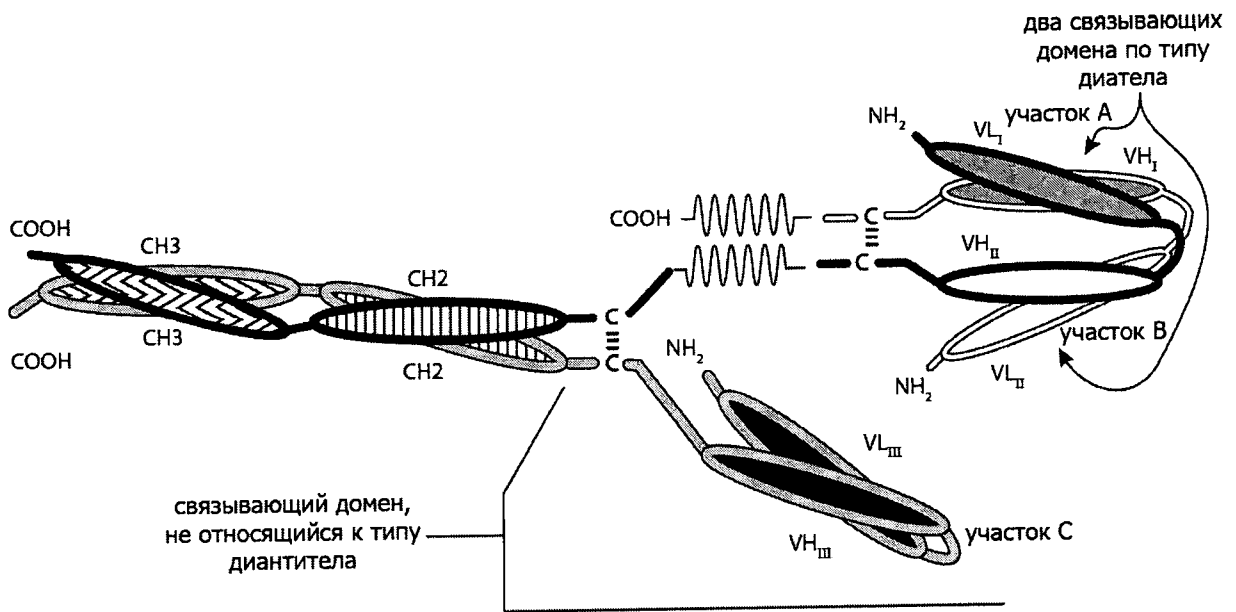
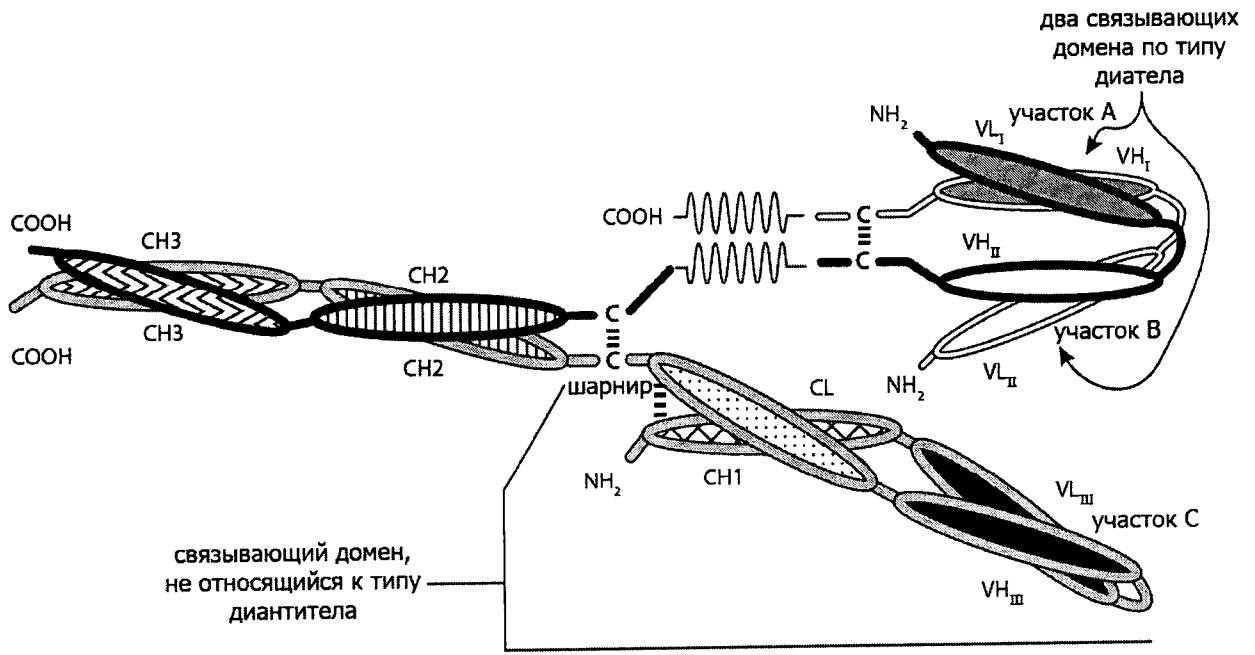
Фиг. 4А



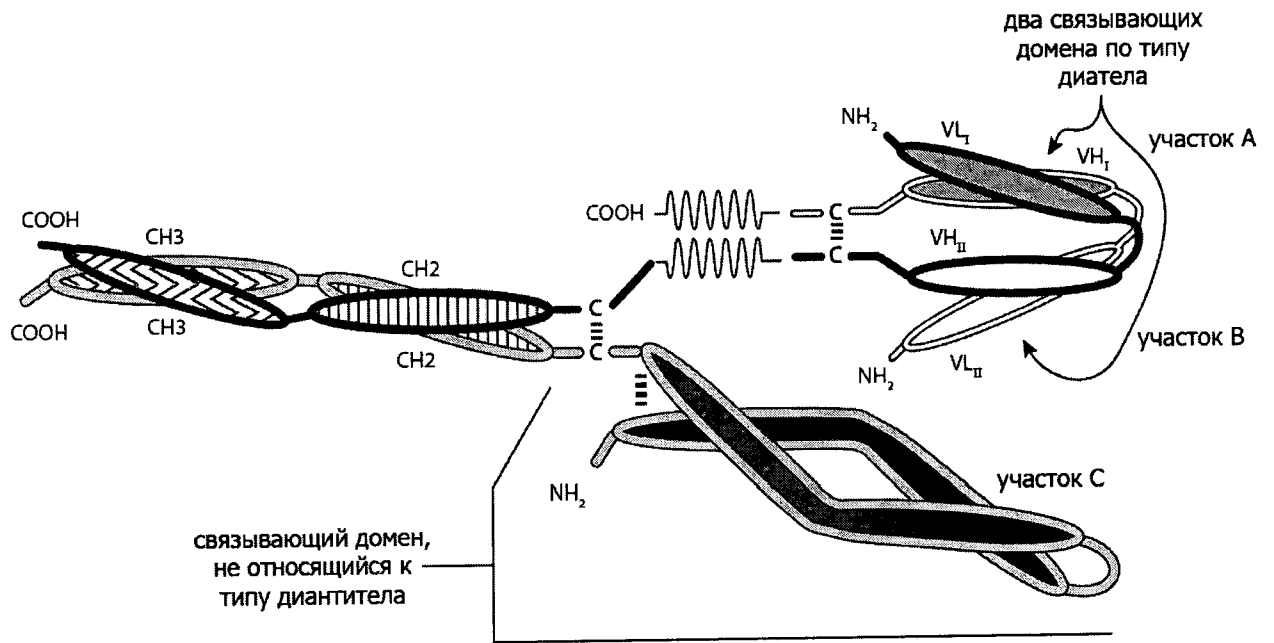
Фиг. 4В



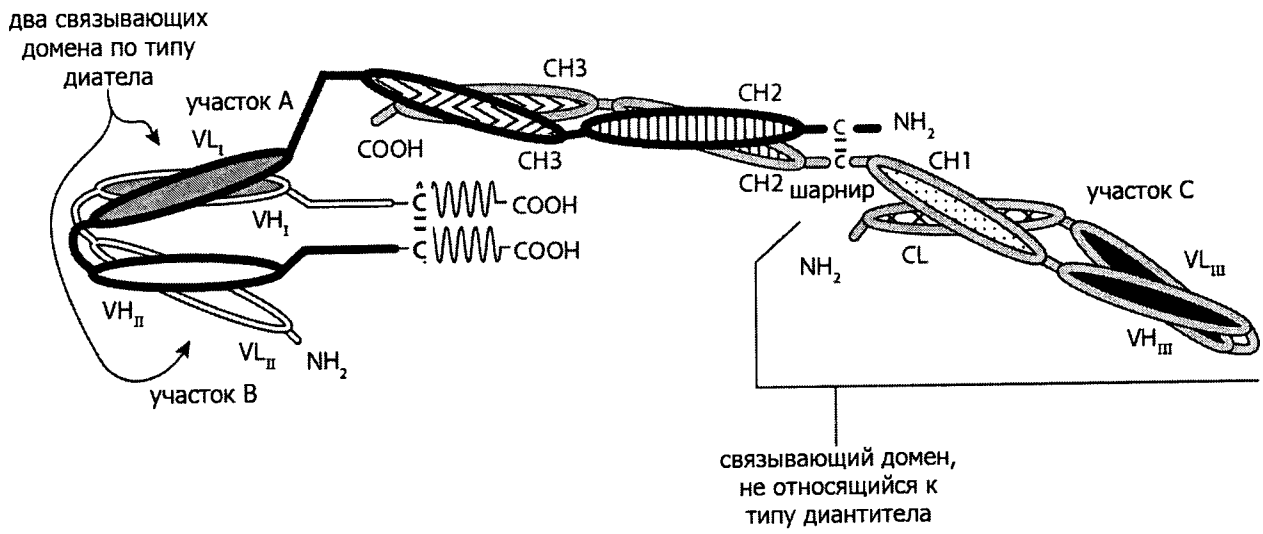
Фиг. 4С



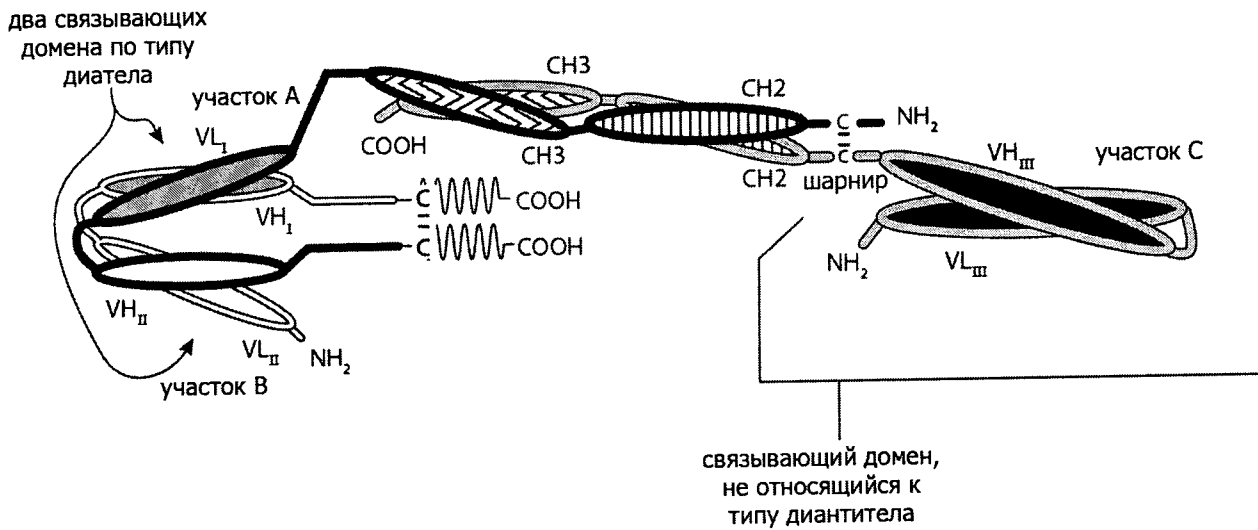
Фиг. 4F



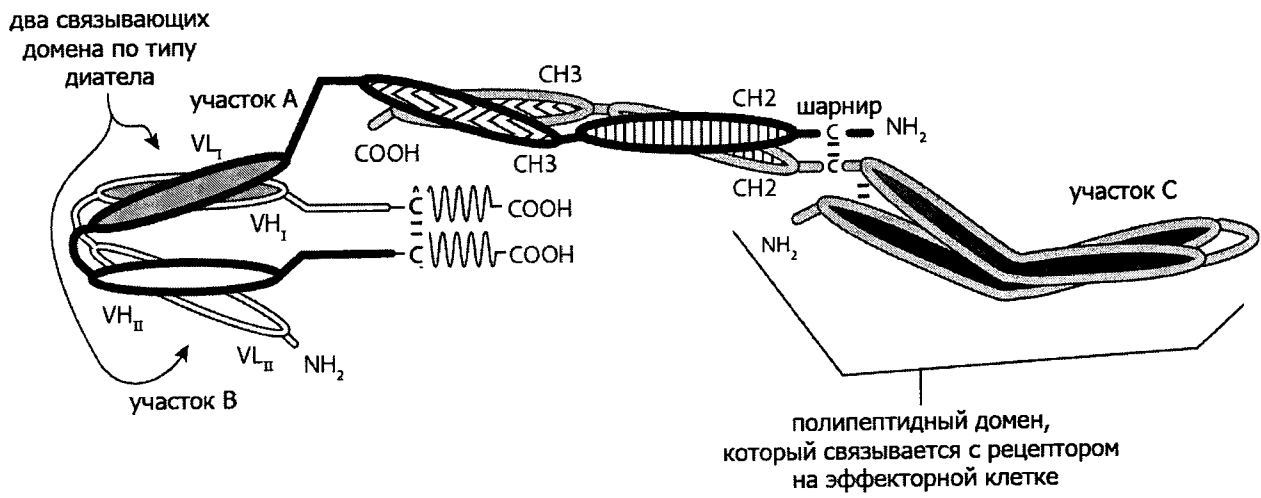
Фиг. 4G



Фиг. 4H

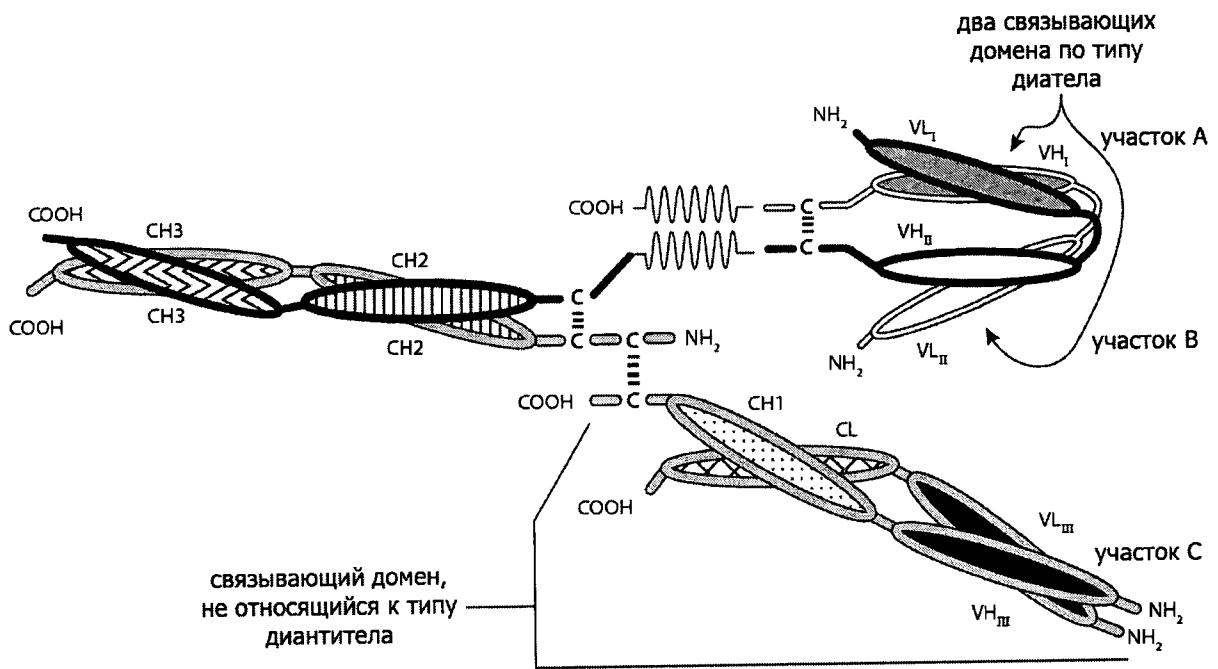


Фиг. 4I

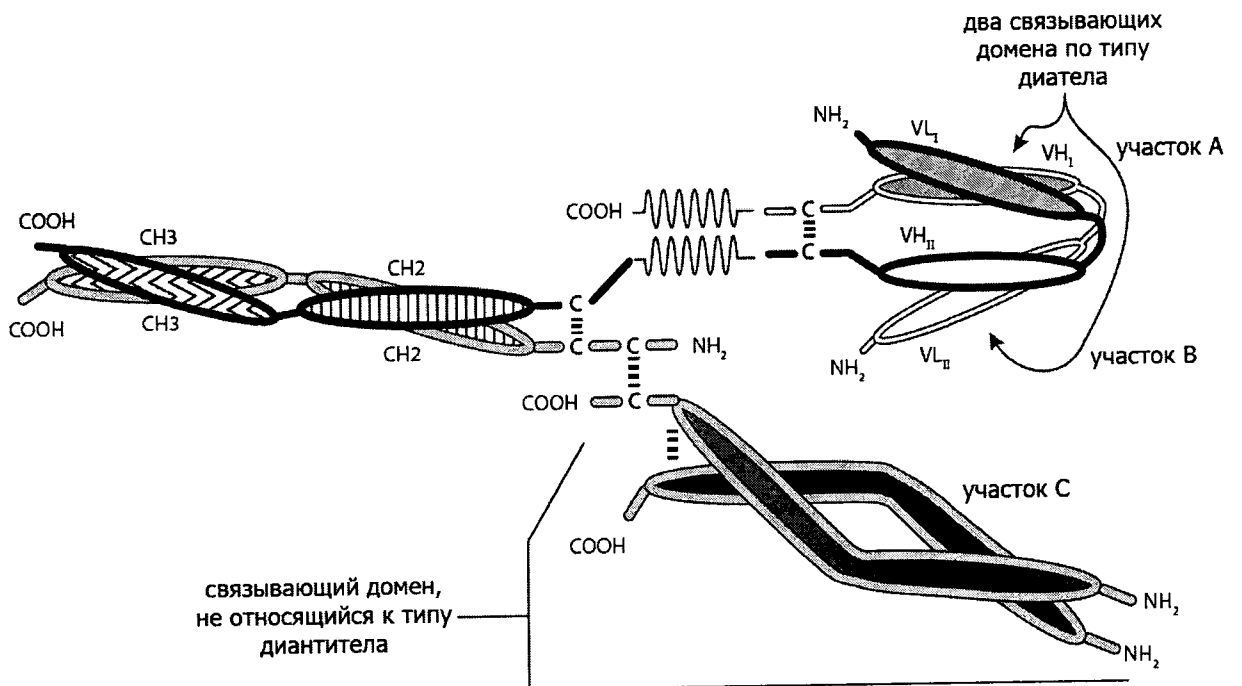


Фиг. 4J

14/62



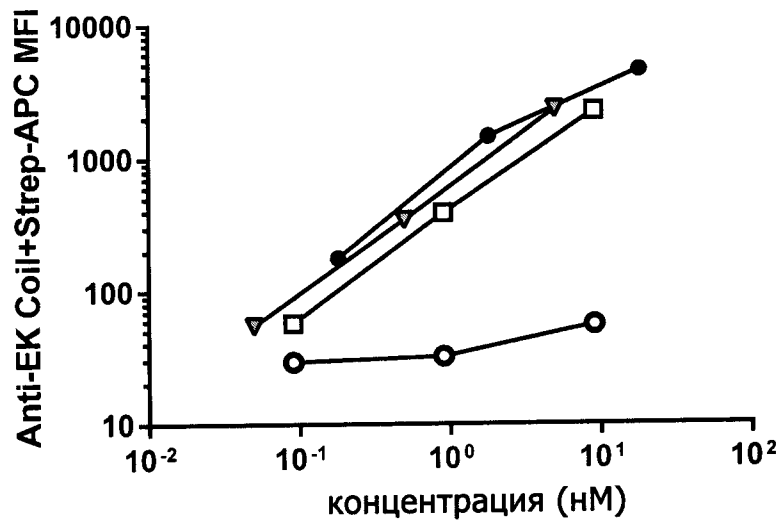
Фиг. 4К



Фиг. 4L

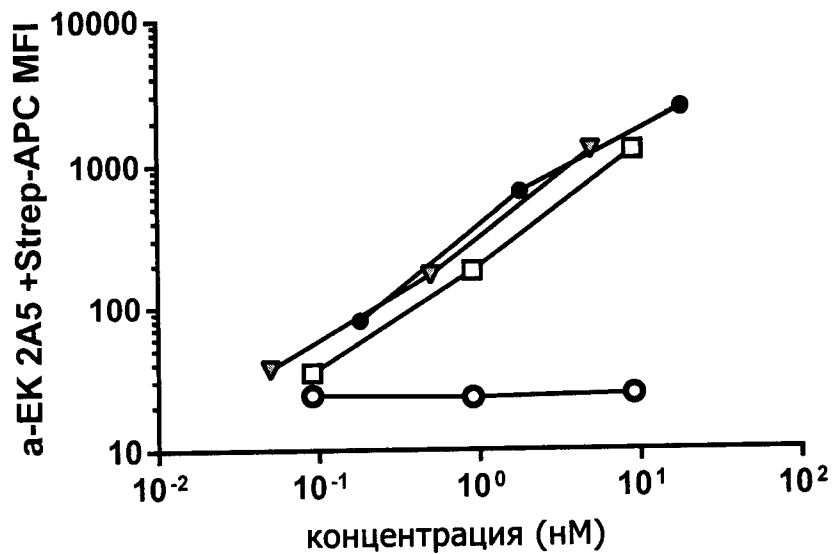
15/62

A498 связывание



Фиг. 5А

JIMT-1 клон 4 связывание

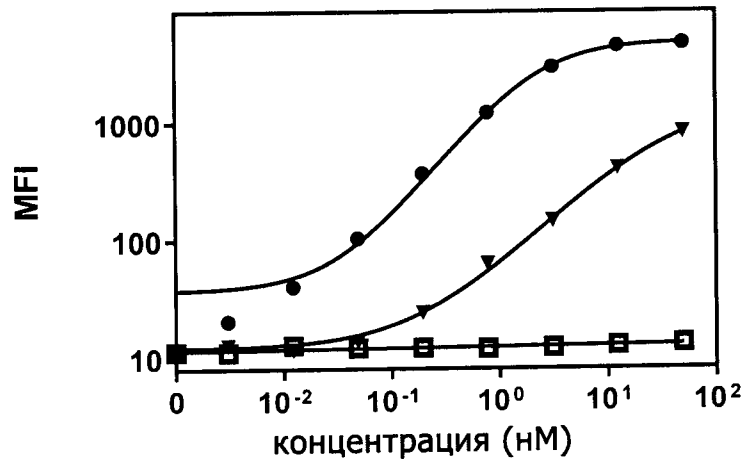


Фиг. 5В

- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▼ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- Флуоресцеин mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом

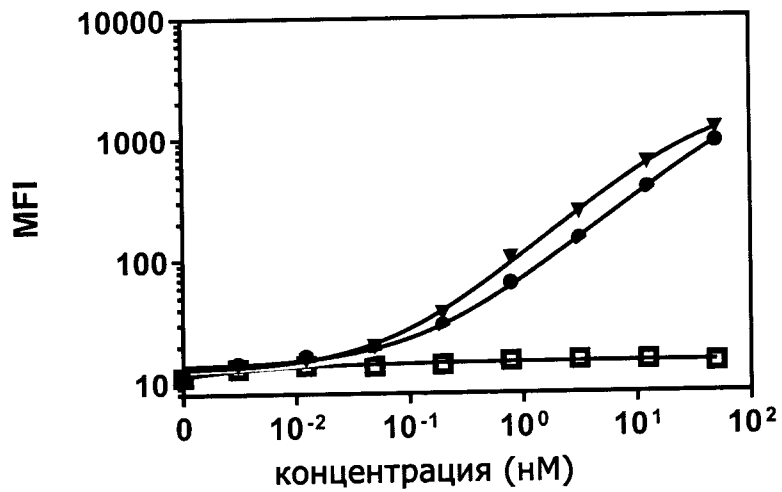
16/62

человеческие РВМС-клетки, селектированные по CD5+/CD4- в тесте связывания с анти-Fc человека



Фиг. 5С

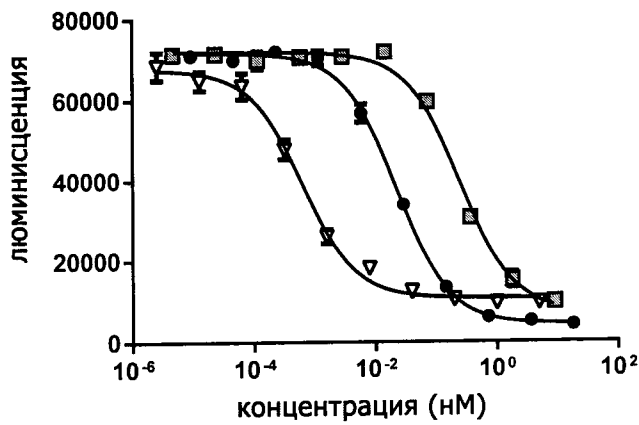
человеческие РВМС-клетки, селектированные по CD5+/CD4+ в тесте связывания с анти-Fc человека



Фиг. 5D

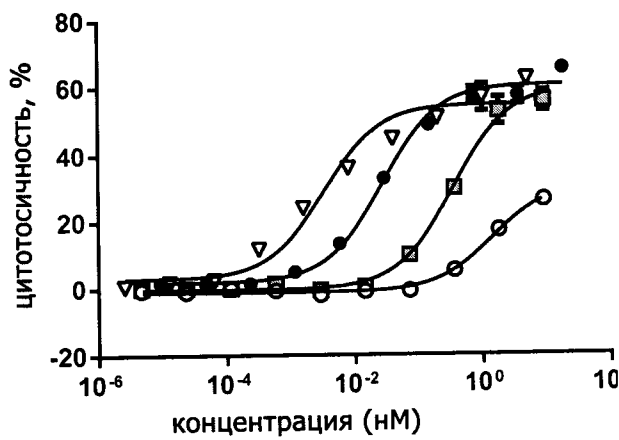
- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом

17/62



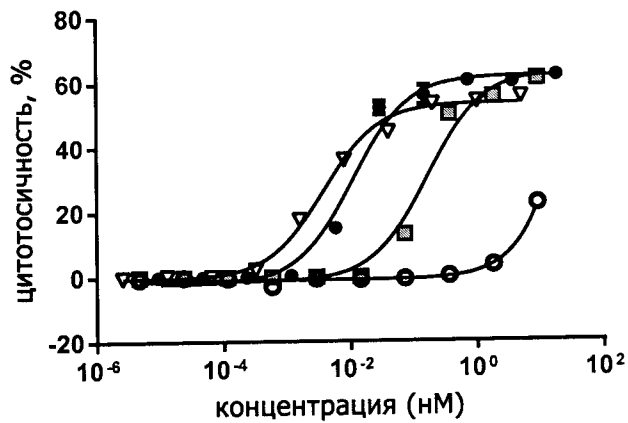
JIMT-1 клон 4 (20к) + Т-клетки
люциферазный
анализ
24 h E:T 10:1

Фиг. 6А



JIMT-1 клон 4 (20к) + Т-клетки
LDH-анализ
24 h E:T 10:1

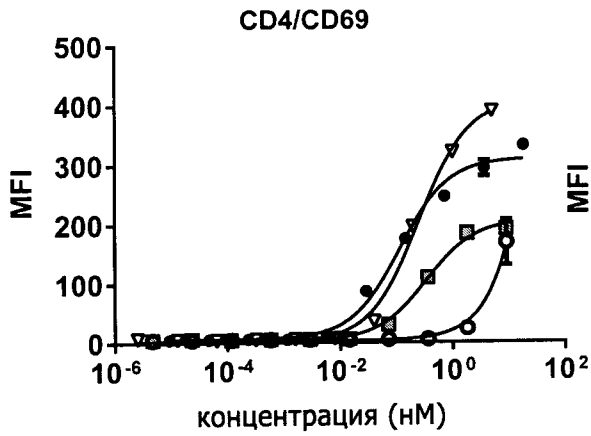
Фиг. 6В



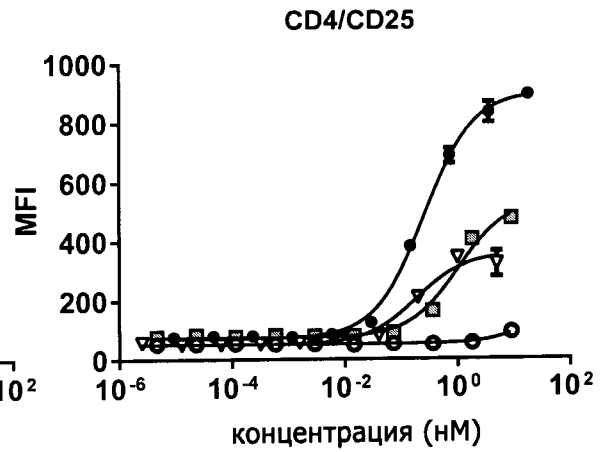
A498 (20к) +
Т-клетки
LDH-анализ
24 h E:T 10:1

Фиг. 6С

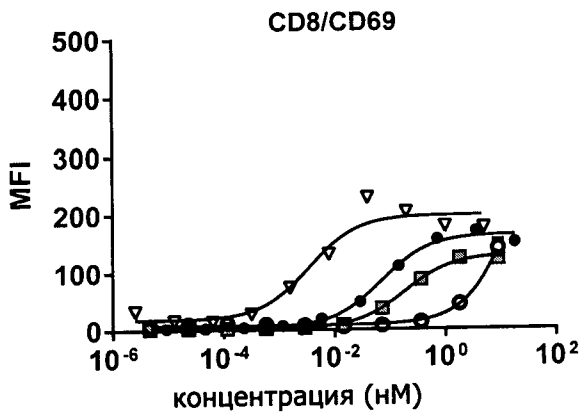
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- B7-H3 mAb 1 X Anti-CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▽ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- Флуоресцеин mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом



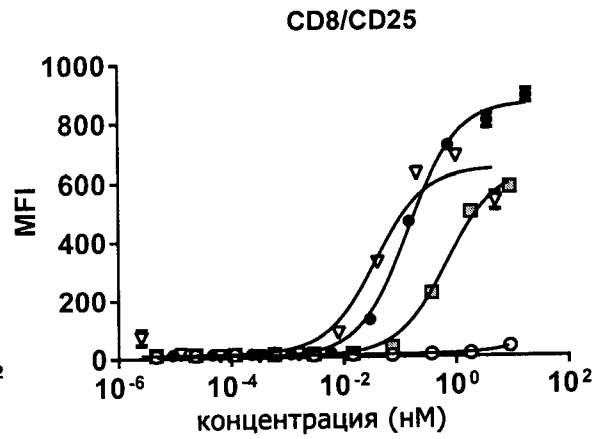
Фиг. 7А



Фиг. 7В

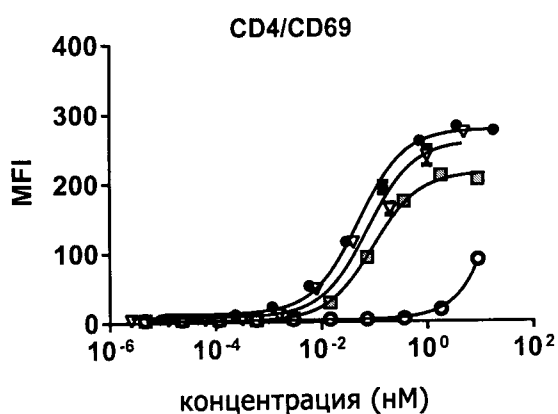


Фиг. 7С

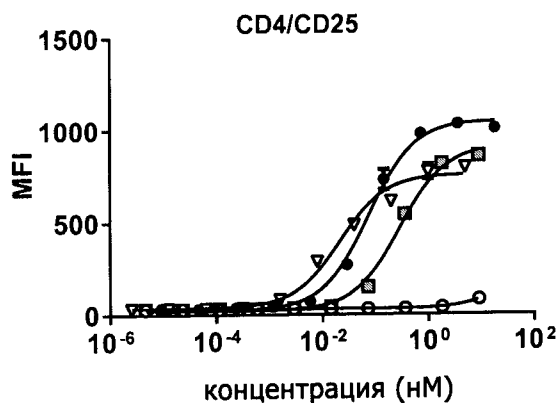


Фиг. 7D

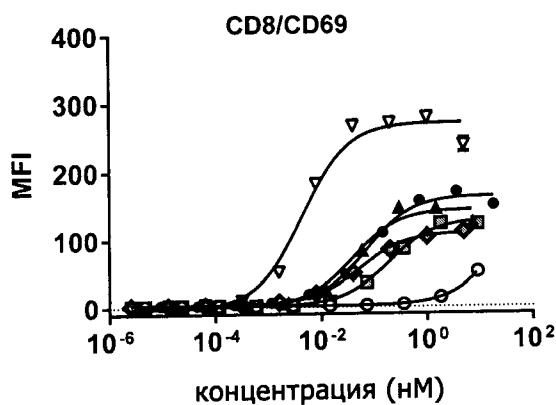
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▽ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- Флуоресцеин mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом



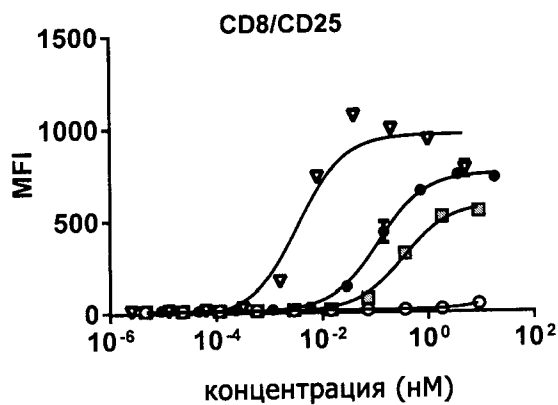
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

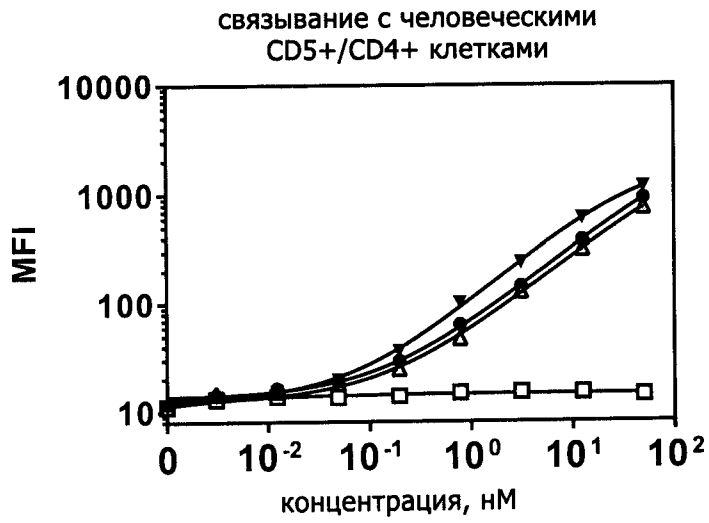


ФИГ. 8С

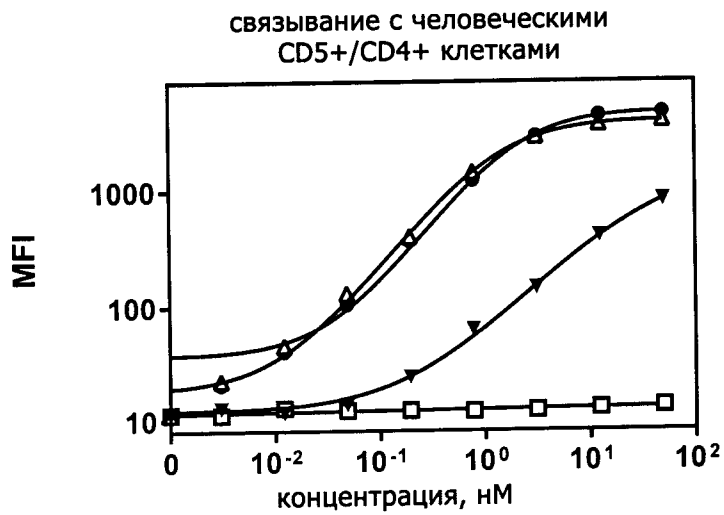


ФИГ. 8D

- ▽ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ◇ gpA33 mAb 1 CD3 mAb 2 DART™
- ▣ B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- ▲ B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 Fc DART™
- Флуоресцеин mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом



Фиг. 9А



Фиг. 9В

● B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
связывающая молекула

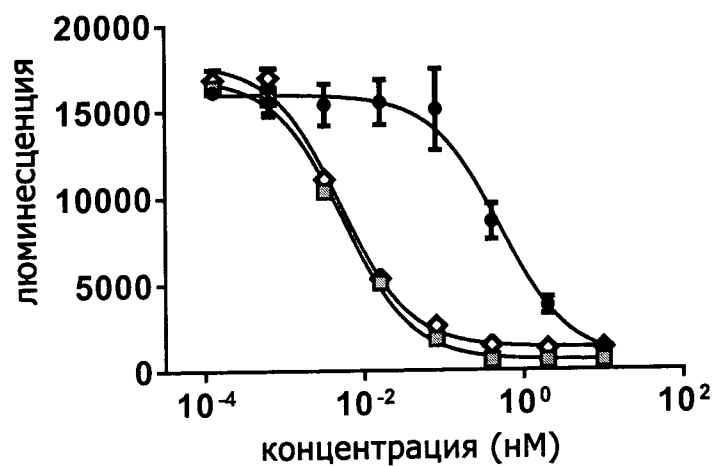
▼ B7-H3 mAb 1 x CD3 mAb 2
DART™ с Fc-доменом

△ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2
связывающая молекула

□ B7-H3 mAb 1 X B7-H3 mAb 1
DART™ с Fc-доменом

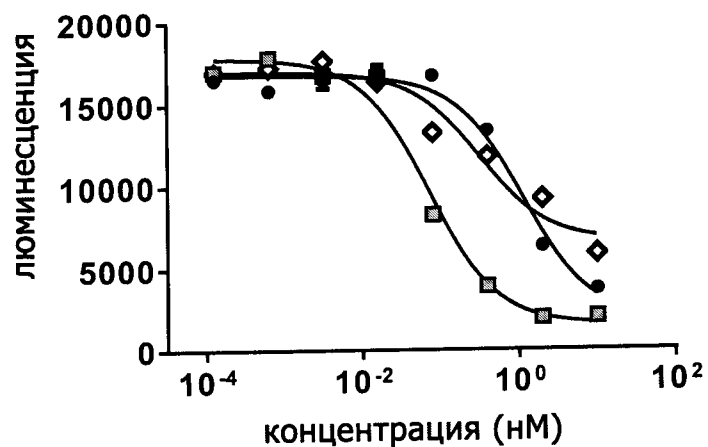
21/62

J1MT-1 клон 4(20к) + CD8+ Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



Фиг. 10А

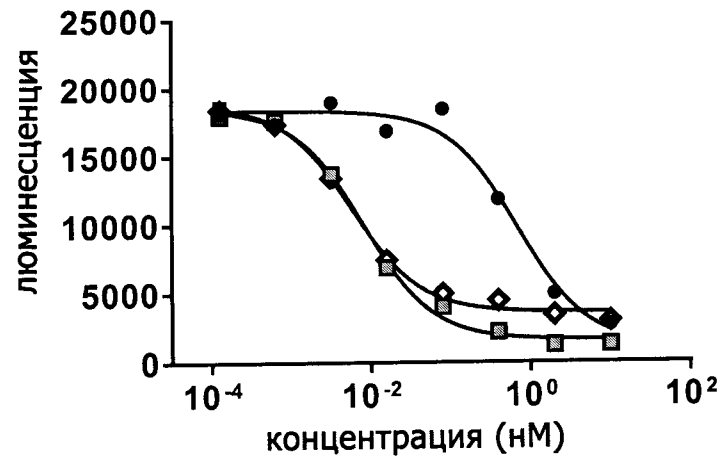
J1MT-1 клон 4(20к) + CD4+ Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



Фиг. 10В

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ◇ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 связывающая молекула
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™

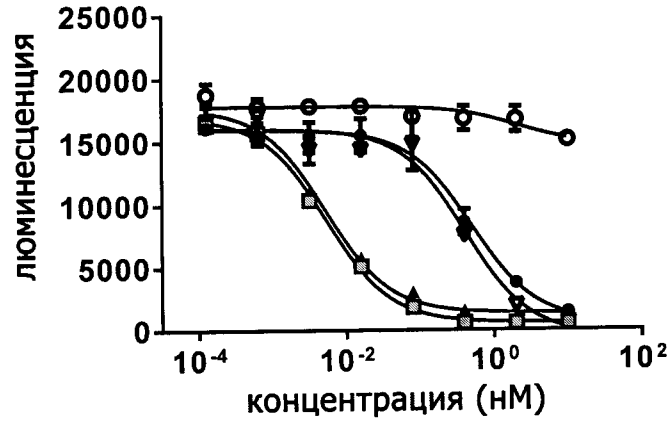
ЖИМТ-1 клон 4(20k) + пан-Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



ФИГ. 10С

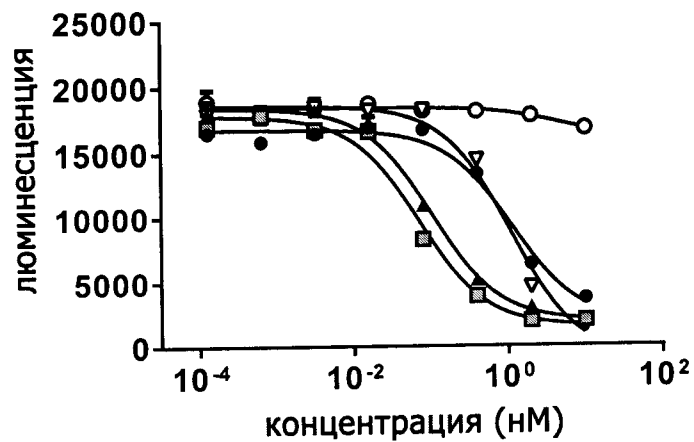
- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ◆ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 связывающая молекула
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DARTTM с Fc-доменом

ЖИМТ-1 клон 4(20к) + CD8+ Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



Фиг. 11А

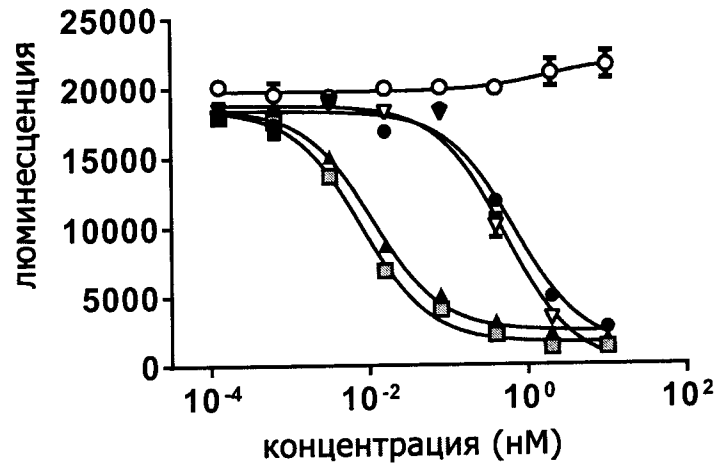
ЖИМТ-1 клон 4(20к) + CD4+ Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



Фиг. 11В

- ▣ B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 связывающая молекула
- B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DARTTMс Fc-доменом
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DARTTMс Fc-доменом

ЖИМТ-1 клон 4(20k) + пан- Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1

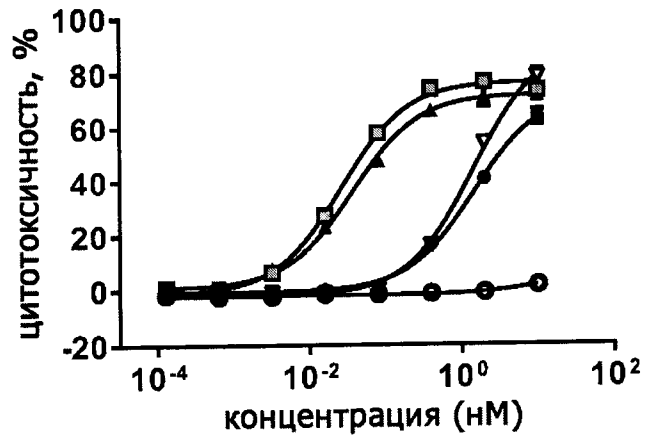


Фиг. 11С

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲— CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 связывающая молекула
- ▼— B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 связывающая молекула
- B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ с Fc-доменом
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом

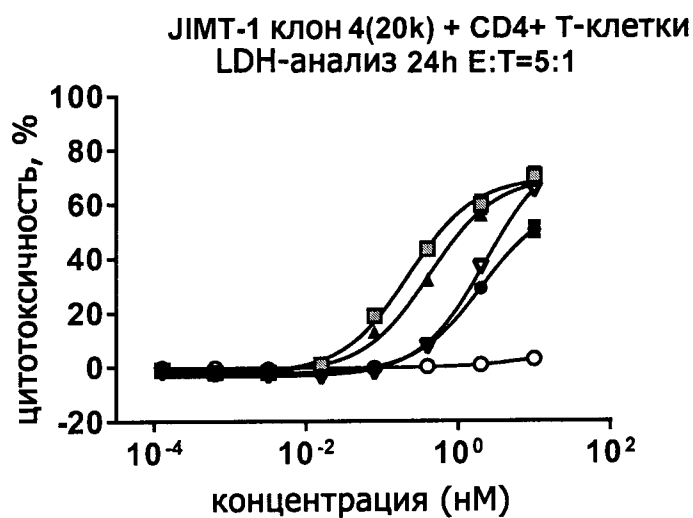
25/62

JIMT-1 клон 4(20k) + CD8+ Т-клетки
LDH-анализ 24h E:T=5:1

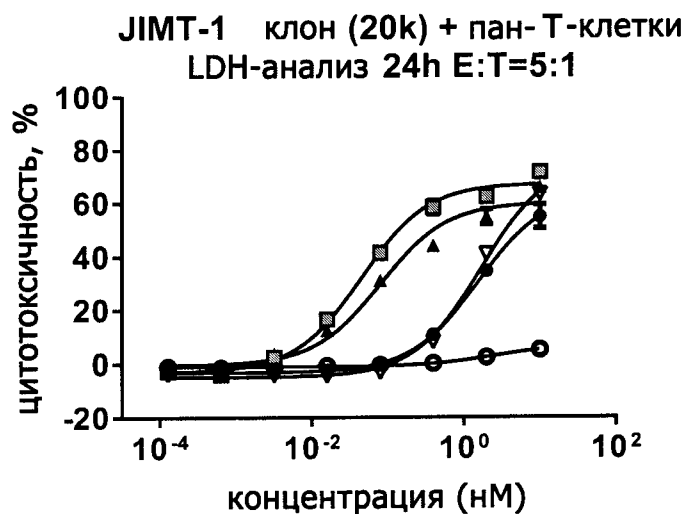


Фиг. 12А

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 связывающая молекула
- B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ с Fc-доменом
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом



Фиг. 12В

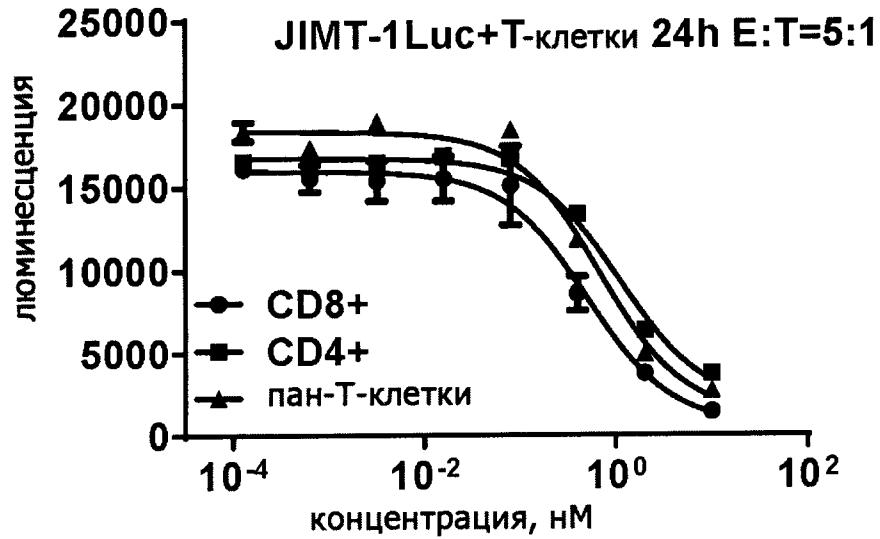


Фиг. 12С

- B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 связывающая молекула
- B7-H3 mAb 1 X CD8 mAb 1 DART™ с Fc-доменом
- B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом

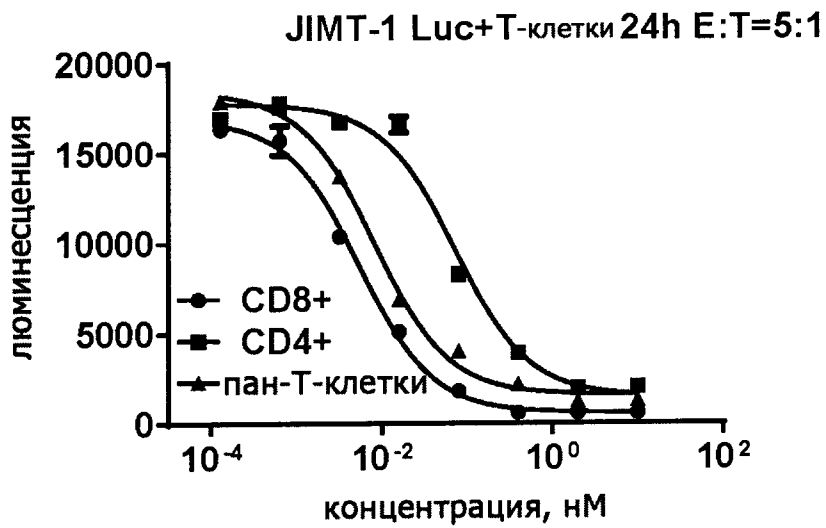
27/62

B7-H3 mAb 1 X CD3 mAb 2
DART™ с Fc-доменом



Фиг. 13А

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
связывающая молекула

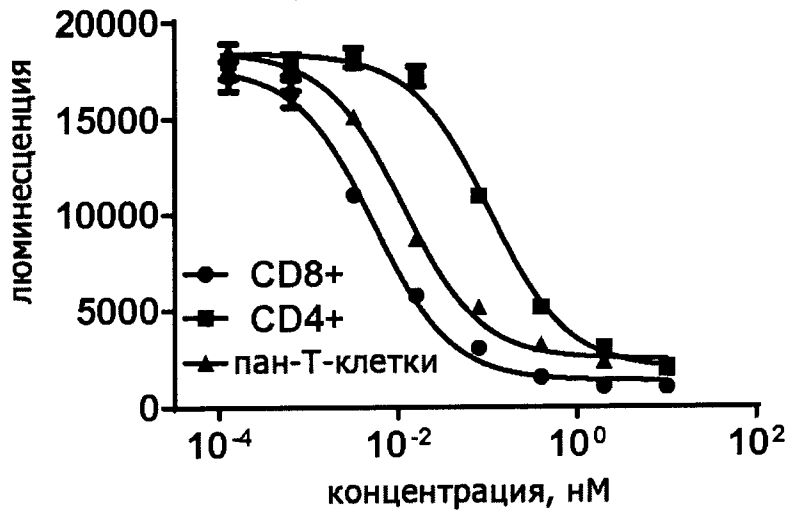


Фиг. 13В

CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / B7-H3 mAb 1

связывающая молекула

JIMT-1 Luc+ T-клетки 24h E:T=5:1

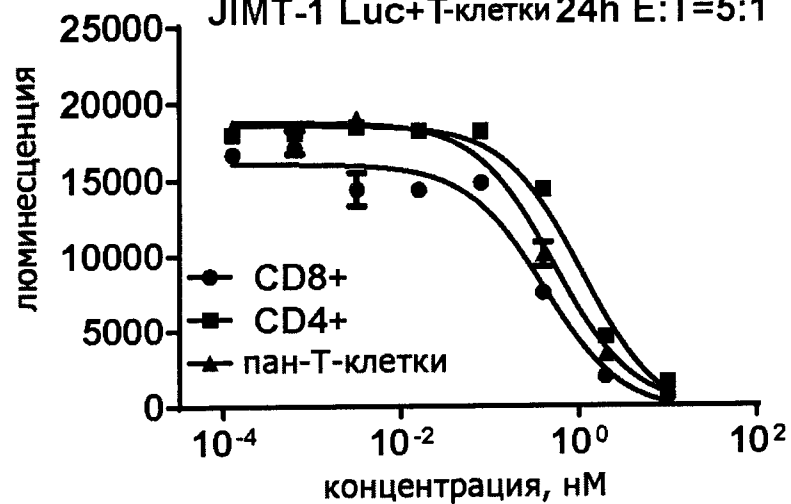


ФИГ. 13С

B7-H3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2

связывающая молекула

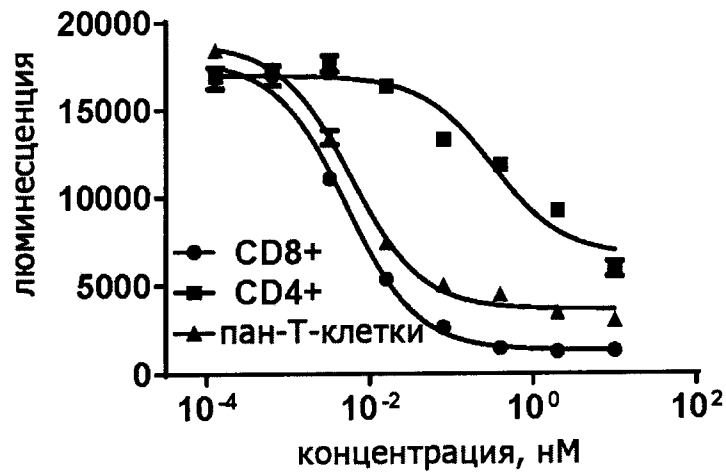
JIMT-1 Luc+ T-клетки 24h E:T=5:1



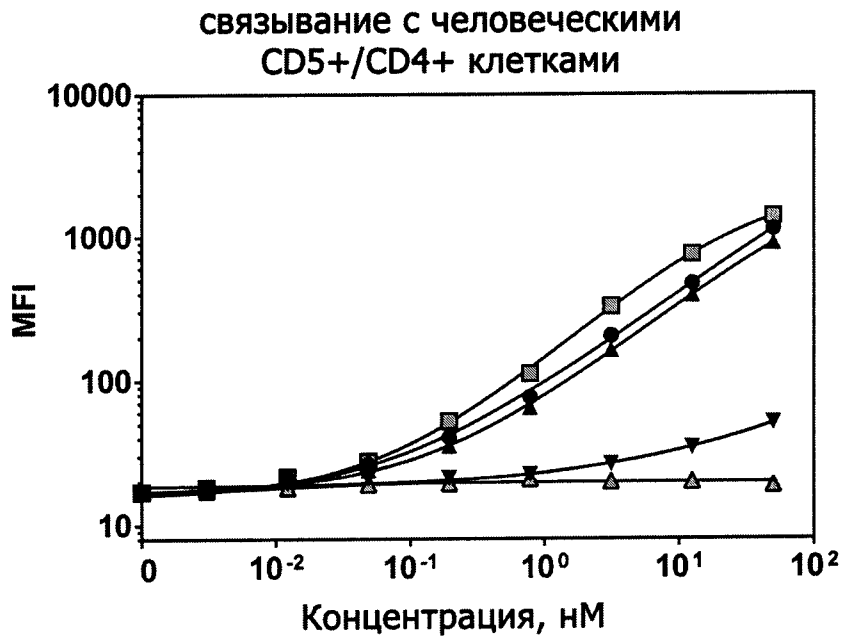
ФИГ. 13D

B7-H3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2
связывающая молекула

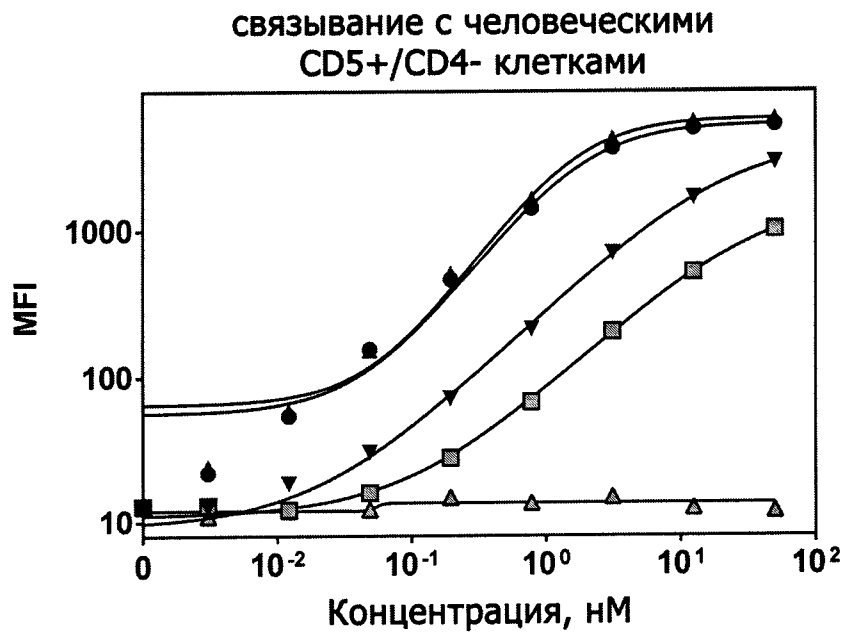
JIMT-1 Luc+T-клетки 24h E:T=5:1



Фиг. 13Е



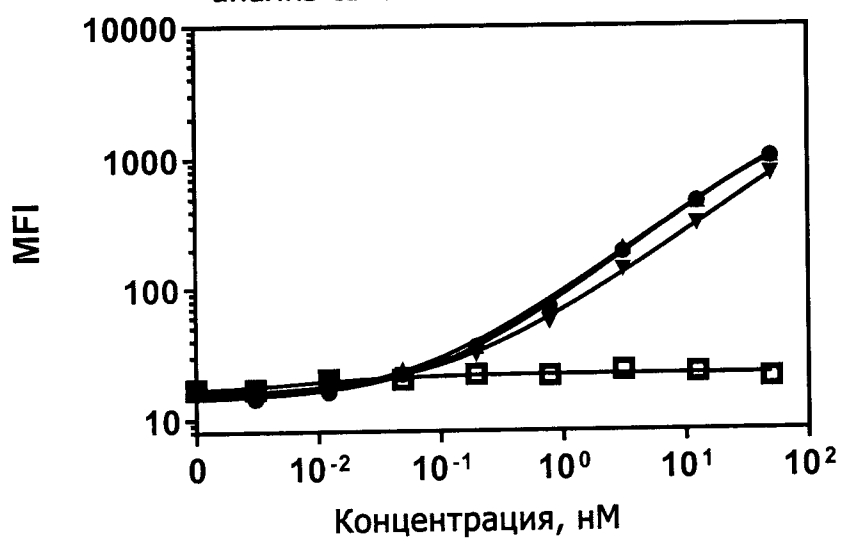
Фиг. 14А



Фиг. 14В

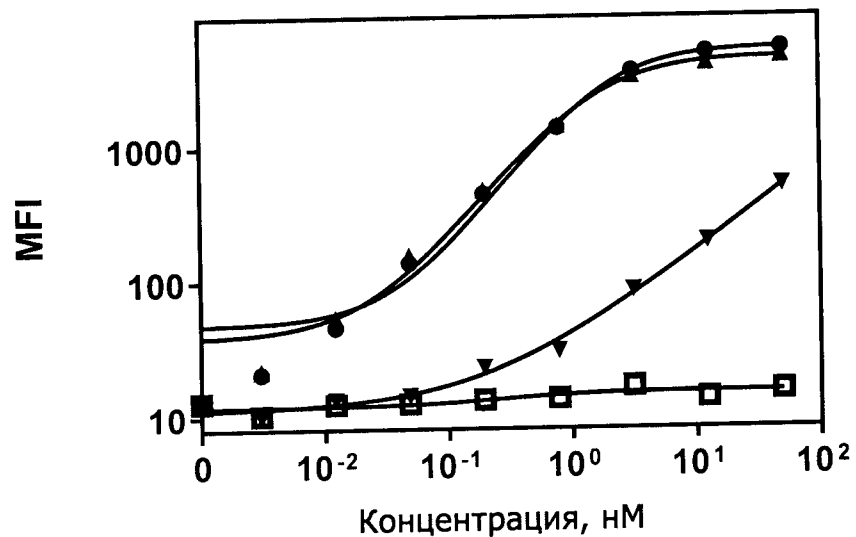
- В7-Н3 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 / В7-Н3 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ В7-Н3 mAb 1 / CD8 mAb 1 / CD3 mAb 2 связывающая молекула
- В7-Н3 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- △ В7-Н3 mAb 1 X В7-Н3 mAb 1 DART™

человеческие PBMC, селектированные по CD5+/CD4+,
анализ связывания анти-Fc человека



Фиг. 15А

человеческие PBMC, селектированные по CD5+/CD4-,
анализ связывания анти-Fc человека



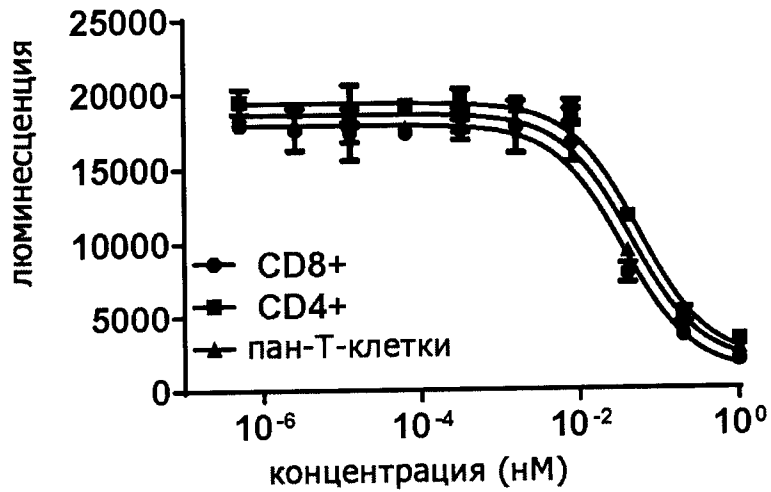
Фиг. 15В

- ST4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ ST4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 связывающая молекула
- ▼ ST4 mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ST4 mAb 2 X ST4 mAb 2 Fc DART

5T4 mAb 2 X CD3 mAb 2

DART™ с Fc-доменом

JIMT-1 Luc+T-клетки 24h E:T=5:1

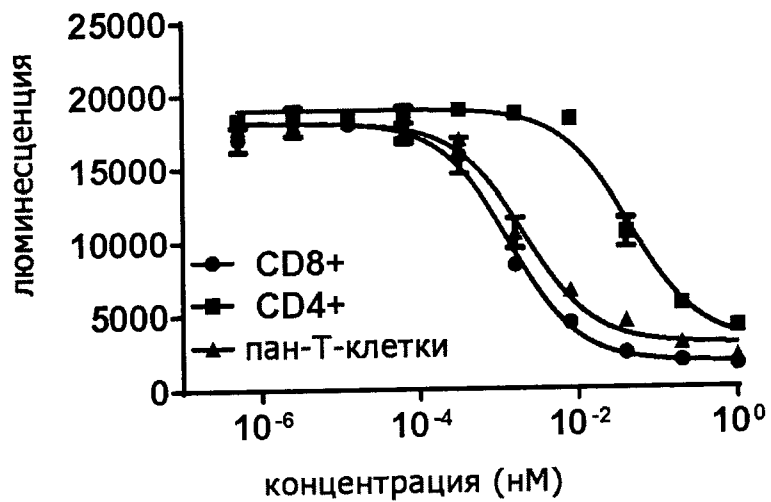


ФИГ. 16А

5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1

связывающая молекула

JIMT-1 Luc+T-клетки 24h E:T=5:1

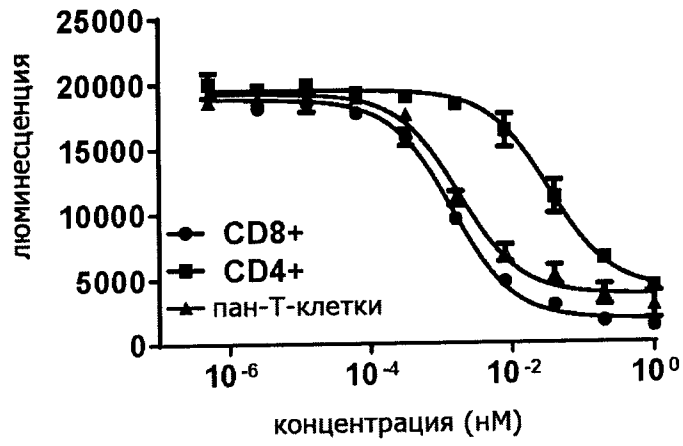


ФИГ. 16В

33/62

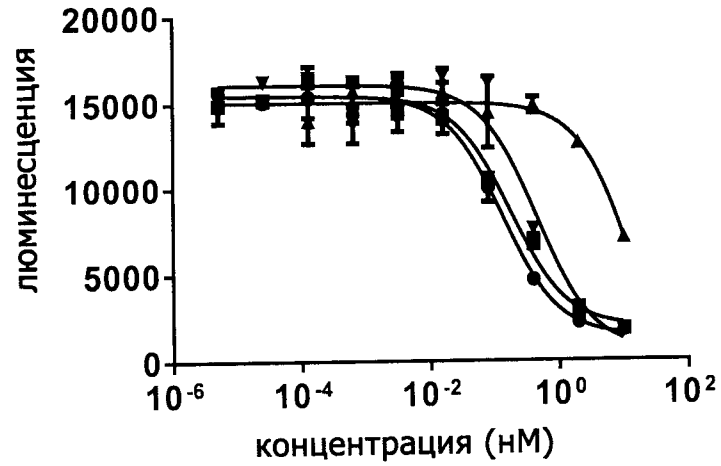
5T4 mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2
связывающая молекула

JIMT-1 Luc+T-клетки 24h E:T=5:1



Фиг. 16С

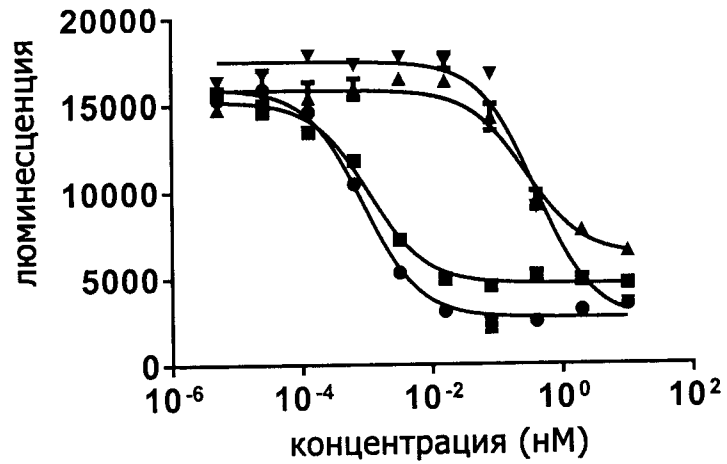
J1MT-1 клон 4(20k) + CD4+T-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



- ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 связывающая молекула
- ▲ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ ROR1 mAb 1 X CD3 mAb 2 DARTTM с Fc-доменом

Фиг. 17А

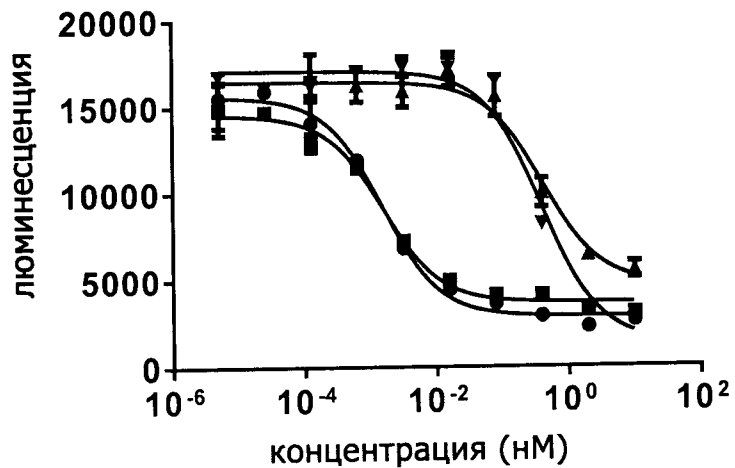
J1MT-1 клон 4(20k) +CD8+ Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1



- ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 связывающая молекула
- ▲ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ ROR1 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом

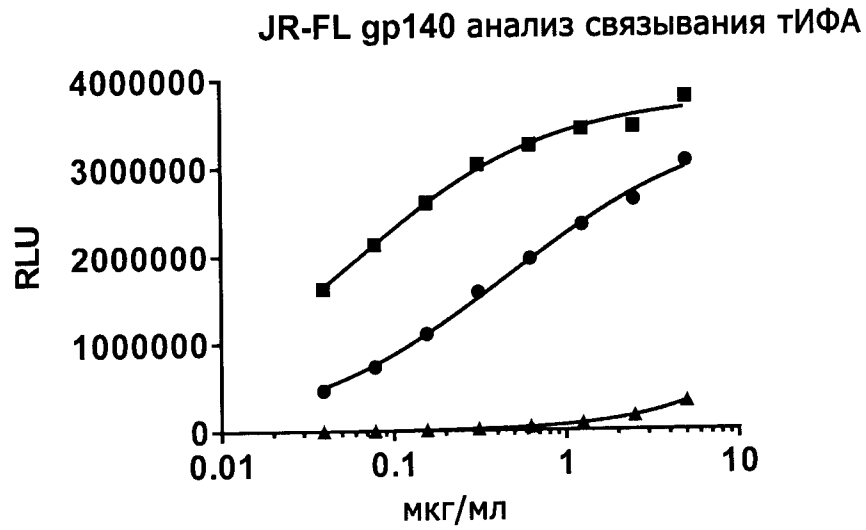
Фиг. 17В

JMT-1 клон 4(20k) + пан Т-клетки
люциферазный анализ 24h E:T=5:1

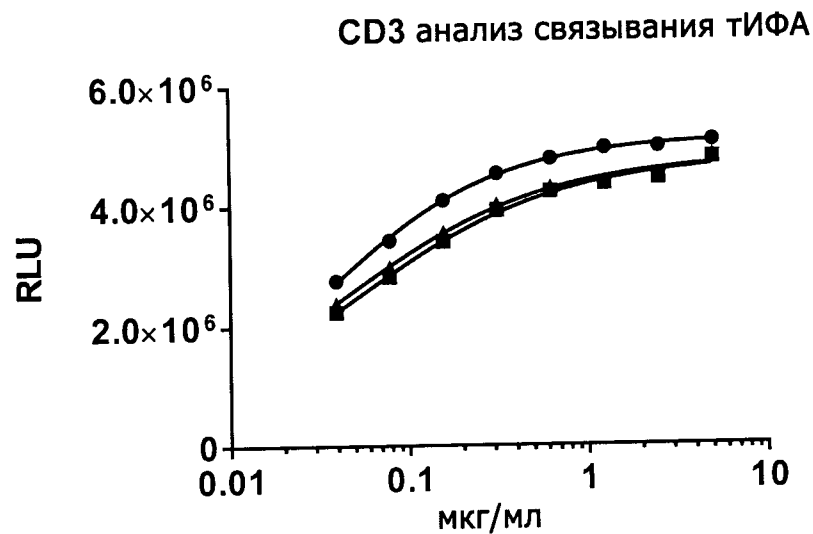


- ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ROR1 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 2 связывающая молекула
- ▲ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ ROR1 mAb 1 X CD3 mAb 2 DARTTM с Fc-доменом

Фиг. 17С



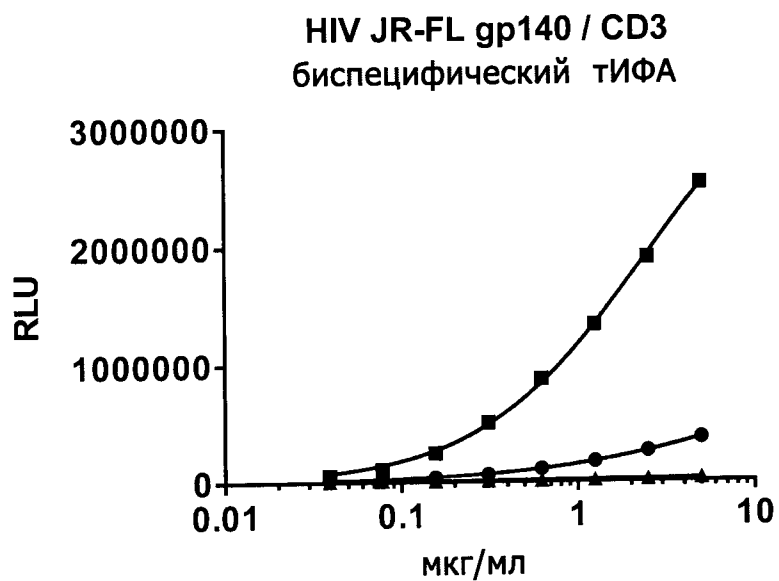
Фиг. 18А



Фиг. 18В

- HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

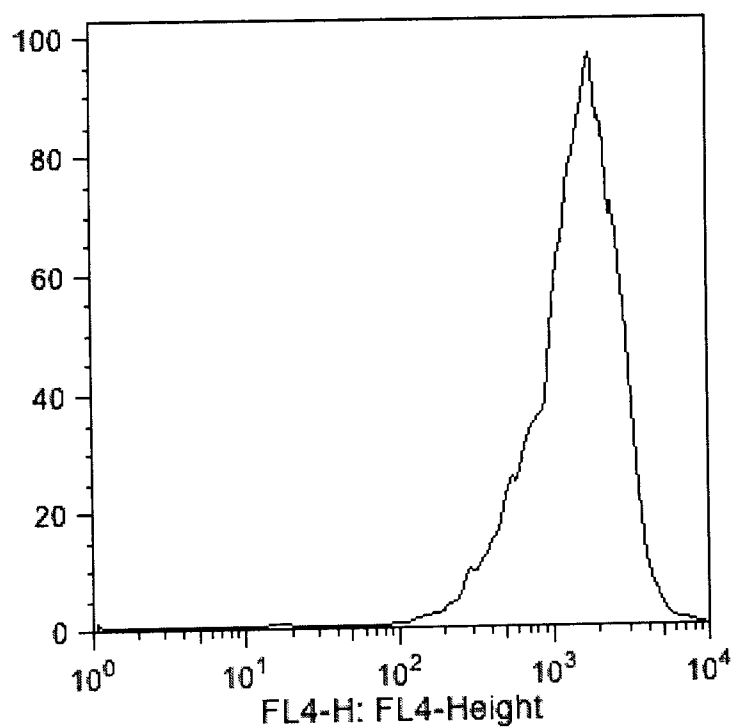
38/62



- HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

Фиг. 18С

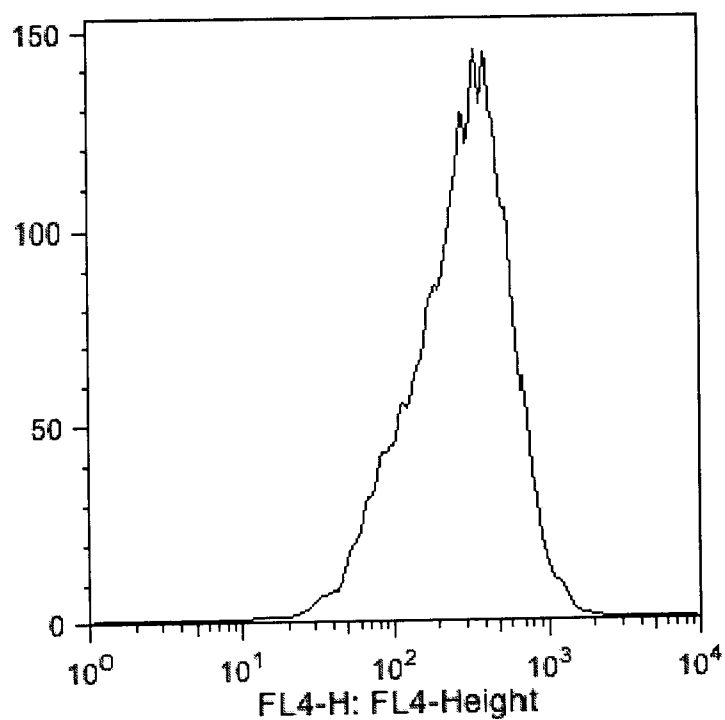
39/62



связывание HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
связывающей молекулы с HIV env-экспрессирующими
клетками HEK 293

Фиг. 19А

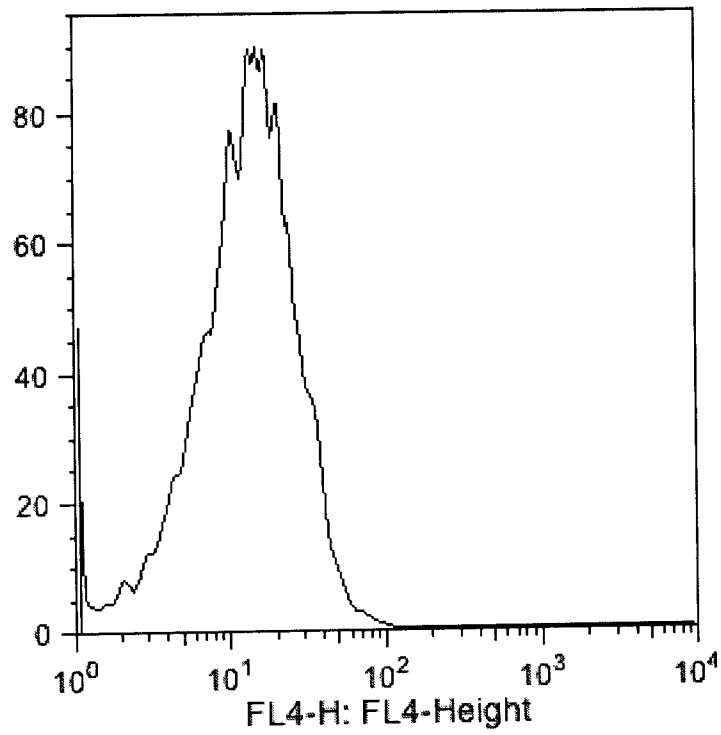
40/62



связывание HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
связывающей молекулы с HIV env-экспрессирующими
клетками HEK 293

Фиг. 19В

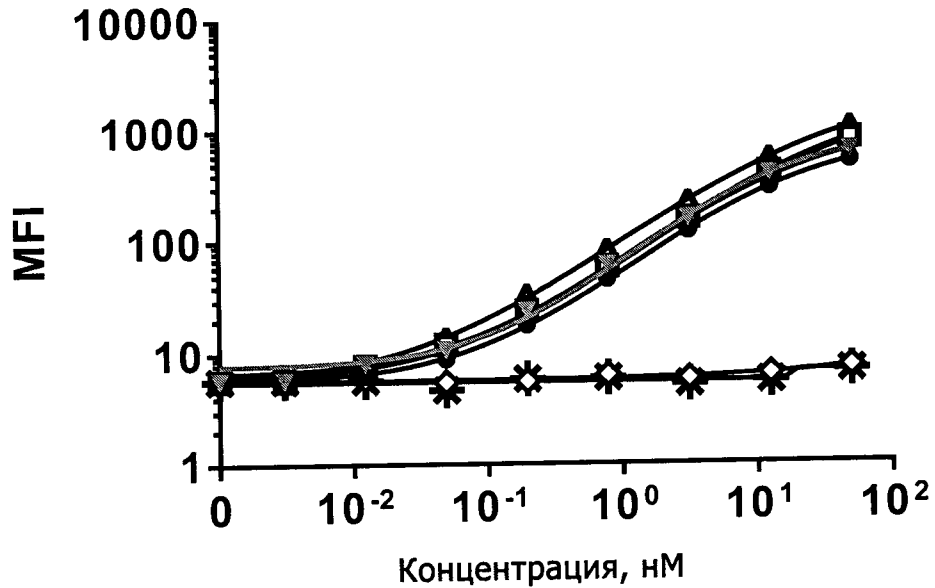
41/62



связывание RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1
связывающей молекулы с HIV env-экспрессирующими
клетками HEK 293

ФИГ. 19С

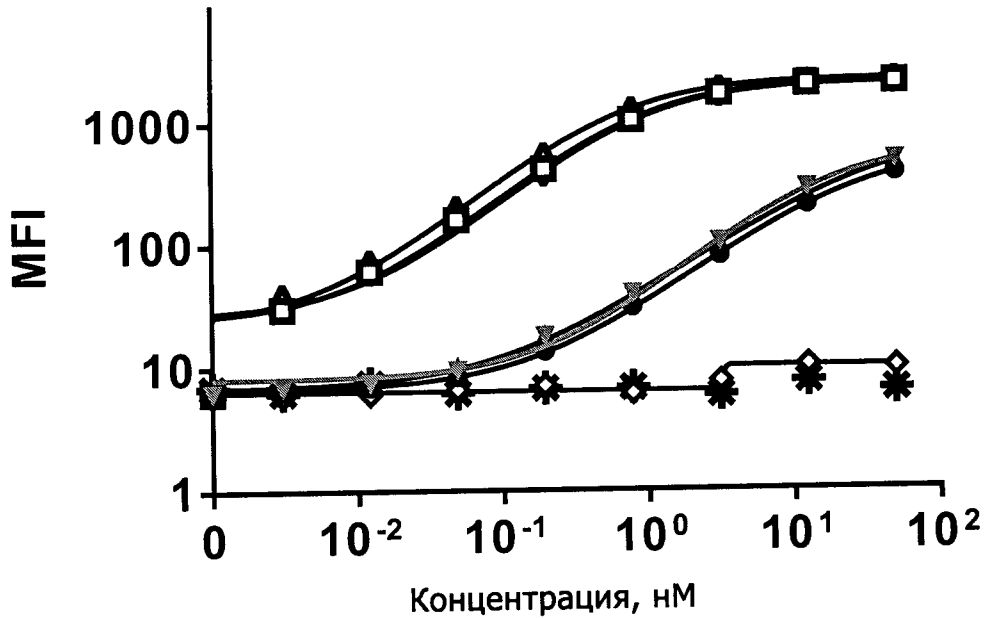
человеческие PBMC, селектированные по CD5+/CD4+,
анализ связывания анти-Fc человека



- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▲ HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▼ RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ◇ HIV mAb 1 X RSV mAb 1 DART™ с Fc-доменом
- * HIV mAb 2 X RSV mAb 1 DART™ с Fc-доменом

Фиг. 20А

человеческие PBMC, селектированные по CD5+/CD4-,
анализ связывания анти-Fc человека

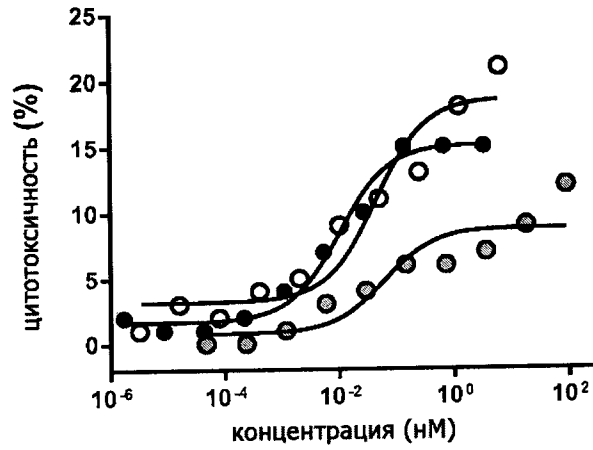


- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▲ HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▼ RSV mAb 1 X CD3 2 DART™ с Fc-доменом
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ◇ HIV mAb 1 X RSV mAb 1 DART™ с Fc-доменом
- * HIV mAb 2 X RSV mAb 1 DART™ с Fc-доменом

Фиг. 20В

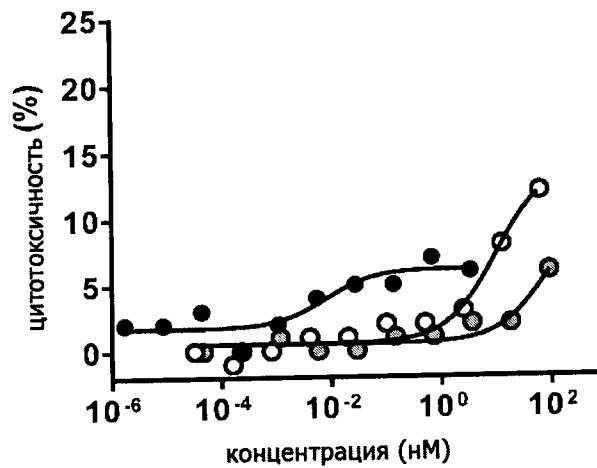
44/62

Jurkat 522 FY (10К/лунку) + пан- Т-клетки
24 Hours (-Tet) E:T = 10:1
LDH-анализ



Фиг. 21А

Jurkat 522 FY (10К/лунку) + пан- Т-клетки
24 Hours (+ Tet) E:T=10:1
LDH-анализ

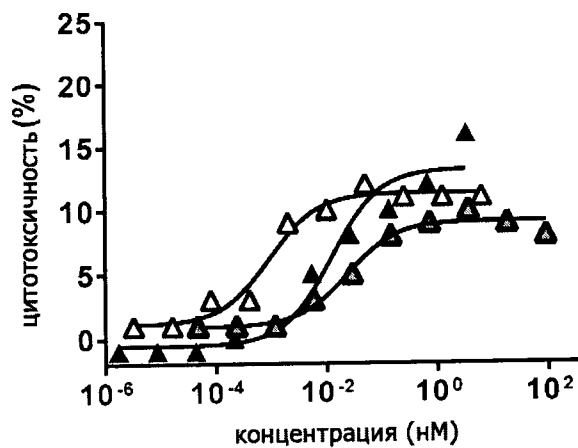


Фиг. 21В

- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

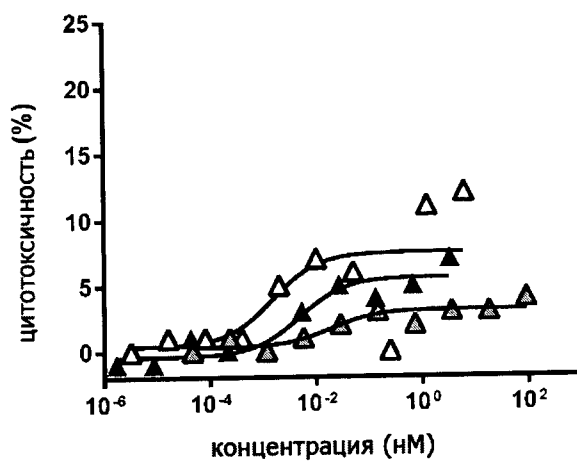
45/62

Jurkat 522 FY (10К/лунку) + пан- Т-клетки
24 Hours (- Tet) E:T=10:1
LDH-анализ



Фиг. 21С

Jurkat 522 FY (10К/лунку) + пан- Т-клетки
24 Hours (+Tet) E:T=10:1
LDH-анализ

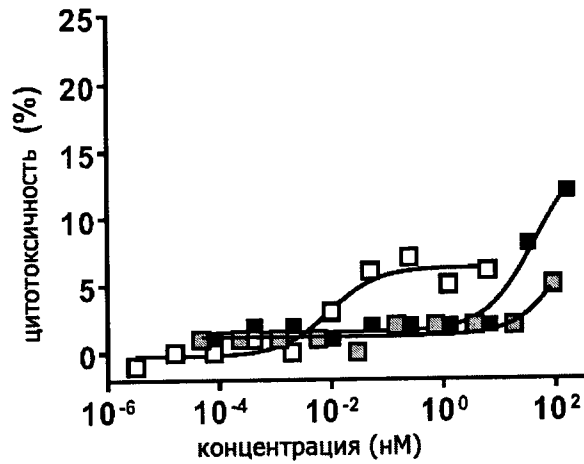


Фиг. 21D

- ▲ HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™
- ▴ HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- △ HIV mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb1 связывающая молекула

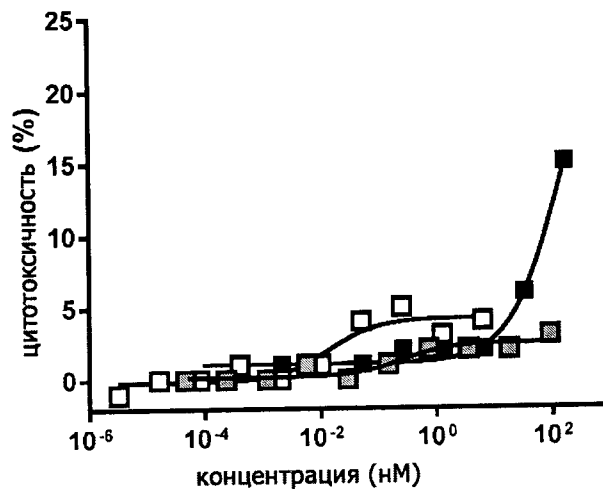
46/62

Jurkat 522 FY (10К/лунку) + пан- Т-клетки
24 Hours (-Tet) E:T=10:1
LDH-анализ



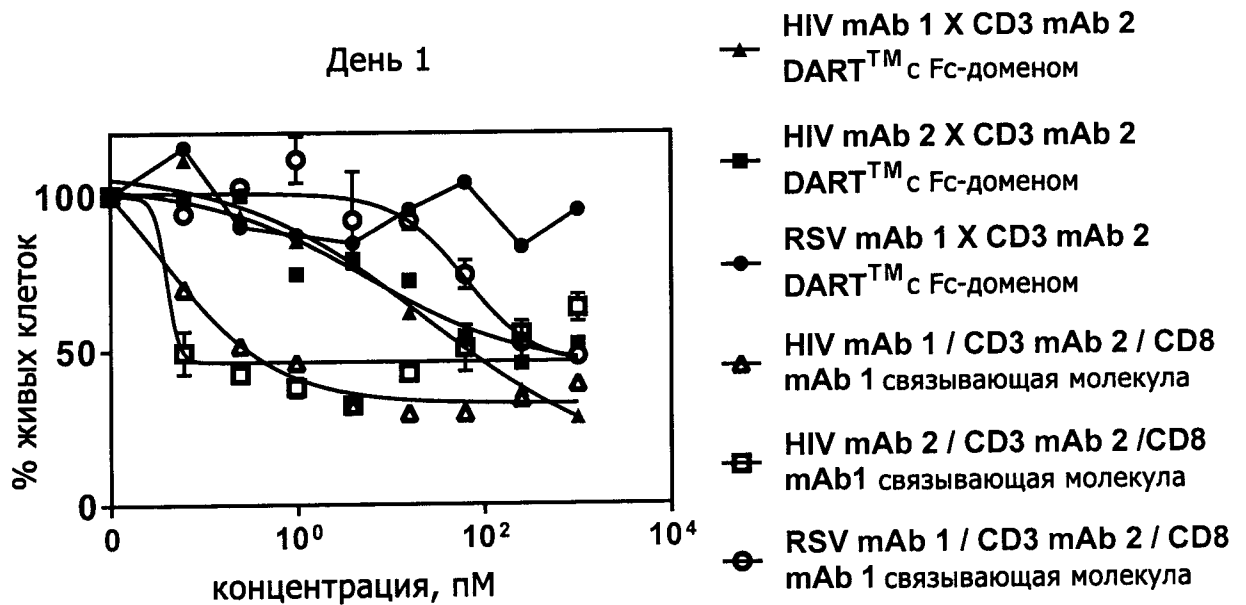
Фиг. 21Е

Jurkat 522 FY (10К/лунку) + пан- Т-клетки
24 Hours (+Tet) E:T=10:1
LDH-анализ

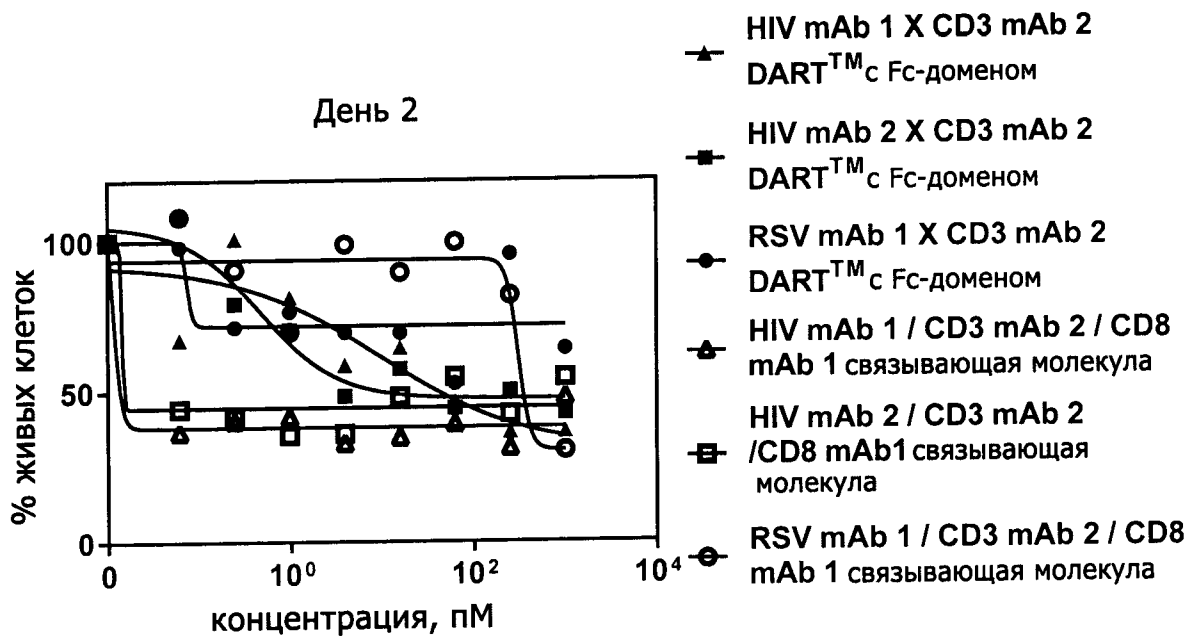


Фиг. 21F

- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула



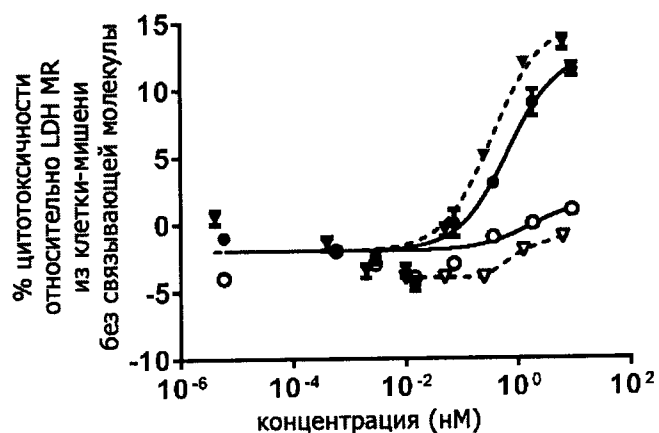
Фиг. 22А



Фиг. 22В

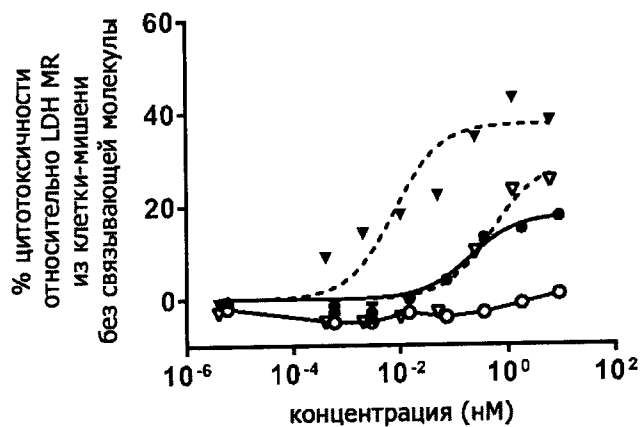
48/62

Jurkat 522 FY (10K/лунку) + CD4+ Т-клетки
(LDH) E:T=5:1 24hr



Фиг. 23А

Jurkat 522 FY (10K/лунку) + CD8+ Т-клетки
(LDH) E:T=5:1 24hr

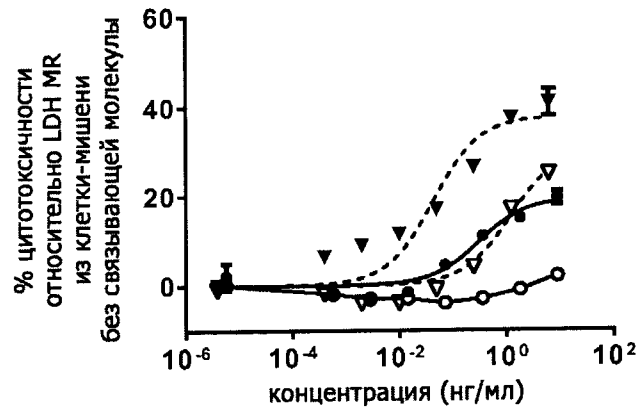


Фиг. 23В

- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▼ HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▽ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

49/62

Jurkat 522 FY (10K/лунку) + Pan T D58199
(LDH) E:T=5:1 24h

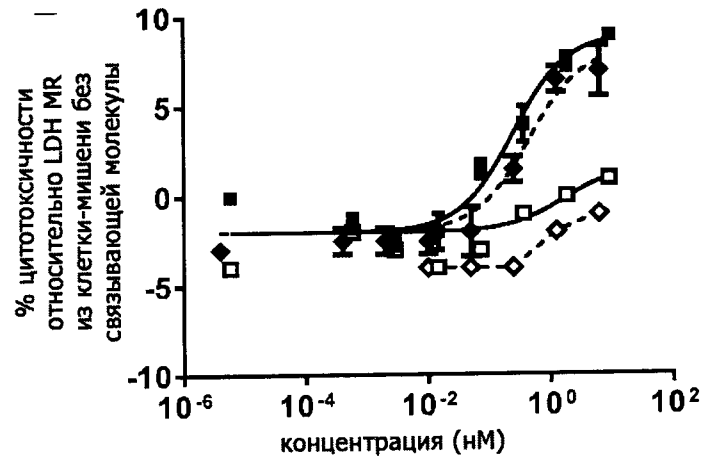


ФИГ. 23С

- HIV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▼ HIV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ▽ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

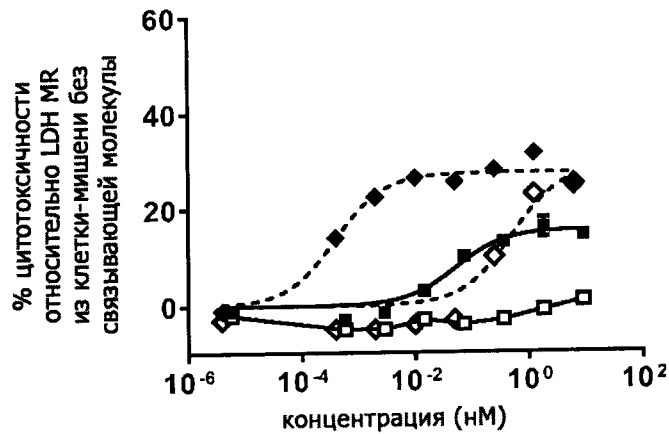
50/62

Jurkat 522 FY (10K/лунку) + CD4+ Т-клетки
(LDH) E:T=5:1 24hr



Фиг. 24А

Jurkat 522 FY (10K/ лунку) + CD8+ Т-клетки
(LDH) E:T=5:1 24hr

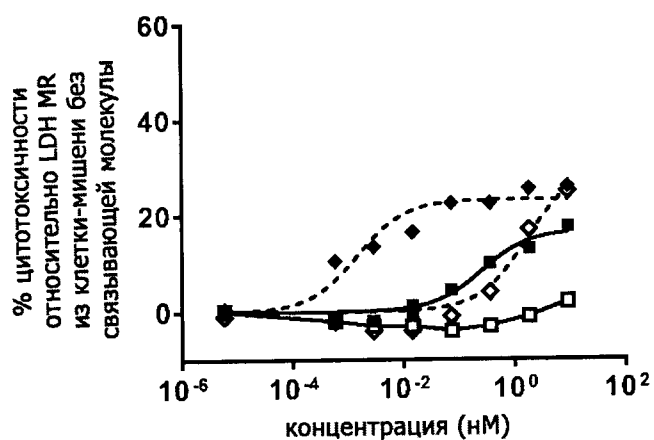


Фиг. 24В

- HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ◆ HIV- mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ◇ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

51/62

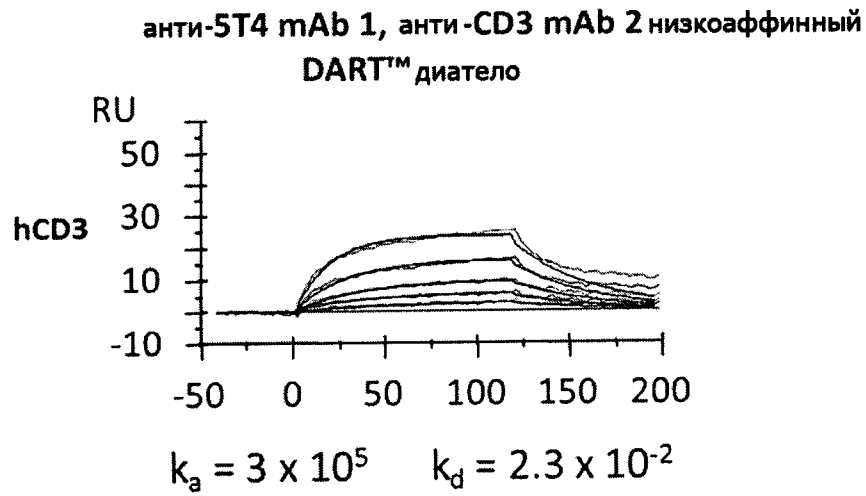
Jurkat 522 FY (10K/лунку) + пан-Т-клетки
(LDH) E:T=5:1 24hr



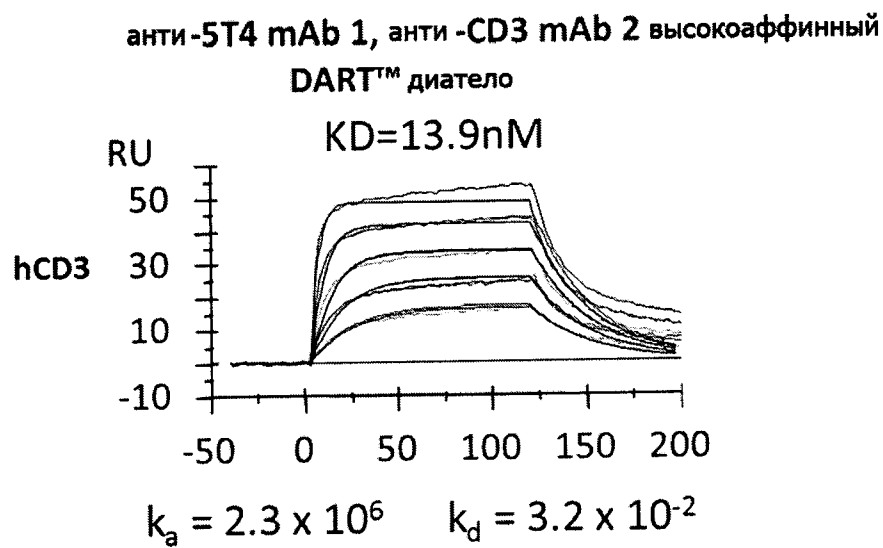
Фиг. 24С

- HIV mAb 2 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ◆ HIV- mAb 2 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- RSV mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- ◇ RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

52/62

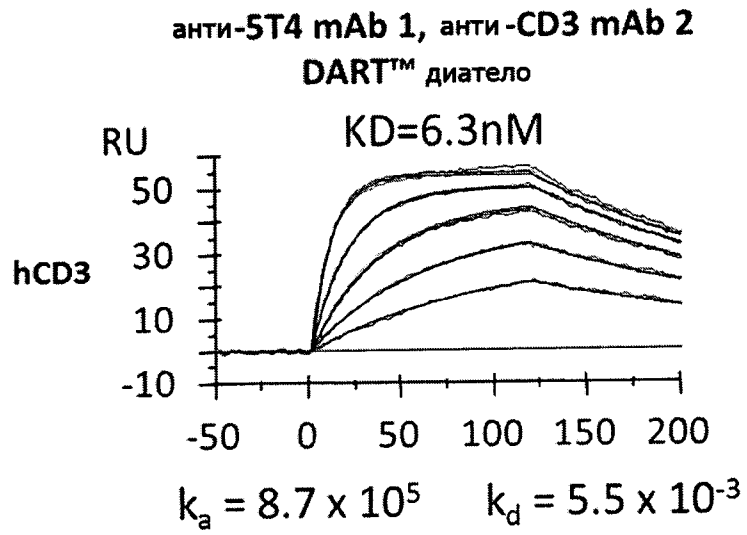


Фиг. 25А

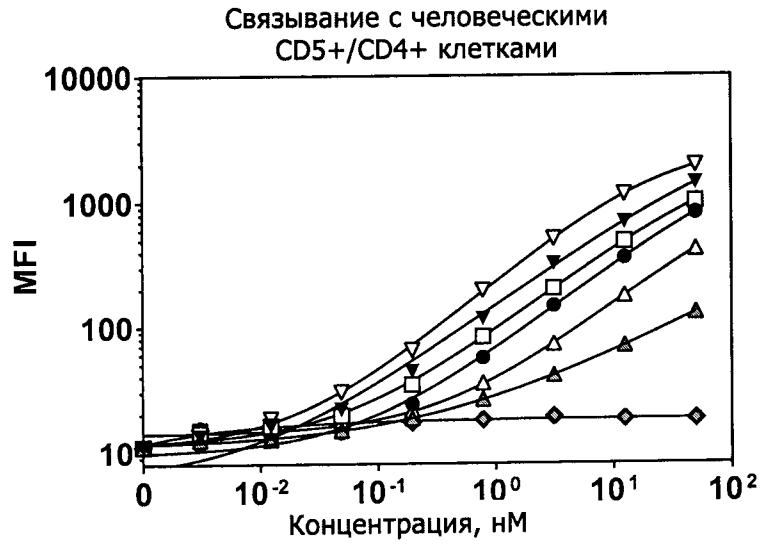


Фиг. 25В

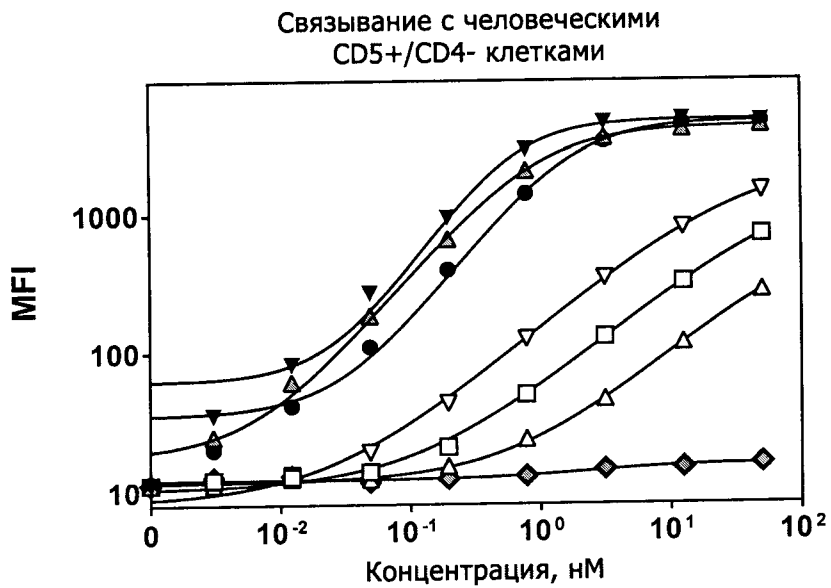
53/62



Фиг. 25С



Фиг. 26А

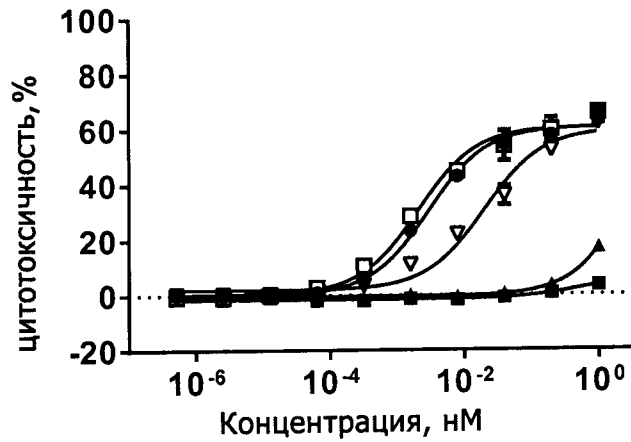


Фиг. 26В

- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 low / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▼ 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 fast / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- △ 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 Low DART™ с Fc-доменом
- ▽ 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 Fast DART™ с Fc-доменом
- ◇ 5T4 mAb 1 X 5T4 mAb 1 Fc DART™

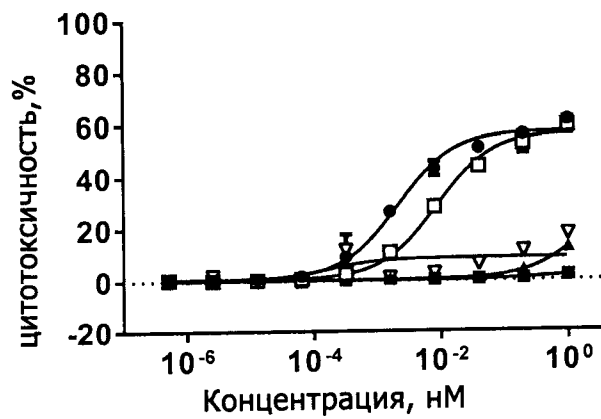
55/62

JIMT-1 клон 4(20k) + CD8+ Т-клетки
LDH-анализ 24h E:T=5:1



Фиг. 27А

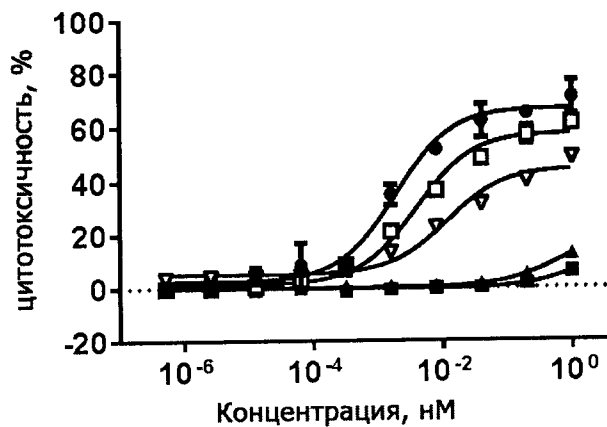
JIMT-1 клон 4(20k) + CD4+ Т-клетки
LDH-анализ 24h E:T=5:1



Фиг. 27В

- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▽ 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

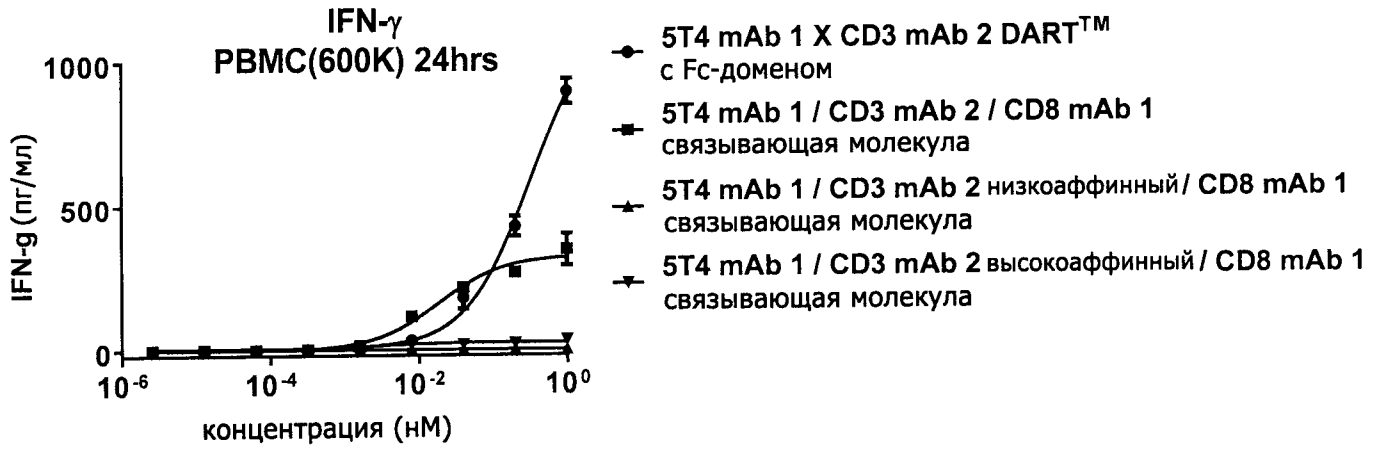
JIMT-1 клон 4(20k) + пан-Т-клетки
LDH-анализ 24h E:T=5:1



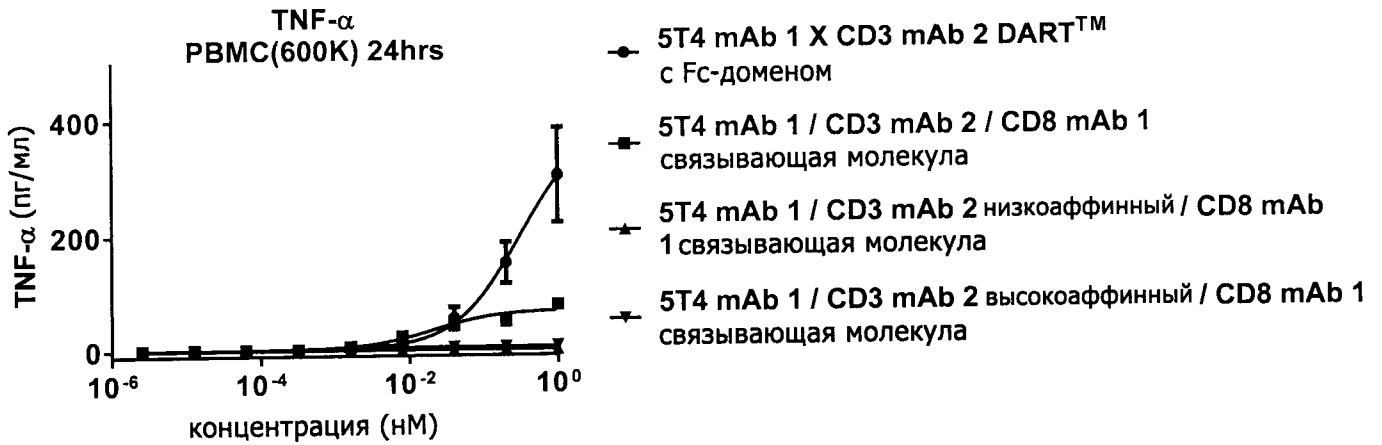
Фиг. 27С

- 5T4 mAb 1 X CD3 mAb 2 DART™ с Fc-доменом
- 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▲ 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Low / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- ▽ 5T4 mAb 1 / CD3 mAb 2 Fast / CD8 mAb 1 связывающая молекула
- RSV mAb 1 / CD3 mAb 2 / CD8 mAb 1 связывающая молекула

Донор 1

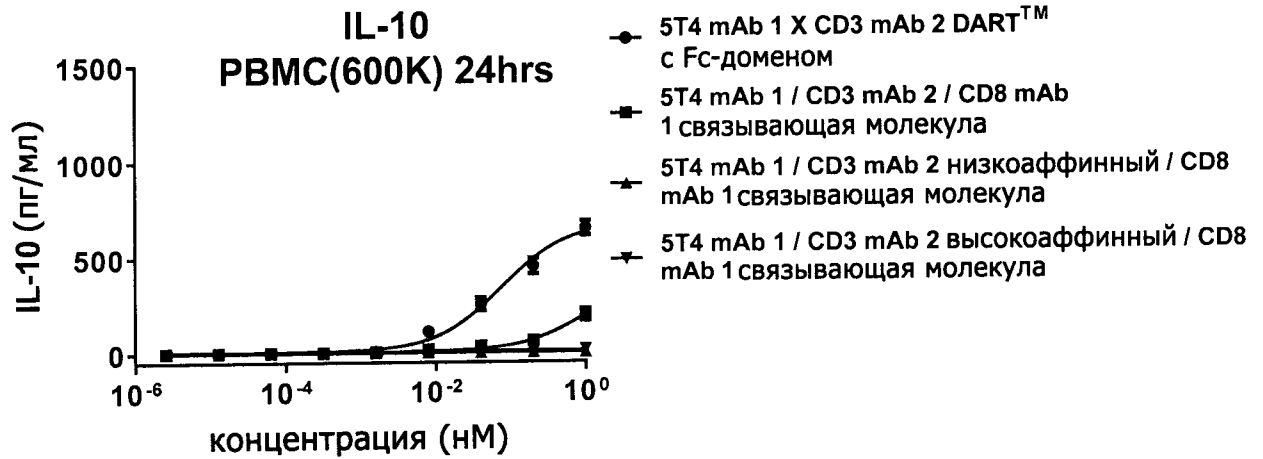


Фиг. 28А

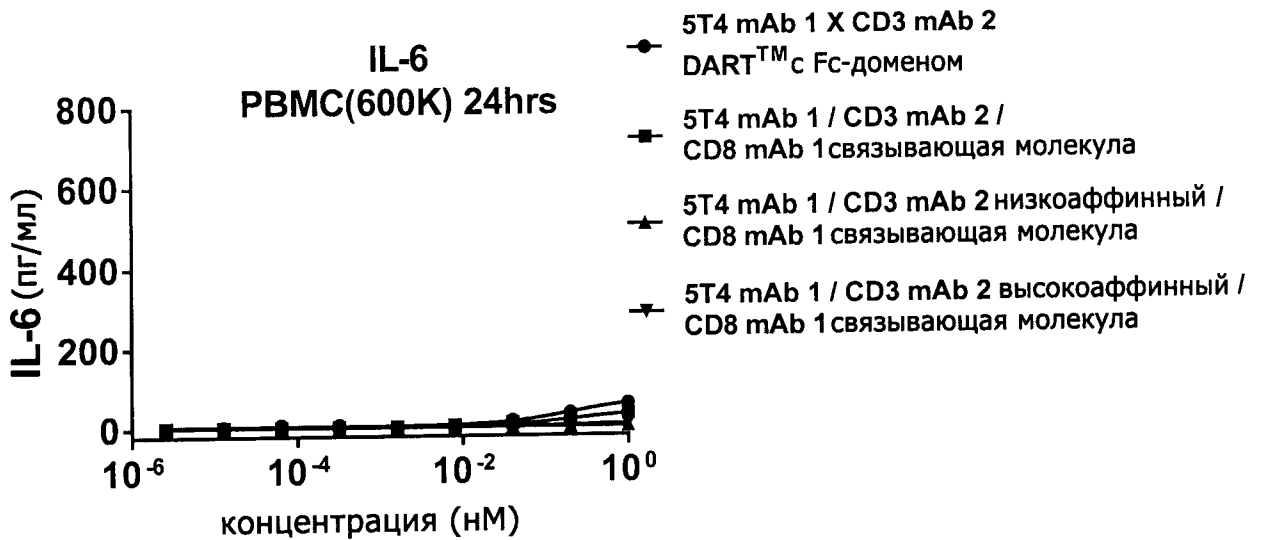


Фиг. 28В

Донор 1

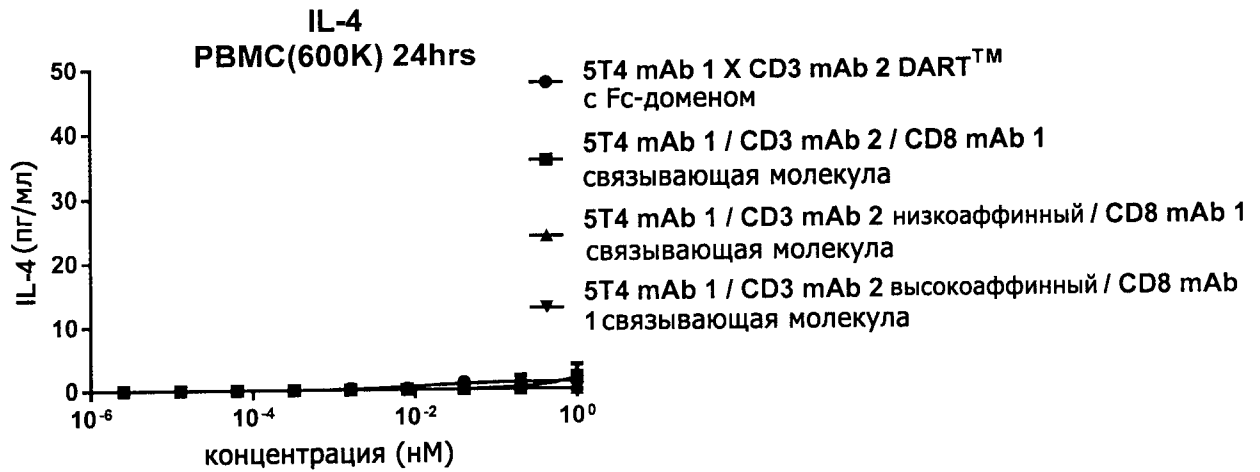


Фиг. 28C

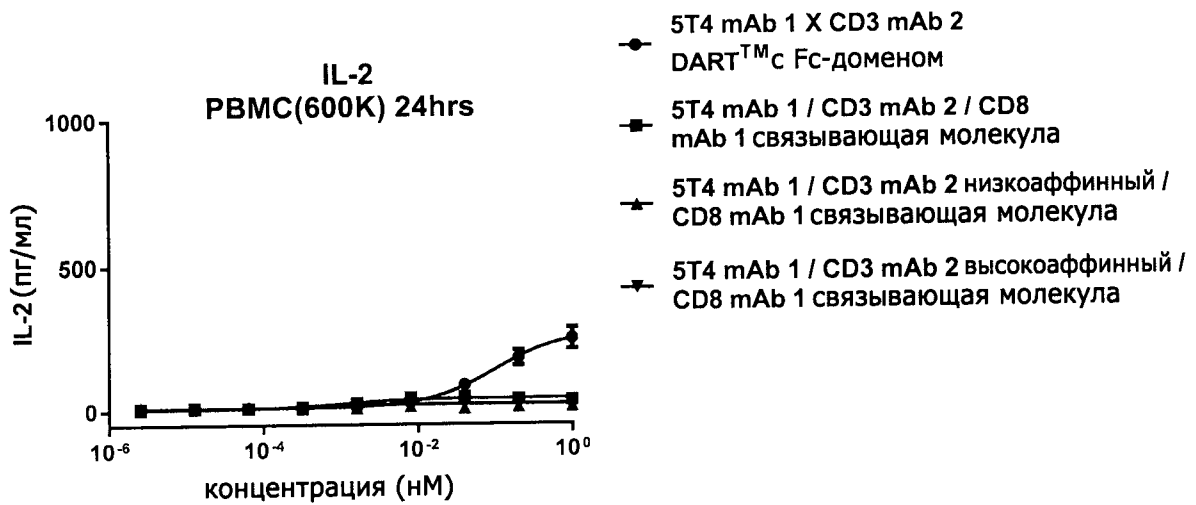


Фиг. 28D

Донор 1

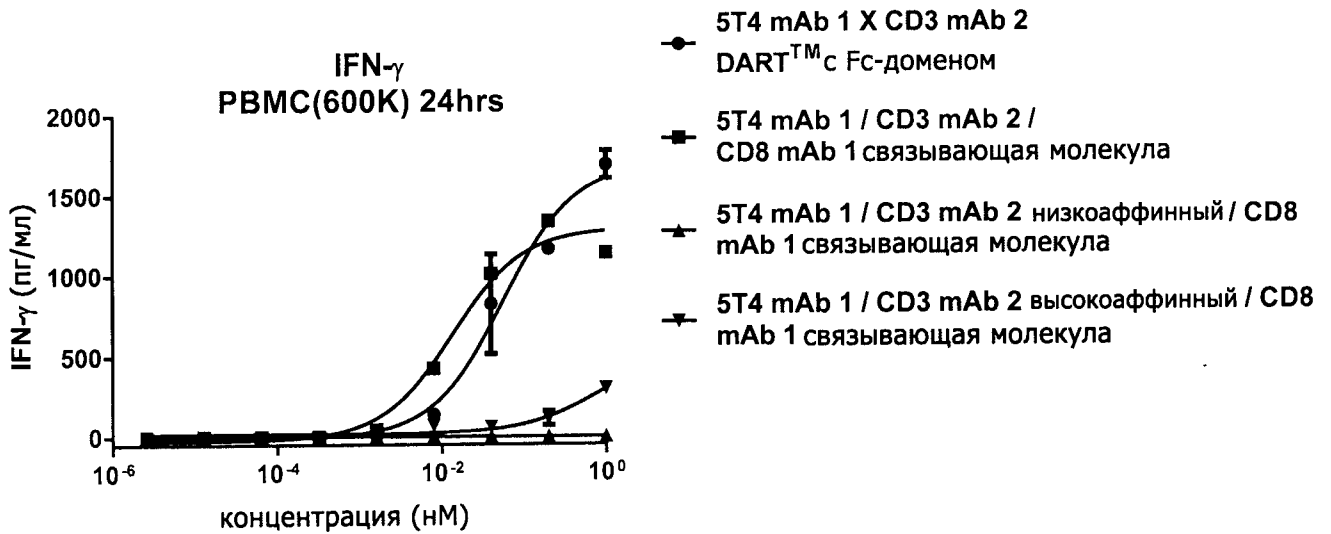


Фиг. 28Е

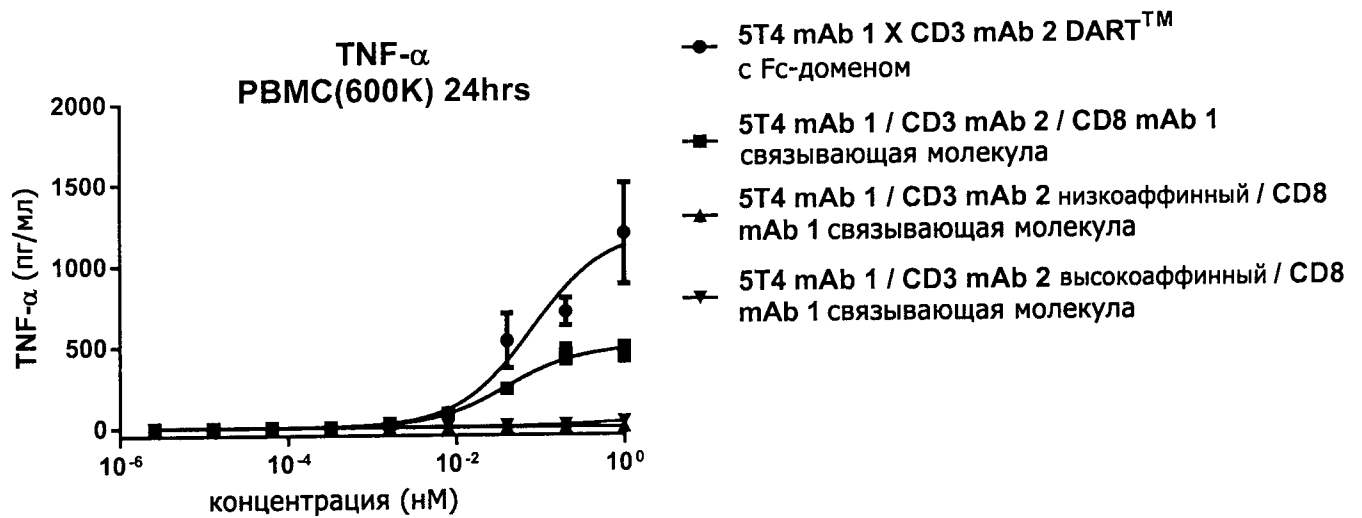


Фиг. 28F

Донор 2

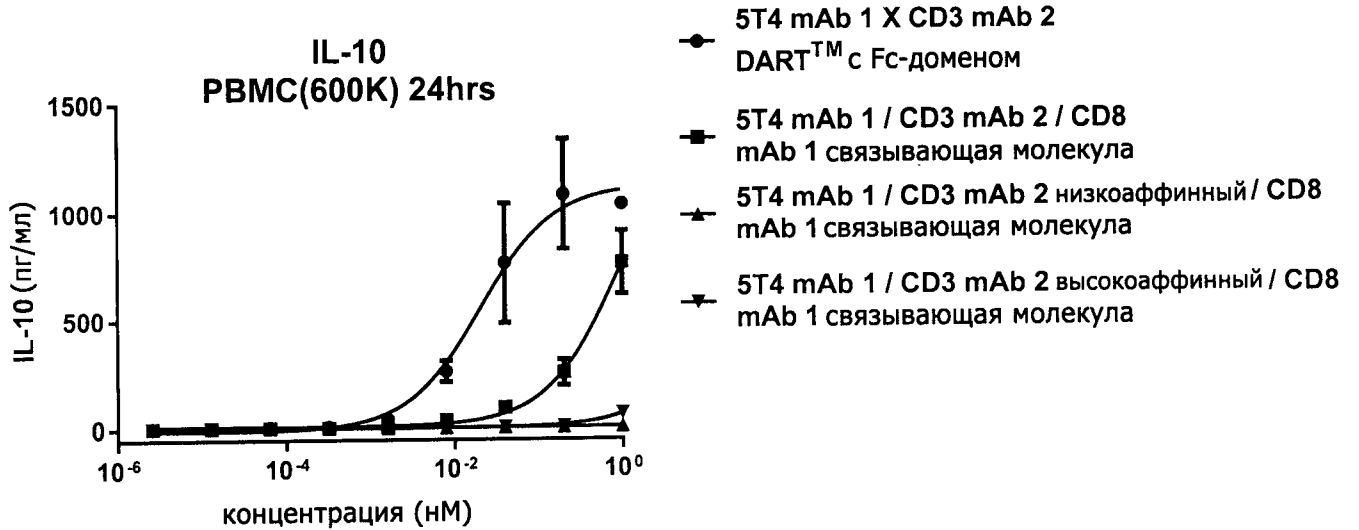


Фиг. 29А

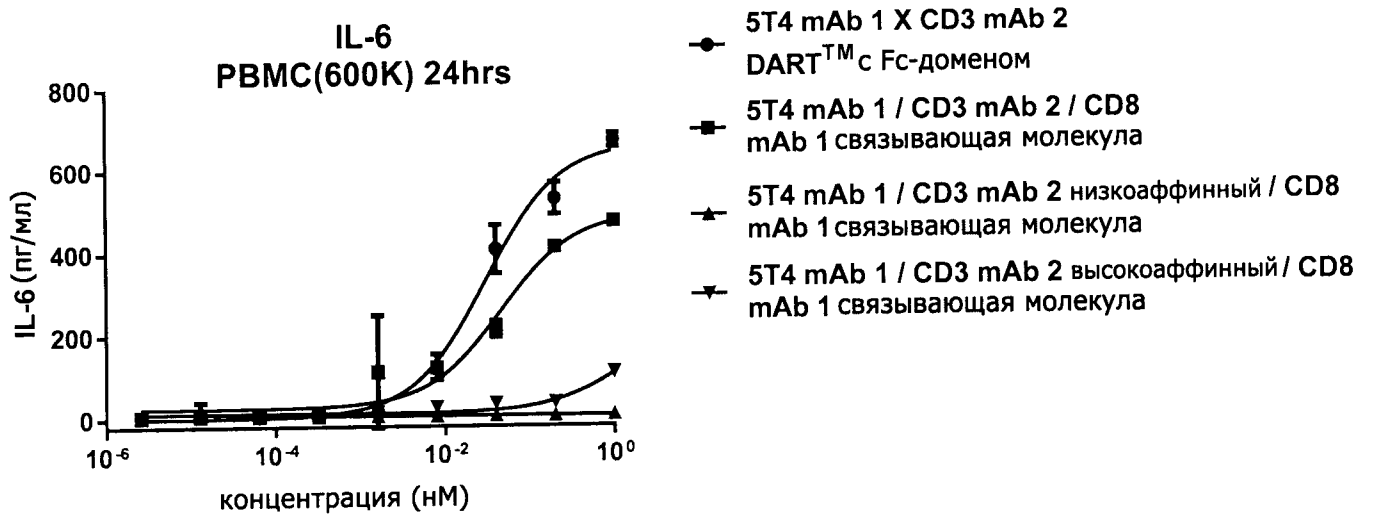


Фиг. 29В

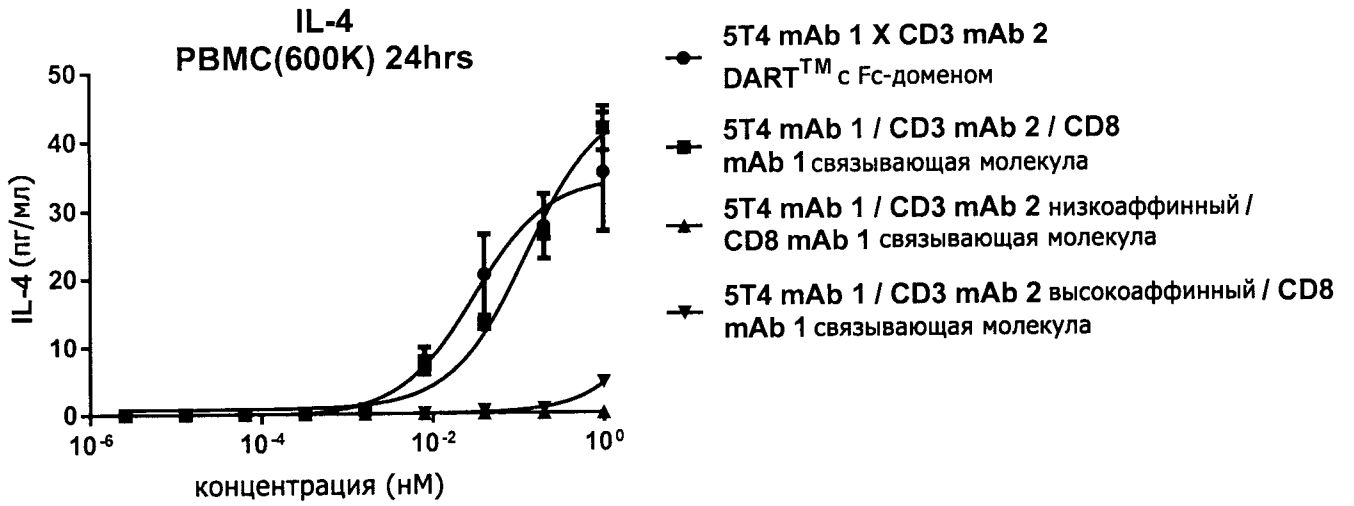
Донор 2



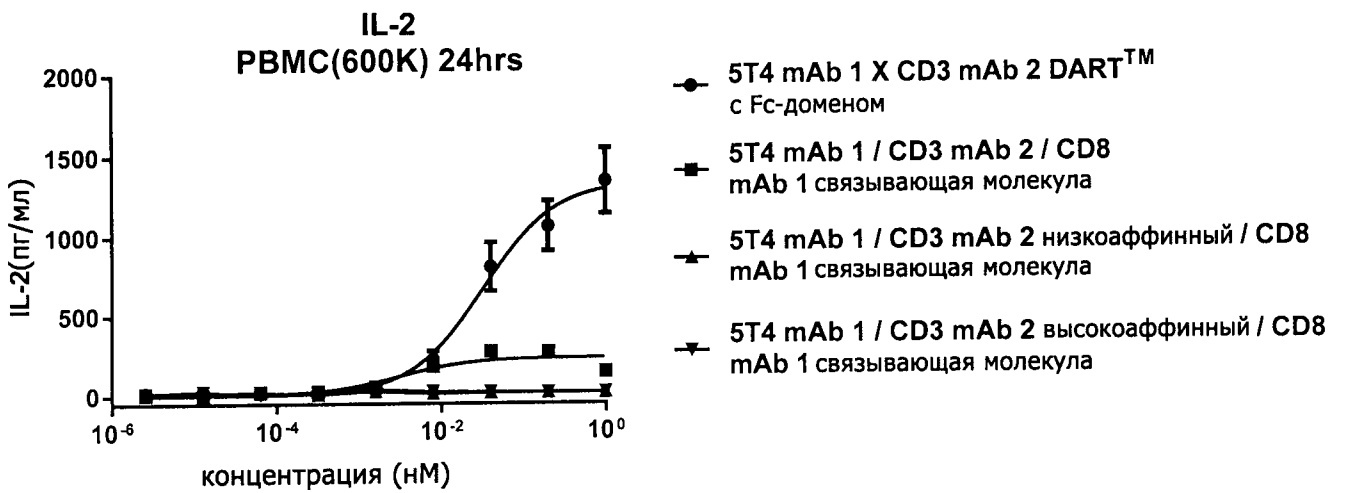
Фиг. 29C



Фиг. 29D



Фиг. 29Е



Фиг. 29F